

PŘEHLEDY A ODBORNÁ SDĚLENÍ

Obsahové látky listov *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.*Constituents of the leaves of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.

Vladimír Forman • Daniel Grančai • Branislav Horváth

Došlo: 15 júla 2016 / Prijato: 15 augusta 2016

Súhrn

Predložená práca sa zaoberá izoláciou a identifikáciou obsahových látok prítomných v listoch drierňa lekárskeho (*Cornus officinalis* Sieb. et Zucc.). Z petroléterového extraktu listov tejto rastliny bol izolovaný β -sitosterol, z metanolového extraktu glukóza a sacharóza a z vodno-metanolového extraktu kyselina galová, kvercetin a kvercetin-3-*O*-glukozid (izokvercitrín). Izolované látky boli identifikované pomocou fyzikálno-chemických metód, porovnaním výsledkov so štandardami a literatúrou. Z listov *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. boli látky I–V izolované prvýkrát.

Kľúčové slová: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. • Cornaceae • petroléterový extrakt • metanolový extrakt • vodno-metanolový extrakt

Summary

The paper deals with the isolation and identification of the constituents of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. leaves. There was isolated β -sitosterol from petroleum ether extract, glucose and saccharose from methanolic extract and gallic acid, quercetin and quercetin-3-*O*-glucoside (isoquercitrin) from aqueous-methanolic extract. Isolates were identified by physico-chemical data, and by comparing with authentic samples and literature data.

The compounds I – V were isolated from the leaves of *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. for the first time.

Key words: *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. • Cornaceae • petroleum ether extract • methanolic extract • aqueous-methanolic extract

Úvod

Cornus officinalis Sieb. et Zucc. – drierňa lekárska z čeľade Cornaceae je ker alebo strom dosahujúci výšku 4–10 m. Rastie v lesoch a na horských svahoch, pochádza z Japonska a Kórei¹⁾. Obsahovým látkam z listov tohto druhu a ich biologickým účinkom bolo doteraz venovaných málo prác. Zistenie antiproliferatívnej a imunomodulačnej aktivity vodných záparov (lyofilizátov)^{2, 3)} nás viedlo k štúdiu sekundárnych metabolitov, ktoré sa môžu na nich podieľať. V druhu *Cornus officinalis* boli doteraz opísané najmä terpeny a látky polyfenolového charakteru ako flavonoidy, antokyány a triesloviny^{4–8)}. Z listov tohto druhu boli doteraz izolované kyselina oleánolová, izokvercitrín a 1,7-di-*O*-galoyl-D-sedoheptulóza^{9, 10)}.

Predložená práca opisuje izoláciu a identifikáciu obsahových látok petroléterového, metanolového a vodno-metanolového extraktu z listov *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. a prináša nové poznatky o ich výskyte v tejto časti rastliny.

Experimentálna časť

Materiál a metódy

Pri izolácii a identifikácii obsahových látok *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. sa použil petroléterový, metanolový a vodno-metanolový extrakt z listov. Listy sa nazbierali v Arboréte Tesárske Mlyňany, Ústave ekológie lesa Slovenskej akadémie vied v septembri 2014 a usušili pri laboratórnej teplote. Botanická charakteristika bola potvrdená Ing. Petrom Hoľkom z Arboréty Tesárske Mlyňany.

Na separáciu obsahových látok sa použil silikagél zn. Silpearl, pripravený podľa Pitru a Šterbu¹¹⁾, na tenkovrstvovú chromatografiu Silufol UV 254 a 366 nm,

V. Forman • prof. RNDr. Daniel Grančai, CSc. (✉)
Univerzita Komenského v Bratislave
Farmaceutická fakulta, Katedra farmakognózie a botaniky
Odbojárov 10, 832 32 Bratislava, SK
e-mail: grancai@fpharm.uniba.sk

B. Horváth
Univerzita Komenského v Bratislave
Farmaceutická fakulta, Centrálné laboratórium NMR

*Venované Dr.h.c. prof. RNDr. Václavovi Suchému, DrSc. pri príležitosti jeho životného jubilea.

Lucefol Quick (Kavalier, Votice, ČR) a silikagelové platne Kiessselgel 60 F₂₅₄ (Merck). Detekcia chromatogramov sa robila UV žiarením pri 254 a 366 nm, kyselinou sírovou v éteri (1 : 4) s následným zahriatím na 120 °C, Neuovým skúmadlom a anilínftalátom¹². Rozpúšťadlá použité pri chromatografii boli vopred predestilované.

Pri navažovaní sa používali analytické váhy Mettler AE200 (Mettler Toledo, Švajčiarsko). Teploty topenia sa merali na Koflerovom bloku (VEB Analytik, Dresden). Ultrafialové spektrá sa merali na prístroji GENESYSTM 10 (Thermo Electron Corporation, Veľká Británia) a na prístroji Specord UV/VIS (Carl Zeiss, Jena, Nemecko) v metanole a po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel¹³. ¹H NMR a ¹³C NMR spektrá boli merané na Varian NMR System 600 MHz (Varian, Inc., USA). Kyslá hydrolýza sa robila 2% kyselinou sírovou; vodná fáza sa potom neutralizovala na DOWEX-e (FLUKA AG CHEMISCHE FABRIK BUCHS SG) podľa literatúry^{14, 15}.

Extrakcia a izolácia látok

Usušené a pomleté listy *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. (800 g) sme extrahovali v Soxhletovej aparatúre a po odparení rozpúšťadla vo vákuu sme získali petroléterový (20,5 g), chloroformový (28,5 g), etylacetátový (17,5 g) a metanolový (91,0 g) extrakt.

Petroléterový extrakt sme delili kolónovou chromatografiou na silikagéli č. 3 s obsahom 13 % vody. Kolónu sme eluovali zmesou rozpúšťadiel cyklohexán : acetón v rôznom pomernom zastúpení. Eluáty sme zachytávali v množstvách približne po 20 ml. Tieto sme postupne odparovali a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do siedmich frakcií hrubého delenia. Z frakcie č. 4 sme kryštalizáciou z uvedenej zmesi rozpúšťadiel získali látku I.

Rovnakým spôsobom sme delili látky prítomné v metanolovom extrakte. Kolónu sme eluovali zmesou rozpúšťadiel chloroform : metanol : cyklohexán v rôznom pomernom zastúpení. Eluáty sme zachytávali v množstvách približne po 50 ml. Na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie sme získali deväť frakcií hrubého delenia.

Frakciu č. 4 hrubého delenia sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol (90 : 10, 85 : 15 a 80 : 20). Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do siedmich frakcií. Z frakcie č. 4 sme samovoľnou kryštalizáciou z uvedenej zmesi rozpúšťadiel získali látku II.

Frakciu č. 7 hrubého delenia sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol (80 : 20, 70 : 30 a 50 : 50). Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do piatich frakcií. Z frakcie č. 3 sme samovoľnou kryštalizáciou z uvedenej zmesi rozpúšťadiel získali látku III.

Vodno-metanolový extrakt sme pripravili maceráciou 340 g usušených a pomletých listov *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. (metanol : voda = 95 : 5) po predchádzajúcej macerácii chloroformom. Extrakt sme rozpustili vo vode. Prítomný chlorofyl sme oddelili vytrepávaním s petroléterom. Takto prečistený extrakt sme vytrepali do butanolu a odparili do sucha (15,0 g).

Pripravený extrakt sme delili kolónovou chromatografiou na silikagéli č. 3 s obsahom 13 % vody. Kolónu sme eluovali zmesou rozpúšťadiel chloroform : metanol : acetón (90 : 5 : 5 – metanol : voda (95 : 5)). Eluáty sme zachytávali v množstvách približne po 50 ml. Tieto sme postupne odparovali a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do siedmich frakcií hrubého delenia.

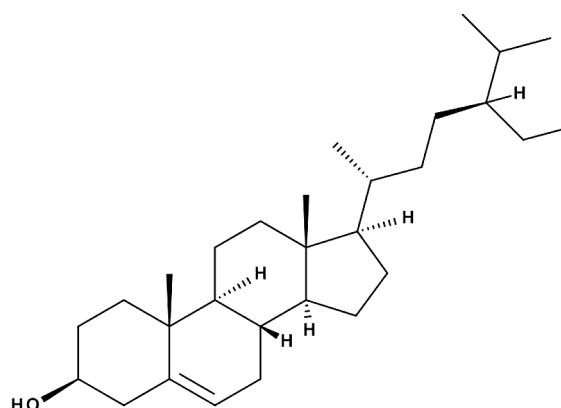
Frakciu č. 2 hrubého delenia sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol : cyklohexán v rôznom pomernom zastúpení. Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do piatich frakcií. Z frakcie č. 3 sme samovoľnou kryštalizáciou z uvedenej zmesi rozpúšťadiel získali látku IV.

Frakciu č. 3 hrubého delenia sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol : cyklohexán (80 : 15 : 5 a 70 : 20 : 10). Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do troch frakcií. Z frakcie č. 2 sme kryštalizáciou z uvedenej zmesi rozpúšťadiel získali látku V.

Frakciu č. 4 hrubého delenia sme rechromatografovali na silikagéli č. 4 v sústave chloroform : metanol : cyklohexán (70 : 20 : 10 a 60 : 30 : 10). Frakcie sme zachytávali po 5 ml a na základe výsledkov tenkovrstvovej chromatografie spojili do štyroch frakcií. Z frakcie č. 3 sme kryštalizáciou z metanolu získali látku VI.

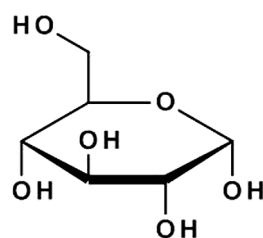
Výsledky a diskusia

Látka I (4,5 mg) (obr. 1) bola izolovaná vo forme kryštálov s teplotou topenia 136–139 °C. V ultrafialovom spektre je transparentná. V infračervenom spektre sú pásy pri 3360 a 1035 cm⁻¹ (-OH), 1460 cm⁻¹ (-CH₂), 1377 cm⁻¹ (angul. CH₃). Porovnaním nameraných hodnôt s literatúrou¹⁶ a so štandardom sme izolovanú látku (I) identifikovali ako β-sitosterol.



Obr. 1. Látka I

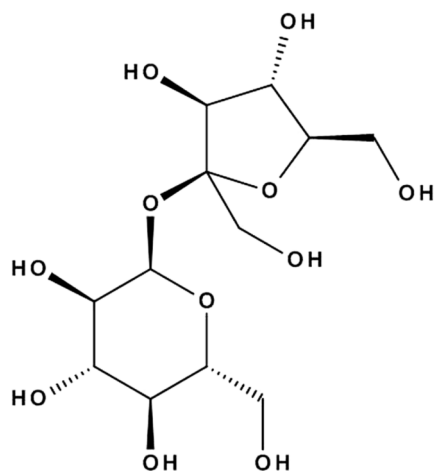
Látka II (314,0 mg) (obr. 2) bola izolovaná vo forme bielych kryštálov sladkej vône s teplotou topenia 142 až 146 °C. S anilínftalátovým skúmadlom dávala pozitívnu reakciu. V ultrafialovom spektre je transparentná. V infračervenom spektre je pás pri 3312 cm⁻¹ charakteristický pre hydroxylové skupiny sacharidovej zložky a pásy



Obr. 2. Látka II

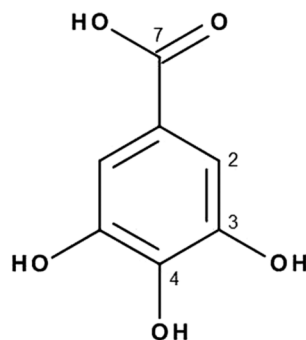
CO- skupiny esterovej väzby pri 900–1200 cm^{-1} . Porovnaním nameraných hodnôt s literatúrou¹⁷⁾ a so štandardom sme izolovanú látku (II) identifikovali ako glukóza.

Látka III (169,9 mg) (obr. 3) bola izolovaná ako biela kryštalická sladkej vône s teplotou topenia 178 až 184 °C. S anilínftalátovým skúmadlom dávala pozitívnu reakciu. V ultrafialovom spektre je transparentná. V infračervenom spektre je pás pri 3354 cm^{-1} charakteristický pre hydroxylové skupiny sacharidovej zložky a pásy CO- skupiny esterovej väzby pri 900–1200 cm^{-1} . Porovnaním nameraných hodnôt s literatúrou¹⁷⁾ a so štandardom sme izolovanú látku (III) identifikovali ako sacharóza.



Obr. 3. Látka III

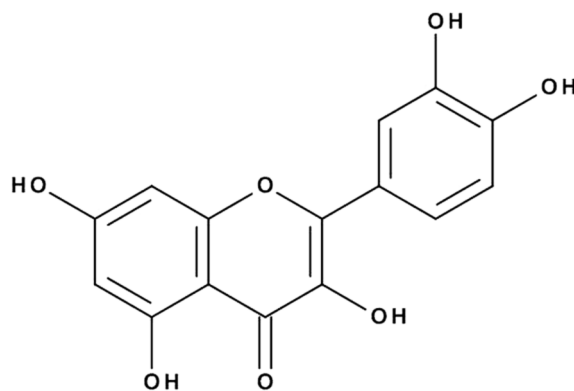
Látka IV (5,0 mg) (obr. 4) bola izolovaná ako biela kryštalická s teplotou topenia 220–225 °C. V ultrafialovom spektre pri vlnovej dĺžke 366 nm vykazuje



Obr. 4. Látka IV

modrú fluoreskujúcu škvrnu. V infračervenom spektre sú pásy pri 1020 a 3274 cm^{-1} typické pre hydroxylové skupiny, pás pri 3067 cm^{-1} charakteristický pre aromatické vodíky, široký difúzny pás karboxylovej skupiny pri 2358–2660 cm^{-1} a pásy pri 1697, 1615 a 1540 cm^{-1} charakteristické pre benzénové jadro. Porovnaním nameraných hodnôt s literatúrou¹⁸⁾ a so štandardom sme izolovanú látku (IV) identifikovali ako kyselina galová.

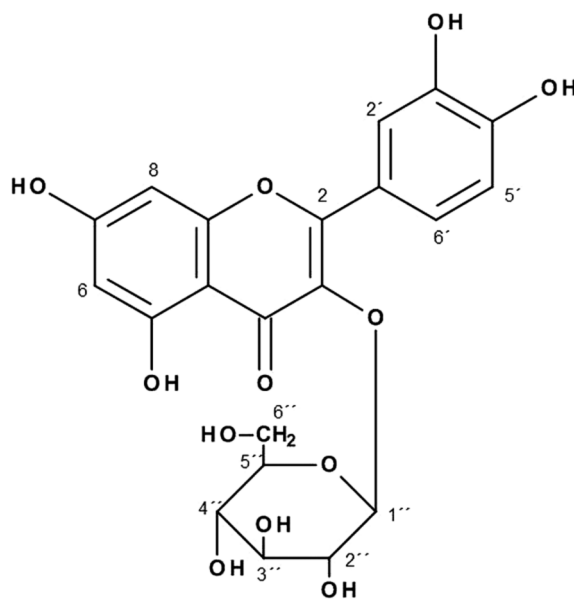
Látka V (5,0 mg) (obr. 5) bola izolovaná ako žltá práškovitá s teplotou topenia 310–314 °C. Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 255 a 371. Porovnaním nameraných hodnôt s literatúrou¹⁹⁾ a so štandardom sme izolovanú látku (V) identifikovali ako kvercetin.



Obr. 5. Látka V

Látka VI (6,0 mg) (obr. 6) bola izolovaná ako svetložltá práškovitá s teplotou topenia 180–182 °C. Hmotnostné spektrum vykazuje molekulový ión $[\text{M}-\text{H}]$ o m/z 463 (glykozid kvercetínu, cukor 162) a fragment o m/z 301 (aglykón). Ultrafialové spektrum v metanole vykazuje pásy typické pre flavón: $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ nm: 254, 265sh, 293 a 358.

Po pridaní špecifických diagnostických skúmadiel sme namerali nasledujúce posuny maxim:



Obr. 6. Látka VI

$\lambda_{\text{NaOMe}}^{\text{max}}$ nm: 270, 320sh, 409 ; $\lambda_{\text{AlCl}_3}^{\text{max}}$ nm: 270, 295sh, 430; $\lambda_{\text{AlCl}_3/\text{HCl}}^{\text{max}}$ nm: 265, 295sh, 400; $\lambda_{\text{NaOAc}}^{\text{max}}$ nm: 267, 398; $\lambda_{\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3}^{\text{max}}$ nm: 256, 368

^1H NMR: δ ppm (DMSO- d_6 , 600 MHz): δ 12,52 (1H, s, HO-C(5)); 10,91 (1H, br. s, HO-C(7)); 9,72 (1H, br. s, HO-C(3')); 9,32 (1H, br. s, HO-C(4')); 7,65 (1H, br. s., $J = 2,2$ Hz, H-C(2')); 7,55 (1H, dd, $J = 8,5, 2,0$ Hz, H-C(6')); 6,81 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-C(5')); 6,39 (1H, d, $J = 2,0$, H-C(8)); 6,19 (1H, d, $J = 2,0$, H-C(6)); 5,69 (1H, s, br., HO); 5,45 (1H, d, $J = 7,0$, H-C(1')); 5,18 (1H, s, br., HO); 5,00 (1H, s, br., HO); 4,8 (1H, s, br., HO); 3,67 (1H, m, H-C(6')); 3,54 (1H, m, H-C(2'' alebo 3'' alebo 4'' alebo 5'')); 3,43 (1H, m, H-C(6'')) 3,36–3,27 (3H, m, H-C(2''), H-C(3''), H-C(4''), H-C(5''))

^{13}C NMR: δ ppm (DMSO- d_6 , 151 MHz): δ 177,67 (C-4), 164,70 (C-7), 156,80 (C-9 alebo C-2), 156,73 (C-9 alebo C-2), 149,05 (C-4'), 145,36 (C-3'), 132,16 (C-3), 122,00 (C-6'), 121,24 (C-1'), 116,72 (C-2'), 115,67 (C-5'), 101,72 (C-1''), 76,48 (C-2'' alebo C-3'' alebo C-4'' alebo C-5''), 76,13 (C-2'' alebo C-3'' alebo C-4'' alebo C-5''), 74,25 (C-2'' alebo C-3'' alebo C-4'' alebo C-5''), 71,74 (C-2'' alebo C-3'' alebo C-4'' alebo C-5''), 61,59 (C-6'')

Na základe výsledkov spektrálnej analýzy a tenkovrstvovej chromatografie na Silufole možno predpokladať, že látka (VI) je glykozid kvercetínu. Aglykón získaný kyslou hydrolyzou bol zhodný so štandardom kvercetínu. Sacharidová zložka sa zhodovala so štandardom glukózy.

Na základe nameraných hodnôt sme izolovanú látku (VI) identifikovali ako kvercetín-3-*O*-glukozid (izokvercitrín).

Práca bola realizovaná s podporou grantovej úlohy č. 1/0059/11 VEGA Ministerstva školstva SR.

Stret záujmov: žiadny.

Literatúra

- Xiang Q., Boufford D. E. Cornaceae. Flora of China. 2005; 14, 206–221.
- Forman V., Haladová M., Grančai D., Ficková M. Antiproliferative activities of water infusions from leaves of five *Cornus* L. species. Molecules 2015; 20, 22546–22552.
- Forman V., Bukovský M., Grančai D. Immunomodulatory activity of leaf infusions of selected Cornaceae species on human leukocytes. Nat. Prod. Commun. 2016; 11, 685–687.
- Miyazawa M., Kameoka H. Volatile flavor components of crude drugs 7. Volatile flavor components of Corni fructus (*Cornus officinalis* Sieb. et. Zucc.). Agric. Biol. Chem. 1989; 53, 3337–3340.
- Hatano T., Yasuhara T., Abe R., Okuda T. Tannins of cornaceous plants 3. A galloylated monoterpene glucoside and a dimeric hydrolyzable tannin from *Cornus officinalis*. Phytochemistry 1990; 29, 2975–2978.
- He Y.-Q., Ma G.-Y., Peng J., Ma Z.-Y., Hamann M. T. Liver X receptor and peroxisome proliferator-activated receptor agonist from *Cornus alternifolia*. Biochim. Biophys. Acta 2012; 1820, 1021–1026.
- Hatano T., Yasuhara T., Okuda T. Tannins of cornaceous plants 2. Cornusiin-D, cornusiin-E and cornusiin-F, new dimeric and trimeric hydrolyzable tannins from *Cornus officinalis*. Chem. Pharm. Bull. 1989; 37, 2665–2669.
- Seeram N. P., Schutzki R., Chandra A., Nair M. G. Characterization, quantification, and bioactivities of anthocyanins in *Cornus* species. J. Agric. Food Chem. 2002; 50, 2519–2523.
- Ma Z.-Y., Yao B.-h., Wang L.-j., He Y.-Q. Chemical constituents from *Cornus officinalis* and their biological activity. Chron. Young Scientists 2012; 3, 209–211.
- Lee S. H., Tanaka T., Nonaka G.-I., Nishioka I. Tannins and related compounds 86. Sedoheptulose digallate from *Cornus officinalis*. Phytochemistry 1989; 28, 3469–3472.
- Pitra J., Štěrbá J. Třídění silikagelu pro chromatografii. Chem. Listy 1963; 57, 389–391.
- Šaršunová M., Schwarz V., Michalec Č. Chromatografia na tenkých vrstvách vo farmácii a klinickej biochémií. Bratislava: Osvešta 1977.
- Mabry T. J., Markham K. R., Thomas M. R. The systematic identification of flavonoids, New York: Springer Verlag 1970.
- Friedrich H. Über das Vorkommen von Isorhamnetin-Glykosiden in den Blüten von *Calendula officinalis* L. Arch. Farm. 1962; 295, 59–66.
- Friedrich H. Untersuchungen über die Isorhamnetin-Glykoside aus den Blüten von *Calendula officinalis* L. Arch. Farm. 1962; 295, 464–471.
- Suchý V., Grančai D., Grznár K., Tomko J., Dolejš L., Buděšínský M. Non-alkaloidal constituents of *Veratrum album* subsp. Lobelianum (BERNH.) Suessenguth. Acta Universitatis Palackianae Olomucensis 1980; 93, 141–147.
- Devon T. K., Scott A. I. Handbook of Naturally Occuring Compounds: Vol. I Acetogenins, Shikimates and Carbohydrates. New York: Academic Press 1975.
- PUBCHEM database. [online]. [cit. 2016-20-04]. Dostupné na: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- Dictionary of Natural Products on CD-ROM, Chapman and Hall, Version 6:2, January 1998.