

Рекомендована д-м біол. наук, проф. Л.С. Фірою
УДК 615.322:582.736:547.586.5

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСУ ІЗ ТРАВИ ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ

**©С.В. Ковальов, А.М. Ковальова, Р.Ф. Єременко, Л.М. Малоштан,
В.М. Ковальов**

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: із трави люцерни посівної (*Medicago sativa* L.) одержано фенольний комплекс, досліджено його гостру токсичність, виділено та ідентифіковано гідроксикоричні кислоти: ферулову, *p*-кумарову, хлорогенову, неохлорогенову; флавоноїдні аглікони: кемпферол, кверцетин, апігенін, лютеолін, хризоееріол, даїдзейн, формонетин, геністеїн та біоханін А.

Ключові слова: люцерна посівна (*Medicago sativa* L.), фенольний комплекс, токсичність, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди.

Вступ. Останнім часом фенольні сполуки привертають все більшу увагу багатьох дослідників. Це зумовлено, в першу чергу, їх низькою токсичністю, меншою кількістю побічних ефектів, порівняно із синтетичними засобами, і широким спектром фармакологічної дії, що спонукало до створення багатьох лікарських препаратів, які використовують для лікування серцево-судинної системи, шлунково-кишкового тракту та печінки [1, 2].

Як лікарську сировину для вивчення фенольних сполук було обрано люцерну посівну (*MEDICAGO SATIVA* L.) родини бобових (*Fabaceae*). Трава люцерни містить білки (до 21%), амінокислоти, аміни, ліпіди (до 4,7%), стерини, крохмаль, пектинові речовини, моно- і олігосахариди, тритерпенові сапоніни, карбонові і фенолкарбонові кислоти, еуфлавоноїди, ізофлавоїни, вітаміни B₂, K, каротиноїди, токоферол та біотин [3].

Люцерна має широкий спектр біологічної дії: знижує рівень холестерину та ліпідів, цукру, зміцнює стінки судин, покращує баланс шлункової мікрофлори, збільшує лактацію, виявляє протисклеротичну, репаративну, протизапальну, антиоксидантну та естрогенну дії [4-11].

Раніше нами був отриманий фенольний комплекс з трави люцерни посівної під умовною назвою "Люцерин", який проявляв виражену анаболічну активність і використовувався як кормова добавка [12]. Продовжуючи дослідження в цьому напрямку, нами удосконалена технологія одержання фенольного комплексу [13], що, можливо, може привести до зміни його хімічного складу та фармакологічної активності.

Мета роботи – вивчити токсичність та хімічний склад одержаного комплексу фенольних сполук із трави люцерни посівної.

Методи дослідження. Сировину заготовляли в період бутонізації та цвітіння в 2006-2007 рр. в Харківській та Полтавській областях. Вивчення гострої токсичності екстракту трави люцерни посівної (ЕТЛП) проводили згідно з рекомендаціями фармакологічного комітету [14]. В роботі використовували два види тварин: нелінійних, здорових, статевозрілих мишей та щурів обох статей. Готували тварин за загальноприйнятою схемою (голодування, маркування, зважування, поділ на групи). Умови утримання тварин відповідали загальноприйнятим стандартам із експериментального вивчення безпеки речовин [15, 16].

Гостру токсичність вивчали на мишах масою тіла 18-20 г і щурах з масою тіла 150-200 г за методом пробіт-аналізу Літчфілда та Уїлкоксона [17-19].

ЕТЛП вводили однократно двома шляхами: внутрішньочеревно мишам у дозах 3500-5000 мг/кг маси тварини, щурам у дозах від 4000 до 7000 мг/кг і перорально: мишам у дозах від 3000 до 5000 мг/кг, щурам – від 5000 до 8000 мг/кг.

Матеріал експерименту оброблено методом нелінійної регресії з використанням стандартного пакету програм Statistica [20].

Температуру плавлення визначали на блоці Кофлера, УФ-спектри знімали на спектрофотометрі СФ-46, ІЧ-спектри на спектрофотометрі UR-20 (Німеччина) в таблетках калію броміду.

Виділення флавоноїдів. 50,0 г екстракту трави люцерни посівної розчиняли в 150 мл дистильованої води, додавали 150 мл 10% розчину кислоти сульфатної і гідролізували на киплячому водяному огрівнику в колбі зі зворотним холодильником протягом 5 годин. Після охолодження розчин переносили в ділительну лійку і обробляли етилацетатом 5 раз по 300 мл. Етилацетатні витяги з'єднували, промивали водою до нейтральної реакції на лакмус і упарювали досуха. Сухий залишок 4,6 г

розчиняли в 30 мл 96% спирту, змішували з поліамідом і після висушування наносили на колонку поліамідного сорбенту ($h=70$ см, $d=4$ см). Елюювали хлороформом та сумішшю хлороформу зі спиртом. Фракції відбирали по 100 мл. Контроль фракцій здійснювали хроматографією на папері Filtrak FN 4,12 в системах хлороформ – оцтова кислота – вода (13:6:1) та бензол – етилацетат – оцтова кислота – вода (50:50:1:1), папір обробляли сумішшю формамід – спирт (1:3). Однотипні фракції з'єднували, упарювали досуха, а сухі залишки кристалізували із 96% спирту. Фракції, які містили суміш речовин, додатково розділяли на колонці поліамідного сорбенту. В результаті були виділені формонетин, даїдзєїн, геністеїн, біоханін А, кемпферол, апігенін, лютеолін, хризоееріол та кверцетин, які ідентифікували за температурою плавлення, даними УФ- та ІЧ-спектрів.

Таблиця 1. Результати вивчення гострої токсичності ЕТЛП на мишах при пероральному введенні

№ п/ч	Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Спостережуваний ефект, загибель тварин/кількість тварин
1	3000	6	0/6
2	4000	6	0/6
3	4500	6	0/6
4	5000	6	0/6

Таблиця 2. Результати вивчення гострої токсичності ЕТЛП на щурах при пероральному введенні

№ п/ч	Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Спостережуваний ефект, загибель тварин/кількість тварин
1	5000	6	0/6
2	6000	6	0/6
3	7000	6	0/6
4	8000	6	0/6

Як видно з таблиць 1 і 2, при пероральному способі введення жодна з введених доз загибелі тварин не викликала. Подальше збільшен-

Результати й обговорення. Після введення різних доз ЕТЛП за дослідними тваринами вели постійне спостереження протягом першого дня експерименту: реєстрували терміни розвитку інтоксикації та загибелі тварин, а потім встановлювали взаємозв'язок між кількістю тварин, які вижили і дозою. Надалі стан тварин відмічали двічі на добу протягом 4(14) днів. Реєстрували загальний стан і поведінку тварин, стан нервово-м'язових і вегетативних функцій, шерстного покриву, з'їдання корму, споживання води й часу настання токсикозу й загибелі.

Переносимість оцінювали за загальним станом і відсотком тварин, які загинули. Показники гострої токсичності визначали на підставі аналізу залежності частки тварин, які вижили, від дози. Результати проведених досліджень представлені в таблицях 1-3.

ня дози не було раціональним, що пов'язано з труднощами, які виникають при введенні більших доз per os.

Таблиця 3. Результати вивчення гострої токсичності ЕТЛП на мишах при внутрішньочеревному введенні

№ п/ч	Доза, мг/кг	Кількість тварин в групі	Спостережуваний ефект, загибель тварин/кількість тварин
1	3500	6	0/6
2	4000	6	0/6
3	4500	6	0/6
4	5000	6	1/5

Середню смертельну дозу (LD_{50}) при внутрішньочеревному введенні екстракту із трави люцерни посівної визначити не вдалося. При введенні максимальної дози тварини почували себе нормально протягом усього періоду спостереження. В більшій дозі ввести рослинний комплекс не представлялося можливим.

Проведені дослідження показали, що при різних способах введення ЕТЛП добре переносяться лабораторними тваринами і згідно з класифікацією К.К. Сидорова належить до VI класу токсичності речовин [21].

У результаті хроматографічного та хімічного

дослідження водних та спирто-водних розчинів екстракту із трави люцерни посівної встановлено наявність в ньому таких груп фенольних сполук, як гідроксикоричні кислоти, кумарини, еуфлавоноїди, ізофлавоноїди та дубильні речовини конденсованої групи. При розділенні продуктів кислотного гідролізу фенольного комплексу на колонці поліамідного сорбенту з використанням як розчинник хлороформу і його суміші зі спиртом було виділено 9 речовин флавоноїдної природи. Основні фізико-хімічні характеристики їх наведені в таблиці 4.

Таблиця 4. Деякі фізико-хімічні властивості фенольних речовин, виділених із екстракту трави люцерни посівної

№ за/п	Назва речовин	Загальна формула	Тпл., °С	УФ-спектри, 96% етанол, нм	ІЧ-спектри, см ⁻¹
Похідні гідроксикоричної кислоти					
1	п-кумарова кислота	C ₉ H ₆ O ₃ ·H ₂ O	212-214	310, 288	
2	Ферулова кислота	C ₉ H ₈ O ₄	196-197	323, 291, 230	
3	Хлорогенова кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	200-204	325, 298, 240	
4	Неохлорогенова кислота	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	аморф.	325, 298, 245	
Похідні 2-(3)-феніл-γ-хромону					
1	Кемпферол	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	279-280	360, 270	1659 (C=O), 3410 (–OH), 1610, 1580, 1510 (C=C)
2	Кверцетин	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	310-312	352, 256	1660(C=O), 3410 (–OH), 1610, 1580, 1510 (C=C)
3	Апігенін	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	345-346	328, 270	1660(C=O), 3520, 3300 (–OH), 1620, 1570 (C=C), 2950, 2850 (–CH ₃)
4	Лютеолін	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	327-329	370, 269	1665 (C=O), 3385-3300 (–OH), 1612, 1560, 1518 (C=C)
5	Хризоеріол	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	324-325	270, 345, 351	1663(C=O), 3390–3300 (–OH), 1615, 1560, 1520 (C=C), 2940 (–CH ₃)
6	Даїдзеїн	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	307-308	303*, 249	1642(C=O), 3320 (–OH), 1610, 1570, 1515, 1460 (C=C)
7	Формононетин	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	261-263	302*, 249	1635(C=O), 3200-3100 (–OH), 1610, 1570, 1510, 1452 (C=C), 3150, 1030 (–CH ₃)
8	Геністеїн	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	289-292	325*, 262	1665(C=O), 3420-3250 (–OH), 1618, 1575, 1495, 1450 (C=C)
9	Біоханін А	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	212-214	327*, 263	1655(C=O), 3355, 3280 (–OH), 1615, 1570, 1515, 1460 (C=C), 2940 (–CH ₃)

Примітка: * – плече.

Як видно з таблиці 4, флавоноїди екстракту із трави люцерни посівної представлені похідними флавонолів – кемпферолу, кверцетину; флавонів – апігеніну, лютеоліну, хризоеріолу; ізофлавонів – даїдзеїну, формононетину, геністеїну та біоханіну А.

Етилацетатний витяг та водний розчин ЕТЛП хроматографували на папері з достовірними зразками гідроксикоричних кислот у системах: I – н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2) і II – 2% оцтова кислота з наступною обробкою хроматограм парами аміаку та діазореактивом. При цьому було виявлено наявність хлорогенової, неохлорогенової, п-кумарової та ферулової кис-

лот. Ці сполуки були виділені в індивідуальному стані методом препаративної хроматографії на папері та ідентифіковані на підставі фізико-хімічних властивостей, їх УФ-спектрів та порівняння зі зразками (табл.4).

Висновки. Встановлено гостру токсичність фенольного комплексу із трави люцерни посівної. Виділено та ідентифіковано 4 гідроксикоричних кислоти: п-кумарову, ферулову, хлорогенову, неохлорогенову та 9 флавоноїдних агліконів: кемпферол, кверцетин, апігенін, лютеолін, хризоеріол, даїдзеїн, формононетин, геністеїн та біоханін А.

Література

1. Лекарственные препараты Украины 1999-2000, I-III том. – Харьков: "Прапор", Изд-во УкрФА, 1999. – 1722 с.
2. Регистр лекарственных средств России / Под ред. Ю.Ф. Крылова. – М.: Информхим, 1993. – 989 с.
3. Лекарственные свойства сельскохозяйственных

растений / Под ред. М.И. Борисова. – Минск: Ураджай, 1974. – 336 с.

4. Timbekova A.E., Isaev M.I., Abubakirov N.K. Chemistry and biological activity of triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* // Adv. Exp. Med. Biol. – 1996. – V. 405. – P. 171-182.

5. Fungistatic activity of lucerne saponins and digitonin as related to sterols / Y. Assa, B. Gestetner, I. Chet, Y. Henis // *Life Sci. II.* – 1972. – V. 11(13). – P. 637-647.
6. Cheeke P.R. Alfalfa: a natural hypocholesteremic agent. // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1973. – V. 26(2). – P. 133.
7. Yanaura S., Sakamoto M. Effect of alfalfa meal on experimental hyperlipidemia // *Nippon Yakurigaku Zasshi.* – 1975. – V. 71(5). – P. 387-393.
8. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago sp.*: structure-activity relationship / P. Avato, R. Bucci, A. Tava, C. Vitali, A. Rosato, Z. Bialy, M. Jurzysta // *Phytother. Res.* – 2006. – V. 20(6). – P. 454-457.
9. Токсикологическое изучение фитопрепарата из экстракта люцерны посевной / К.Л. Лукманова, Т.Б. Та- нирбегова, К.С. Насыров и др. // *Эксперим. и клин. фармакология.* – 2000. – Т.63, №1. – С. 62-65.
10. Лукманова К.А. и др. Экспериментальная и клини- ческая оценка гепатопротекторного действия экстракта люцерны посевной // *Здравоохранение Башкортос- тана.* – 1998. – №3-4. – С. 28-30.
11. Лукманова К.А. и др. Иммунотропная активность “Эраконда” // *Эксперим. и клин. фармакология.* – 1998. – Т. 61, №4. – С. 41-43.
12. А.с. СССР №1210273. Способ получения средства, обладающего анаболизирующей активностью / В.Н. Ковалев, В.В. Бойник, Г.Д. Шабельник и др. – 1985.
13. Деклараци́нный патент № 27307. Спосіб одержан- ня засобу з анаболічною активністю / С.В. Ковальов, Р.Ф. Єременко, О.М. Шаталова та ін. – Опубл. Бюл. № 17 від 25.10.2007.
14. Доклінічні дослідження лікарських засобів (мето- дичні рекомендації) / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 74-97, 292-306.
15. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. и др. Лабораторные животные в эксперименте. – Киев: Вища школа, 1983. – С. 243-277.
16. Проблема нормы в токсикологии (современные представления и методические подходы, основные параметры и константы) / И.М. Трахтенберг, Р.Е. Сова, В.О. Шефтель, Ф.А. Оникиенко; Под ред. И.М. Трах- тенберга. – М.: Медицина, 1991. – 208 с.
17. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – М., 1963. – 120 с.
18. Прозоровский В.Б. Использование метода наи- меньших квадратов для пробит-анализа кривых ле- тальности // *Фармакология и токсикологии.* – 1962. – №1. – С. 115-119.
19. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биоло- гической активности. Доклады АН СССР. – М., 1979. – 247 (6). – 1513-1516 с.
20. Иванов Ю.И. Погорелюк Р.Н. Статистическая об- работка результатов медико-биологических исследо- ваний на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.
21. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения // В кн.: *Ток- сикология новых промышленных химических ве- ществ.* – М.: Медицина, 1973. – Вып. 13. – С.47-57.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ

С.В. Ковалев, А.М. Ковалева, Р.Ф. Єременко, Л.Н. Малоштан, В.Н. Ковалев

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: из травы люцерны посевной (*Medicago sativa L.*) получен фенольный комплекс, исследована его острая токсичность, выделены и идентифицированы гидроксикоричные кислоты: феруловая, п-кумаровая, хлорогеновая, неохлорогеновая; флавоноидные агликоны: кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризоэриол, даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А.

Ключевые слова: люцерна посевная (*Medicago sativa L.*), фенольный комплекс, токсичность, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды.

RESEARCH OF PHENOLIC COMPLEX FROM THE GRASS OF ALFALFA

S.V. Kovalyov, A.M. Kovalyova, R.F. Yeremenko, L.M. Maloshtan, V.M. Kovalyov

National University of Pharmacy, Kharkiv

Summary: phenolic complex have been obtained from the grass of alfalfa (*Medicago sativa L.*). Its acute toxicity has been investigated, the hydroxycinnamonic acids: ferulic, p-coumaric, chlorogenic, neochlorogenic; flavonoid aglycones: kaempferol, quercetin, apigenin, luteolin, chrysoeriol, daidzein, formononetin, genistein and biokhanin A have been isolated and identified.

Key words: alfalfa (*Medicago sativa L.*), phenolic complex, toxicity, hydroxycinnamonic acids, flavonoids.