



DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2025.2.15290>

УДК 615.322.07:582.970:581.45:581.19:547.56

КАЛИНА ЗВИЧАЙНА – ЛІКАРСЬКА РОСЛИНА ЗІ ЗНАЧНИМ РЕСУРСНИМ ПОТЕНЦІАЛОМ: ВИВЧЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПЛУК ЇЇ ЛИСТЯ І НАПРАЦЮВАННЯ МЕТОДИК ЙОГО СТАНДАРТИЗАЦІЇ

І. З. Кернична, Л. В. Вронська, А. Є. Демид, М. І. Шанайда

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

МОЗ України

kernychna@tdmu.edu.ua

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
12.02.2025

Після доопрацювання / Revised:
27.05.2025

Прийнято до друку / Accepted:
29.05.2025

Ключові слова:

калина звичайна,
ресурсне значення,
листя,
флавоноїди,
гідроксикоричні кислоти,
ВЕТШХ,
спектрофотометрія,
стандартизація.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи – дослідження флавоноїдів і гідроксикоричних кислот калини звичайної (*Viburnum opulus* L.) листя та напрацювання методик для його стандартизації.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були 4 зразки листя калини звичайної, зібраного у період цвітіння на території Тернопільської (перший та другий зразки), Львівської (третій зразок) та Волинської (четвертий зразок). Отримували метанольні вилучення з листя для ідентифікації і водно-етанольні для кількісного визначення. У роботі використано метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) для ідентифікації сполук фенольної природи і спектрофотометрії для кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів.

Результати й обговорення. У досліджуваних зразках калини звичайної листя методом ВЕТШХ було ідентифіковано кислоту хлорогенову, гіперозид і кверцитрин. У хроматографічних профілях усіх зразків спостерігали присутність чотирьох неідентифікованих флавоноїдів – глікозидних форм кверцетину і кемпферолу. За присутністю цих семи речовин у хроматографічному профілі запропонували здійснювати ідентифікацію *Viburnum opulus* листя.

В електронних спектрах поглинання випробовуваних розчинів флавоноїдів калини звичайної листя в умовах комплексоутворення з алюмінієм хлоридом максимум поглинання спостерігали за довжини хвилі 403 ± 2 нм. Це визначило вибір лютеоліну як стандартної речовини для перерахунку вмісту суми флавоноїдів, оскільки його комплекс з алюмінієм хлоридом має максимум поглинання за довжини хвилі 400 ± 2 нм. Визначений вміст флавоноїдів у чотирьох зразках досліджуваної сировини становив 0,47–0,74% у перерахунку на лютеолін і суху сировину. Високий вміст флавоноїдів, їхнє різноманіття та різностороння біологічна активність виявлених сполук є підставою для ґрунтовного вивчення калини звичайної листя як потенційної лікарської рослинної сировини.

Висновки. Запропоновано ВЕТШХ-методику ідентифікації калини звичайної листя. Ідентифікаційними маркерами вибрано кислоту хлорогенову, гіперозид, кверцитрин і чотири неідентифікованих флавоноїди. Для напрацювання кількісного критерію якості запропоновано здійснювати спектрофотометричне визначення вмісту флавоноїдів.

Вступ. Кору, листки, квітки і плоди калини звичайної (*Viburnum opulus* L.) здавна використовують у прописках народної медицини [1]. Сік плодів застосовують у разі кашлю, застуди, гіпертонії, а також широко під час виготовлення різних харчових продуктів [1; 2]. Відвар кори калини має кровоспинну дію при внутрішньому застосуванні і діє антисептично під час промивань, обробки ран і виразок [1]. Науковці активно працюють над виведенням нових сортів калини та досліджують вміст різних класів біологічно активних речовин (БАР) цих сортів [1–3]. Численними експериментальними дослідженнями отримано дані щодо протизапальної [4], антиоксидантної [5; 17], протимікробної [5; 6; 13; 15], цукрознижувальної [7; 8; 10; 14; 16], протипухлинної [4; 6–8; 9; 11; 12] та інших видів активності вилучень чи екстрактів, отримуваних із різних частин рослини. Біологічну активність вилучень/екстрактів пов'язують із вмістом біологічно активних речовин вторинного синтезу, зокрема флавоноїдів, гідроксикоричних і фенольних кислот, поліфенолів/танінів [4–16]. В умовах лісостепової зони калина звичайна зростає розсіяно, не утворюючи заростей. Разом із тим її часто культивують, що створює передумови для отримання достатніх об'ємів сировини [26].

Численні дослідження складу [1–3; 17–23], фармакологічної активності [4–16], способів отримання вилучень БАР і методів екстрагування різних частин *Viburnum opulus* залишаються недостатніми для запровадження нормативного регулювання якості листя калини звичайної – Державна фармакопея України (ДФУ) не містить жодної інформації щодо їхньої стандартизації. Ймовірно, що це зумовлено недостатнім рівнем доказовості результатів експериментальних досліджень листя і квіток калини звичайної і як наслідок – відсутність промислового виробництва готових лікарських засобів на їхній основі. Разом з цим ДФУ [24; 25] містить національний варіант монографій «Калини кора^N» і «Калини плоди^N». Калини кору ідентифікують за присутністю катехіну і кількісно стандартизують за вмістом танінів (не менше 1,5% у перерахунку на пірогалол і суху сировину) [24]. Калини плоди ідентифікують за присутністю у ТШХ-профілі гідроксикоричних кислот – хлорогенової і розмаринової, хоча про виявлення останньої немає докonalних підтверджень в оглянутій літературі, за винятком одного повідомлення [22]. Кількісним показником якості плодів калини визначено в ДФУ [25] вміст протіанідинів (не менше 0,2% у перерахунку на ціанідину хлорид і суху сировину) і вміст органічних кислот (не менше 7% у перерахунку на лимонну кислоту і суху сировину).

Флавоноїди калини звичайної листя залишаються обмежено дослідженими [18; 27]. Вони представлені переважно глікозидними формами флавонолів кверцетину і кемпферолу [18]: гіперозидом (кверцетину-3-О-галактозид), кверцитрином (кверцетину-3-О-рамнозид), астрагаліном (кемпферолу-3-О-глюкозид) та 3,7-диглюкозидами кверцетину і кемпферолу; кверцетин, рутин, кемпферол, мірицетин, лутеолін,

апігенін і хризин [27]. Гідроксикоричні кислоти представлені похідними о-дигідроксикоричної кислоти, хлорогеновою, неохлорогеновою і кофейною [18]; хлорогеновою, кофейною, п-кумаровою, о-кумаровою, феруловою і транс-коричною [27]. Таким чином, зважаючи на широкий спектр активності БАР різних частин калини звичайної, дослідження флавоноїдів і гідроксикоричних кислот та стандартизація листя калини звичайної є актуальним завданням.

Мета роботи – дослідження флавоноїдів і гідроксикоричних кислот калини звичайної листя і напрацювання методик для його стандартизації.

Матеріали і методи. Матеріалом для дослідження були 4 зразки листя калини звичайної, зібраного у період цвітіння на території Тернопільської (1–2 зразок), Львівської (3 зразок) та Волинської (4 зразок). З подрібненої повітряно-сухої сировини отримували метанольні (для ідентифікації флавоноїдів та гідроксикоричних кислот) і водно-етанольні (для кількісного визначення флавоноїдів) вилучення шляхом нагрівання з метанолом або етанолом під зворотним холодильником на киплячій водяній бані.

У роботі застосовували метанол «чда», етанол «чда», мурашину кислоту безводну «чда», етилацетат і алюмінію хлорид гексагідрат кваліфікації чистоти «ч», аміноетиловий ефір дифенілборної кислоти (Sigma-Aldrich) і стандартні зразки рутину, гіперозиду, кверцетину, хлорогенової і кофейної кислот (Sigma-Aldrich).

Ідентифікацію флавоноїдів та гідроксикоричних кислот здійснювали методом вискооефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) з використанням хроматографічних пластинок Silica gel 60 F₂₅₄ (2–10 мкм, “Merck”), хроматографічної системи з автоматизованим нанесенням проб і пристрою для обробки хроматограм та УФ-камери для їх перегляду (“CAMAG”). Кількісний вміст флавоноїдів визначали спектрофотометричним методом, електронні спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі Lambda 25 UV/Vis (“PerkinElmer”).

Результати й обговорення.

Хроматографічні профілі флавоноїдів і гідроксикоричних кислот – речовин, склад і вміст яких є характеристичним для кожного виду сировини, дозволяють однозначно ідентифікувати сировину. Згідно з вимогами ДФУ для ідентифікації лікарської рослинної сировини (ЛРС) застосовують метод ТШХ (ідентифікація С). У зв'язку з цим було вирішено застосувати цей метод аналізу для дослідження складу флавоноїдів і гідроксикоричних кислот та розробки методики ідентифікації калини звичайної листя.

Початковим етапом роботи було напрацювання умов пробопідготовки. Для вилучення БАР з досліджуваної сировини було вибрано метанол в якості екстрагента. Цей полярний розчинник дозволяє швидко і практично вичерпно вилучати дані БАР, а отримуване вилучення є зручним для нанесення на ТШХ пластинку й отримання гарної якості хроматографічних треків. Вилучення проводили під час нагрівання на киплячій водяній бані під зворотним

холодильником впродовж 30 хв. Такі умови були достатніми для отримання відтворюваних за складом вилучень, що забезпечувало відтворюваність зон БАР у хроматографічних треках. Сама процедура нагрівання не приводила, як показали отримані результати, до втрати/деградації БАР – не спостерігалось виникнення/появи у треках агліконових форм флавоноїдів. Для отримання якісних треків було підібрано також наважку сировини та об'єм проб для нанесення, що забезпечувало чітке розділення зон досліджуваних речовин.

Хроматографування метанольних витягів і виявлення досліджуваних БАР було здійснено у різних системах розчинників. Оптимальним для розділення виявилось поєднання кислоти мурашиної безводної з водою і етилацетатом у співвідношенні (6:9:90), яке дало змогу отримати чітке розділення зон основних БАР. Відповідний хроматографічний профіль наведено на рисунку 1.

Отриманий хроматографічний профіль випробовуваного розчину свідчить про різноманітність

флавоноїдного складу досліджуваної сировини. Спостерігається наявність трьох зон жовто-оранжевої флуоресценції, а саме двох дуже інтенсивних ($R_f=0,37$ і $R_f=0,46$) і однієї середньої інтенсивності ($R_f=0,22$). Остання перебуває у треці випробовуваного розчину на рівні зони гіперозиду на хроматограмі розчину порівняння, завдяки чому можна ідентифікувати у досліджуваній сировині гіперозид. Одна із двох інтенсивних зон жовто-оранжевої флуоресценції є кверцитрином ($R_f=0,46$) [28]. Це впливає із даних літератури щодо присутності цієї БАР у сировині і зважаючи на забарвлення флуоресценції – жовто-оранжеве, яке характерне для агліконів кверцетину і лютеоліну та їхнім глікозидам [28]. Три зони салатово-зеленої флуоресценції середньої інтенсивності з R_f 0,25, 0,30 і 0,53 є, скоріш за все, глікозидними формами кемпферолу. Про це свідчить забарвлення флуоресценції та дані щодо присутності глікозидних форм кемпферолу за даними літератури [18; 27; 29]. Кемпферол і його глікозиди з реактивом дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру утворюють

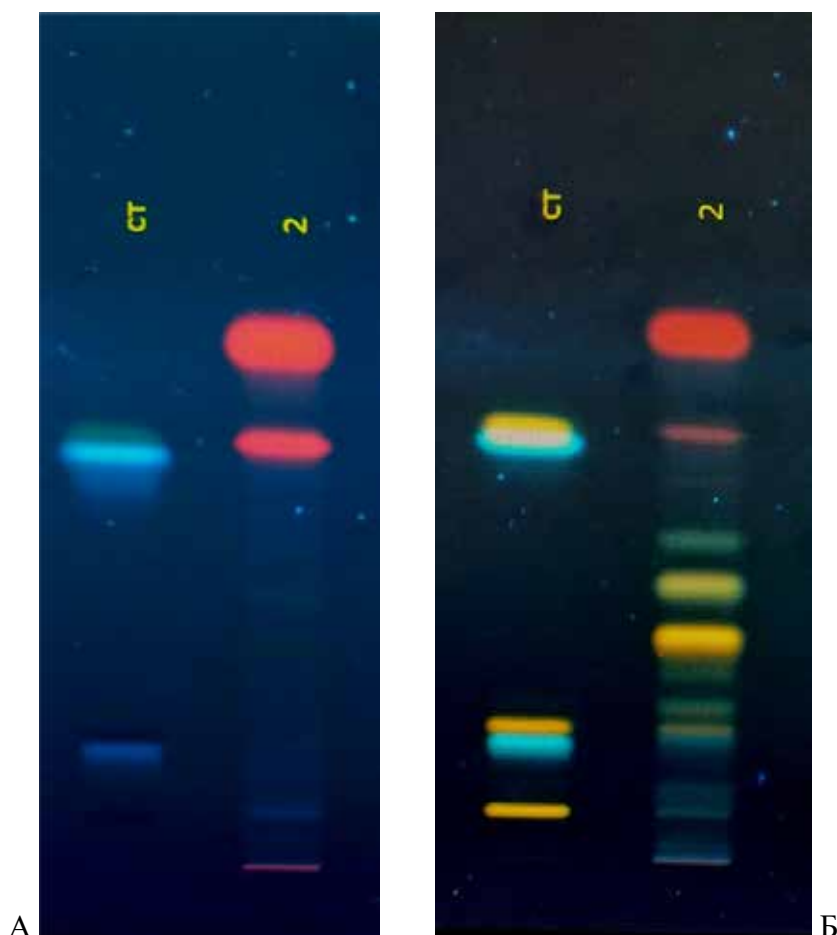


Рис. 1. Фотографії хроматограми, отриманої в умовах дослідження фенольних сполук калини звичайної листя: А – перегляд в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм; Б – перегляд в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм після попередньої обробки розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру у метанолі.

Треки: ст – розчину порівняння: рутин, кислота хлорогенова, гіперозид, кислота кофейна, кверцетин (знизу догори у треці); 2 – метанольного витягу з висушеної сировини калини звичайної листя

сполуку із характерною салатово-зеленою флуоресценцією в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм [29]. Таким чином, флавоноїди листя *Viburnum opulus* за результатами дослідження представлені гіперозидом, кверцитрином, кемпферол-3-О-глюкозидом та трьома неідентифікованими глікозидними формами (очевидно, кверцетину і кемпферолу).

Гідроксикоричні кислоти значно менше представлені у досліджуваній сировині. Їм у хроматографічному профілі, за таких умов дослідження, відповідає одна зона блакитної флуоресценції, яка розташовується на рівні зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння. Це дозволяє її ідентифікувати як кислоту хлорогенову.

У верхній частині хроматограми (рис. 1) до та після проявлення спостерігаються дві інтенсивні зони червоної флуоресценції, які відповідають, виходячи із забарвлення зон, хлорофілам.

Таким чином, ідентифікаційними маркерами сировини калини звичайної листя є присутність у хроматографічному профілі кислоти хлорогенової, гіперозиду (кверцетин-3-О-галактозид), квецитрину (кверцетин-3-рамнозид) і астрагаліну (кемпферол-3-О-глюкозид). Методику ідентифікації й ідентифікаційні критерії було запропоновано у наступній редакції для стандартизації калини звичайної листя.

Методика ВЕТШХ-ідентифікації ЛРС калини звичайної листя.

Випробовуваний розчин: 0,1 г порошку подрібненого листя калини звичайної поміщають у конічну колбу місткістю 50 мл, додають 25 мл метанолу *P* і нагрівають на киплячій водяній бані під зворотним холодильником впродовж 30 хв; охолоджують і фільтрують через шприцевий фільтр PTFE 0,45 мкм у віалу.

Розчин порівняння: по 0,5 мг СЗ кислоти хлорогенової і кофейної та кверцетину і по 1 мг СЗ рутину і гіперозиду поміщають у мірну колбу місткістю 5 мл, додають 3 мл метанолу *P*. Колбу поміщають в УЗ-баню на 3 хв за температури 25°C. Доводять об'єм розчину метанолом *P* до позначки і перемішують.

Пластика: ТШХ пластика із шаром силікагелю *P* (2–10 мкм).

Рухома фаза: мурашина кислота безводна *P* – вода *P* – етилацетат *P* (6:9:90).

Об'єм проб: 5 мкл випробовуваного розчину і 3 мкл розчину порівняння смугами 8 мм.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 6,2 см від лінії старту (лінія старту відзначена на відстані 8 мм від нижнього краю пластинки).

Висушування: в потоці холодного повітря протягом 10 хв; потім за температури 100°C протягом 2 хв.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру у метанолі *P* і через 30 хв переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі розчину порівняння мають виявлятися 5 зон знизу догори: рутину, кислоти хлорогенової, гіперозиду, кислоти кофейної і кверцетину відповідно жовто-оранжевої (для

флавоноїдів) і блакитної (для гідроксикоричних кислот) флуоресценції. На хроматограмі випробовуваного розчину мають виявлятися:

- зона блакитної флуоресценції з R_f 0,19 на рівні зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння;

- зона жовто-оранжевої флуоресценції середньої інтенсивності з R_f 0,22 (гіперозид);

- дві інтенсивні зони жовто-оранжевої флуоресценції (флавоноїди) з R_f 0,37 і 0,46;

- три середньої інтенсивності зони салатово-зеленої флуоресценції (флавоноїди) з R_f 0,25, 0,30 і 0,53.

Можлива наявність інших зон слабкої інтенсивності жовто-оранжевої, блакитної і синьої флуоресценції.

Першим етапом роботи з кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів було обрання екстрагента для їхнього вилучення. Було вирішено випробувати для цього розчини із різним вмістом етанолу 40, 50, 60 і 70% (об/об). Такий діапазон вмісту етанолу був обраний, виходячи з міркувань розчинності глікозидних форм флавоноїдів – їхня розчинність вища у етанольно-водних розчинах порівняно з етанолом. В останньому краще розчинними є аглікони флавоноїдів, які порівняно із глікозидними формами є менш полярними і менш гідрофільними.

В абсорбційних електронних спектрах світлопоглинання випробовуваних розчинів етанольно-водних вилучень з калини звичайної листя, зареєстрованих в умовах кількісного визначення флавоноїдів, спостерігали смугу, характерну поглинанню комплексу флавоноїдів з алюмінію хлоридом, за довжини хвилі 403 ± 2 нм (рис. 2). За тих же умов визначення і запису абсорбційних електронних спектрів абсорбційний максимум комплексу рутину з алюмінію хлоридом знаходиться за довжини хвилі 417 ± 2 нм (рис. 3).

Порівняння отриманих спектрів випробовуваних розчинів калини звичайної листя і розчину рутину, в умовах комплексоутворення з алюмінію хлоридом, свідчить про те, що максимуми поглинання знаходяться достатньо віддалено і тому кількісний вміст флавоноїдів раціонально розраховувати у перерахунку на іншого представника цього класу сполук, а саме на лютеолін. В абсорбційному електронному спектрі лютеоліну, записаному за умов кількісного визначення флавоноїдів, спостерігається батохромне зміщення максимуму поглинання з 355 нм до 400 ± 2 нм внаслідок комплексоутворення з алюмінію хлоридом [30]. Таким чином, на основі близькості розташування максимумів поглинання випробовуваних розчинів вилучених флавоноїдів калини звичайної листя і лютеоліну, в умовах комплексоутворення з алюмінію хлоридом, можливим є застосування лютеоліну як стандартної речовини для перерахунку кількісного вмісту суми флавоноїдів у досліджуваному виді ЛРС. У роботі [30] зазначено значення питомого показника поглинання комплексу лютеоліну

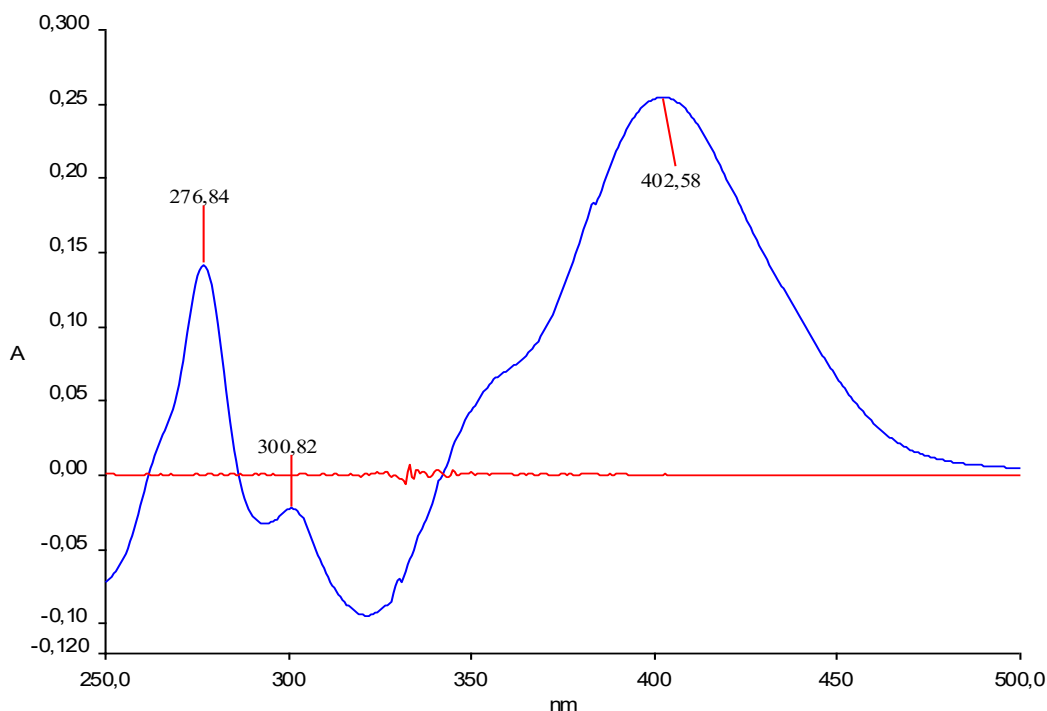


Рис. 2. Електронний спектр поглинання випробовуваного розчину, отриманий за умов кількісного визначення флавоноїдів у витяжці з калини звичайної листя (екстрагент – етанол (40 %, об/об))

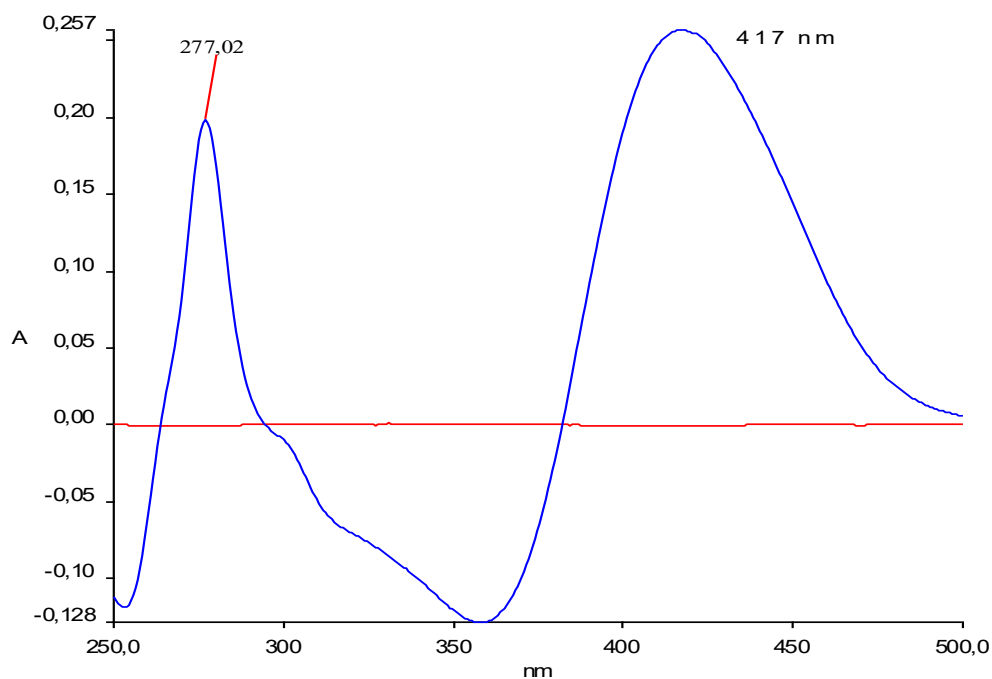


Рис. 3. Електронний спектр поглинання рутину в умовах комплексоутворення з алюмінію хлоридом (компенсаційний розчин – розчин рутину без алюмінію хлориду)

з алюмінію хлоридом $E_{1\text{CM}}^{1\%} = 549$, що дозволило запропонувати розрахунок вмісту флавоноїдів методом питомих показників.

Результати дослідження вилучення флавоноїдів з калини звичайної листя залежно від вмісту етанолу в екстрагенті наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Вплив концентрації етанолу в екстрагенті на вилучення флавоноїдів калини звичайної листя

Вміст етанолу в екстрагенті, % (об/об)	Вміст флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін, %
40	0,38 ± 0,03
50	0,44 ± 0,02
60	0,54 ± 0,02
70	0,55 ± 0,03

Як випливає з наведених результатів, зі зростанням вмісту етанолу від 40 до 60% вилучення флавоноїдів із сировини підвищується і не змінюється у разі підвищення концентрації етанолу до 70%. Таким чином, вилучення флавоноїдів з калини звичайної листя необхідно здійснювати із застосуванням 60% етанолу (об/об) як екстрагенту.

Підбирання умов пробопідготовки дозволило запропонувати наступну методику кількісного визначення, яку можна застосовувати для стандартизації калини звичайної листя.

Спектрофотометрична методика кількісного визначення флавоноїдів калини звичайної листя.

Вихідний розчин. 0,8 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали в колбу зі шліфом місткістю 100 мл, додавали 60 мл етанолу (60%, об/об) і нагрівали на киплячій водяній бані під зворотним холодильником впродовж 30 хв. Після цього колбу охолоджували до кімнатної температури, отримане вилучення переносили у мірну колбу місткістю 100 мл, залишаючи сировину у конічній колбі. Вилучення флавоноїдів повторювали ще двічі, використовуючи щоразу по 15 мл того ж екстрагента та долуcaючи отримані вилучення у ту ж мірну колбу. Колбу із сировиною промивали цим же екстрагентом, доводячи об'єм вилучення у ній до позначки. Вміст мірної колби перемішували. Отримане вилучення фільтрували в мірну колбу місткістю 100 мл через паперовий фільтр «синя стрічка», відкидаючи перші 10 мл фільтрату.

Випробовуваний розчин. 5,0 мл вихідного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл, додавали 2 мл 3% розчину алюмінію хлориду в етанолі (70%, об/об) і доводили об'єм розчину до позначки етанолом (70%, об/об).

Компенсаційний розчин. 5,0 мл вихідного розчину поміщали у мірну колбу місткістю 25 мл і доводили об'єм розчину до позначки етанолом (70%, об/об).

Через 30 хв виміряли абсорбцію випробовуваного розчину стосовно компенсаційного розчину за довжини хвилі 400 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін і суху сировину у відсотках розраховували за формулою:

$$X = \frac{5 \cdot A_x \cdot 100 \cdot 100}{549 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де: A_x – абсорбція випробовуваного розчину;

m – маса наважки сировини, взятої для аналізу, г;

549 – питомий показник поглинання комплексу лютеоліну з алюмінію хлоридом за довжини хвилі 400 нм;

W – втрата в масі під час висушування сировини, %.

Запропонована методика була застосована для аналізу чотирьох досліджуваних зразків калини звичайної листя, зібраних у різних регіонах (табл. 2).

Таблиця 2

Кількісний вміст флавоноїдів у калині звичайної листя

Зразок	Вміст флавоноїдів, у перерахунку на лютеолін, %
№ 1 Тернопільська область	0,74 ± 0,02
№ 2 Тернопільська область	0,68 ± 0,01
№ 3 Львівська область	0,54 ± 0,01
№ 4 Волинська область	0,47 ± 0,02

На основі аналізу даних наукової літератури визначено, що результати досліджень різняться між собою; це зумовлено різними умовами зростання і віком самих рослин. Авторами [23] повідомлено про вміст флавоноїдів у вилученнях, які отримували екстракцією листя хлороформом, етилацетатом, метанолом і водою в екстракторі Сокслета, становив відповідно: 0,12; 0,13; 0,10 і 0,06 мг/г у перерахунку на кверцетин. Ці значення набагато нижчі визначених для вітчизняних зразків калини звичайної листя. Відмінності можна пов'язати з іншими умовами підготовки вилучення і з різними умовами зростання. Дослідниками [27] встановлено, що склад гідроксикоричних кислот і флавоноїдів є однотипним для дикорослих і культивованих представників *Viburnum opulus*, тоді як вміст окремих сполук, і, зокрема, сумарний вміст флавоноїдів у листі дещо відрізняється – 10,62 і 10,10 мг/г (у перерахунку на катехін) відповідно. Слід зазначити, що відмінність значень вмісту для досліджуваних зразків, отриманих деякими авторами [23] і [27], може бути пов'язана із застосуванням різних умов пробопідготовки, відмінності умов отримання різних фотометрованих сполук для кінцевого спектрофотометричного вимірювання, різних стандартних сполук, використаних для перерахунку. Таким чином, є гостра необхідність застосування однотипних методик і стандартних речовин для розрахунку вмісту флавоноїдів, аби мати змогу порівнювати отримані значення для зразків сировини з різних регіонів, стандартизувати їх і отримувати репрезентативні за складом і вмістом вилучення для подальших досліджень їхньої біологічної активності і створення нових ЛЗ.

Дослідженої у роботі кількості зразків недостатньо для висунення кількісного критерію якості сировини – потрібно проаналізувати зразки з різних регіонів заготівлі. Дослідженнями [27] було продемонстровано, що наявний значний вплив як температури, так і місця вирощування рослини на вміст фенольних сполук *Viburnum opulus* – флавоноїдів і гідроксикоричних кислот. Немає даних літератури щодо залежності

вмісту флавоноїдів від вегетаційного періоду і чітких вказівок термінів заготівлі сировини. Разом із тим високий вміст флавоноїдів, їхнє різноманіття та різностороння біологічна активність БАР різних частин *Viburnum opulus* [1–18] є підставою для продовження ґрунтовного вивчення калини звичайної листя як потенційної лікарської рослинної сировини.

Висновки. 1. Використовуючи метод ВЕТШХ, у досліджуваних зразках калини звичайної листя було ідентифіковано кислоту хлорогенову, гіперозид і кверцитрин.

2. Запропоновано ВЕТШХ-методику ідентифікації калини листя; ідентифікаційними маркерами

обрано кислоту хлорогенову, гіперозид, кверцитрин і чотири неідентифіковані флавоноїди – глікозидні форми кверцетину і кемпферолу. Їхнє розташування на хроматограмах вказане в описі хроматографічного профілю.

3. Здійснено спектрофотометричне визначення флавоноїдів у чотирьох зразках досліджуваної сировини. Вміст суми флавоноїдів становить 0,47–0,74% (у перерахунку на лутеолін і суху сировину).

4. Для напрацювання кількісного критерію якості калини звичайної листя запропоновано здійснювати його стандартизацію шляхом спектрофотометричного визначення вмісту суми флавоноїдів.

COMMON SNOWBALL – A MEDICINAL PLANT WITH SIGNIFICANT RESOURCE POTENTIAL: STUDY OF PHENOLIC COMPOUNDS OF ITS LEAVES AND DEVELOPMENT OF METHODS FOR THEIR STANDARDIZATION

I. Z. Kernychna, L. V. Vronska, A. Ye. Demyd, M. I. Shanaida

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine

The present study **aimed** to investigate the flavonoids and hydroxycinnamic acids present in the leaves of the common snowball (*Viburnum opulus* L.) and develop methods for their standardization.

Materials and Methods. Four samples of common snowball leaves collected during the flowering period from three locations – Ternopil (first and second samples), Lviv (third sample), and Volyn (fourth sample) – were used for the analysis. Methanol extracts from the leaves were obtained for the identification of raw materials, while ethanol extracts were used for the quantitative determination of flavonoids. High-performance thin-layer chromatography (HPTLC) was employed to identify phenolic compounds, and spectrophotometry was utilized to quantitatively determine the total content of flavonoids.

Results and Discussion. The HPTLC study identified chlorogenic acid, hyperoside, and quercitrin in the leaves of common snowball. Additionally, four unidentified flavonoids – glycoside forms of quercetin and kaempferol – were observed in the chromatographic profiles of all samples. The presence of these seven compounds in the chromatographic profile suggests their potential as identification markers for the *Viburnum opulus* leaves. In the electronic absorption spectra of the tested flavonoid solutions, maximum absorption was noted at a wavelength of 403 ± 2 nm when complexed with aluminum chloride. This led to the choice of luteolin as a standard substance for calculating the total flavonoid content, as its complex with aluminum chloride exhibits maximum absorption at a wavelength of 400 ± 2 nm. The total flavonoid content in the four samples ranged from 0.47% to 0.74%, calculated based on luteolin and the dry raw material. The high content and diversity of flavonoids, along with the versatile biological activities of the identified compounds, highlight the significant potential for further research on common snowball leaves as a potential medicinal raw material.

Conclusions. An HPTLC method was proposed for identifying common snowball leaves. Chlorogenic acid, hyperoside, quercitrin, and four unidentified flavonoids were selected as identification markers for the studied raw material. To develop a quantitative quality criterion, it is recommended to conduct a spectrophotometric determination of the total flavonoid content.

Key words: *Viburnum opulus*; resource value; leaves; flavonoids; hydroxycinnamic acids; HPTLC; spectrophotometry; standardization.

Перелік бібліографічних посилань

1. Kajszyk D., Zakłós-Szyda M., Podsek A. *Viburnum opulus* L. A Review of Phytochemistry and Biological Effects. *Nutrients*. 2020. Vol. 12, № 11. P. 3398.
2. Velioglu Y.S., Ekici L., Poyrazoglu E.S. Phenolic composition of European cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) berries and astringency removal of its commercial juice. *International Journal of Food Science and Technology*. 2006. Vol. 41, № 9. P. 1011–1015.
3. Ersoy N., Ercisli S., Gundogdu M. Evaluation of European Cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) genotypes for agro-morphological, biochemical and bioactive characteristics in Turkey. *Folia Horticulturae. Sciend.* 2017. Vol. 29, № 2. P. 181–188.
4. Fruits of new selection forms and varieties of snowball tree for manufacture of products of therapeutic and prophylactic purpose / T.Z. Moskalets et al. *Regul. Mech. Biosyst.* 2019. Vol. 10, № 4. P. 432–437.
5. Sagdic O., Aksoy A., Ozkan G. Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of cranberry (gilaburu, *Viburnum opulus* L.) fruit extract. *Acta Aliment.* 2006. Iss. 35. P. 487–492.

6. Ucar T.A., Yildirim A.B., Karakas F.P. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2012. Iss. 26. P. 2765–2772.
7. Viburnum opulus fruit phenolic compounds as cytoprotective agents able to decrease free fatty acids and glucose uptake by Caco-2 cells / M. Zakłós-Szyda et al. *Antioxidants*. 2019. Iss. 8. P. 262.
8. Evaluation of Viburnum opulus L. Fruit phenolics cytoprotective potential on insulinoma MIN6 cells relevant for diabetes mellitus and obesity / M. Zakłós-Szyda et al. *Antioxidants*. 2020. Iss. 9. P. 433.
9. Effects of Viburnum opulus fruit extracts on adipogenesis of 3T3-L1 cells and lipase activity / A. Podśedek et al. *J. Funct. Foods*. 2020. Iss. 73. P. 104111.
10. Viburnum populus L. juice phenolics inhibit mouse 3T3-L1 cells adipogenesis and pancreatic lipase activity / M. Zakłós-Szyda et al. *Nutrients*. 2020. Iss. 12. P. 2003.
11. Viburnum populus L. juice phenolic compounds influence osteogenic differentiation in human osteosarcoma Saos-2 cells / M. Zakłós-Szyda et al. *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Iss. 21. P. 4909.
12. Koprak A. T. In vitro evaluation of gilaburu (Viburnum opulus L.) juice on different cell lines. *Anadolu J. Educ. Sci. Int.* 2019. Iss. 9. P. 549–571.
13. Turker H., Yildirim A.B. Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: A possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2015. Vol. 29, № 2. P. 281–288.
14. Antidiabetic effect of polyphenolic extracts from selected edible plants as α -amylase, α -glucosidase and PTP1B inhibitors, and β -pancreatic cells cytoprotective agents – a comparative study / M. Zakłós-Szyda et al. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015. Iss. 15. P. 2431–2444.
15. An In Vitro Study of the Effect of Viburnum opulus Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections / U. Wójcik-Bojek et al. *Molecules*. 2021. Vol. 26, № 6. P. 1758.
16. In Vitro Inhibitory Effects of Viburnum opulus Bark and Flower Extracts on Digestion of Potato Starch and Carbohydrate Hydrolases Activity / D. Kajszczak et al. *Molecules*. 2022. Vol. 27, № 10. P. 3118.
17. Polka D., Podśedek A., Koziolkiewicz M. Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Fruit, Flower and Bark of Viburnum opulus. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2019. Iss. 74. P. 436–442.
18. Wpływ ekstraktów z liści kaliny koralowej (Viburnum opulus L.) na wzrost ludzkich komórek jelita / K. Chojnacka et al. *Post Fitoter.* 2019. Iss. 20. P. 10–17.
19. Antioxidant components of Viburnum opulus L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods / A.A. Karaçelik et al. *Food Chem.* 2015. Iss. 175. P. 106–114.
20. Alifakı Y.Ö., Şakiyan Ö., İsci A. Extraction of phenolic compounds from cranberrybush (Viburnum opulus L.) fruit using ultrasound, microwave, and ultrasound-microwave combination methods. *Food Measure*. 2022. Iss.16. P. 4009–4024.
21. Valorization of European Cranberry Bush (Viburnum opulus L.) Berry Pomace Extracts Isolated with Pressurized Ethanol and Water by Assessing Their Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antiproliferative Activities / L. Dienaitė et al. *Foods*. 2020. Vol. 9, № 10. P. 1413.
22. Yurkiv K., Grytsyk A. HPLC-analysis of phenolic compounds of European cranberry bush fruits (Viburnum opulus L.). *The Pharma Innovation Journal*. 2017. Vol. 6, № 12. P. 526–529.
23. Düz M., Korcan S.E., Akkuş G.U. Determination of Total Phenolic, Flavonoid Content and Antimicrobial Properties in Different Solvent Extracts of Viburnum opulus L. (Gilaburu) in Afyonkarahisar. *Pakistan J of Anal. and Environm. Chem.* 2021. Vol. 22, № 2. P. 388–395.
24. Калини кора^Н. Державна фармакопея України. 2-е вид., Доп. 1. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. С. 167–168.
25. Калини плоди^Н. Державна фармакопея України. 2-е вид., Доп. 4. Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2020. С. 431–432.
26. Мінарченко В.М. Лікарські судинні рослини України (медичне та ресурсне значення). Київ : Фітосоціоцентр, 2005. 323 с.
27. Flavonoids and Phenolic Acids Content in Cultivation and Wild Collection of European Cranberry Bush Viburnum opulus L / S. Goławska et al. *Molecules*. 2023. Vol. 28, № 5. P. 2285.
28. Vronska L.V., Chubka M.B., Demyd A.Y. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots. *Pharmaceutical Review*. 2015. Iss. 3. P. 28–33.
29. Вронська Л.В., Демид А.Є. Хроматографічні профілі флавоноїдів і гідроксикоричних кислот вітчизняних зразків лікарської рослинної сировини листя шовковиці білої. *Фармацевтичний часопис*. 2019. № 2. С. 5–15.
30. Єзерська О.І., Калинюк Т.Г., Вронська Л.В. Визначення вмісту суми флавоноїдів в екстрактах приймочок зі стовпчиками кукурудзи. *Фармацевтичний часопис*. 2011. № 3. С. 63–68.

References

1. Kajszczak D, Zakłós-Szyda M, Podśedek A. Viburnum opulus L. A Review of Phytochemistry and Biological Effects. *Nutrients*. 2020;12(11):3398. DOI: 10.3390/nu12113398
2. Velioglu YS, Ekici L, Poyrazoglu ES. Phenolic composition of European cranberrybush (Viburnum opulus L.) berries and astringency removal of its commercial juice. *International Journal of Food Science and Technology*. 2006;41(9):1011–5. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2006.01142.x
3. Ersoy N, Ercisli S, Gundogdu M. Evaluation of European Cranberrybush (Viburnum opulus L.) genotypes for agro-morphological, biochemical and bioactive characteristics in Turkey. *Folia Horticulturae. Sciendo*. 2017;29(2):181–8. <https://doi.org/10.1515/fhort-2017-0017>
4. Moskalets TZ, Moskalets VV, Vovkohon AH, Knyazyuk OV. Fruits of new selection forms and varieties of snowball tree for manufacture of products of therapeutic and prophylactic purpose. *Regul. Mech. Biosyst.* 2019;10(4):432–7. DOI: 10.15421/021964
5. Sagdic O, Aksoy A, Ozkan G. Evaluation of the antibacterial and antioxidant potentials of cranberry (gilaburu, Viburnum opulus L.) fruit extract. *Acta Aliment.* 2006;35:487–92. DOI: 10.1556/aalim.35.2006.4.12
6. Ucar TA, Yildirim AB, Karakas FP. Antibacterial and antitumor activities of some wild fruits grown in Turkey. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* 2012;26:2765–72.
7. Zakłós-Szyda M, Pawlik N, Polka D, Nowak A, Koziolkiewicz M, Podśedek A. Viburnum opulus fruit phenolic compounds as cytoprotective agents able to decrease free

- fatty acids and glucose uptake by Caco-2 cells. *Antioxidants*. 2019;8:262. <https://doi.org/10.3390/antiox8080262>
8. Zakłós-Szyda M, Kowalska-Baron A, Pietrzyk N, Drzazga A. Evaluation of *Viburnum opulus* L. Fruit phenolics cytoprotective potential on insulinoma MIN6 cells relevant for diabetes mellitus and obesity. *Antioxidants*. 2020;9:433. <https://doi.org/10.3390/antiox9050433>
 9. Podsędek A, Zakłós-Szyda M, Polka D, Sosnowska D. Effects of *Viburnum opulus* fruit extracts on adipogenesis of 3T3-L1 cells and lipase activity. *J. Funct. Foods*. 2020;73:104111.
 10. Zakłós-Szyda M, Pietrzyk N, Szustak M, Podsędek A. *Viburnum populus* L. juice phenolics inhibit mouse 3T3-L1 cells adipogenesis and pancreatic lipase activity. *Nutrients*. 2020;12:2003.
 11. Zakłós-Szyda M, Nowak A, Pietrzyk N, Podsędek A. *Viburnum populus* L. juice phenolic compounds influence osteogenic differentiation in human osteosarcoma Saos-2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21:4909.
 12. Koprak AT. In vitro evaluation of gilaburu (*Viburnum opulus* L.) juice on different cell lines. *Anadolu J. Educ. Sci. Int.* 2019;9:549–71.
 13. Turker H, Yıldırım AB. Screening for antibacterial activity of some Turkish plants against fish pathogens: A possible alternative in the treatment of bacterial infections. *Biotechnol. Equip.* 2015;29(2):281–8. DOI: 10.1080/13102818.2015.1006445
 14. Zakłós-Szyda M, Majewska I, Redzynia M, Koziolkiewicz M. Antidiabetic effect of polyphenolic extracts from selected edible plants as α -amylase, α -glucosidase and PTP1B inhibitors, and β -pancreatic cells cytoprotective agents – a comparative study. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015;15:2431–44.
 15. Wójcik-Bojek U, Rywaniak J, Bernat P, Podsędek A, Kajszyk D, Sadowska B. An In Vitro Study of the Effect of *Viburnum opulus* Extracts on Key Processes in the Development of Staphylococcal Infections. *Molecules*. 2021;26(6):1758. DOI: 10.3390/molecules26061758
 16. Kajszyk D, Kowalska-Baron A, Sosnowska D, Podsędek A. In Vitro Inhibitory Effects of *Viburnum opulus* Bark and Flower Extracts on Digestion of Potato Starch and Carbohydrate Hydrolases Activity. *Molecules*. 2022;27(10):3118. DOI: 10.3390/molecules27103118
 17. Polka D, Podsędek A, Koziolkiewicz M. Comparison of Chemical Composition and Antioxidant Capacity of Fruit, Flower and Bark of *Viburnum opulus*. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2019;74:436–42. <https://doi.org/10.1007/s11130-019-00759-1>
 18. Chojnacka K, Owczarek K, Fichna J, Sosnowska D, Lewandowska U. Wpływ ekstraktów z liści kaliny koronowej (*Viburnum opulus* L.) na wzrost ludzkich komórek jelita. *Post. Fitoter.* 2019;20:10–7. DOI: 10.25121/PF.2019.20.1.10
 19. Karaçelik AA, Küçük M, İskefiyeli Z, Aydemir S, De Smet S, Miserez B, Sandra P. Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods. *Food Chem.* 2015;175:106–14. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.11.085
 20. Alifakı YÖ, Şakıyan Ö, İsci A. Extraction of phenolic compounds from cranberrybush (*Viburnum opulus* L.) fruit using ultrasound, microwave, and ultrasound-microwave combination methods. *Food Measure*. 2022;16:4009–24. DOI: 10.1007/s11694-022-01498-9
 21. Dienaitė L, Pukalskienė M, Pereira CV, Matias AA, Ven-skutonis PR. Valorization of European Cranberry Bush (*Viburnum opulus* L.) Berry Pomace Extracts Isolated with Pressurized Ethanol and Water by Assessing Their Phytochemical Composition, Antioxidant, and Antiproliferative Activities. *Foods*. 2020;9(10):1413. DOI: 10.3390/foods9101413
 22. Yurkiv K, Grytsyk A. HPLC-analysis of phenolic compounds of European cranberry bush fruits (*Viburnum opulus* L.). *The Pharma Innovation Journal*. 2017;6(12):526–9.
 23. Düz M, Korcan SE, Akkuş GU. Determination of Total Phenolic, Flavonoid Content and Antimicrobial Properties in Different Solvent Extracts of *Viburnum opulus* L. (Gilaburu) in Afyonkarahisar. *Pakistan J of Anal and Environ Chem*. 2021;22(2): 388–95. DOI: 10.21743/pjaec/2021.12.17.
 24. *Viburnum opuli cortex*^N. In: SPhU; 2016. Accessed January 9, 2025. P. 167–168.
 25. *Viburnum opuli fructus*^N. In: SPhU; 2020. Accessed January 9, 2025. P. 431–432.
 26. Minarchenko VM. [Medicinal vascular plants of Ukraine (medical and resource value)]. Kyiv: Fitosotsiotsentr; 2005. 323 p.
 27. Goławska S, Łukasik I, Chojnacki AA, Chrzanowski G. Flavonoids and Phenolic Acids Content in Cultivation and Wild Collection of European Cranberry Bush *Viburnum opulus* L. *Molecules*. 2023;28(5):2285. DOI: 10.3390/molecules28052285
 28. Vronska LV, Chubka MB, Demyd AY. Development of phenolic compounds chromatographic identification in bilberry shoots. *Pharmaceutical Review*. 2015;3:28–33. DOI: 10.11603/2312-0967.2015.3.4951
 29. Vronska LV, Demyd AY. Flavonoids and hydroxycinnamic acids chromatographic profiles of domestic raw materials samples of Mulberry White leaves. *Pharmaceutical Review*. 2019;2:5–15. DOI: 10.11603/2312-0967.2019.2.10269
 30. Yezerska OI, Kalynyuk TG, Vronska LV. The sum flavonoids determination in Zeae Maydis styli cum stigmatidis extracts. *Pharmaceutical Review*. 2011;3:63–8. DOI: 10.11603/2312-0967.2011.3.2724

Відомості про авторів

Кернична І. З. – канд. біол. наук, доцент, кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна. E-mail: kernychna@tdmu.edu.ua, ORCID <http://orcid.org/0000-0003-2318-6410>.

Вронська Л. В. – канд. хім. наук, доцент, кафедра фармації, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна. E-mail: vronska_liudmyla@ukr.net, ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7223-6966>.

Демид А. Є. – канд. хім. наук, доцент, кафедра загальної хімії, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна. E-mail: demyd@tdmu.edu.ua, ORCID: 0000-0001-8275-1307

Шанайда М. І. – доктор фармац. наук, доцент, кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна. E-mail: shanayda@tdmu.edu.ua, ORCID <http://orcid.org/0000-0003-1070-6739>.

Information about the authors

Kernychna I. Z. – PhD (Biology), Associate Professor, the Department of Pharmacognosy and Medical Botany, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine. E-mail: kernychna@tdmu.edu.ua, ORCID <http://orcid.org/0000-0003-2318-6410>.

Vronska L. V. – PhD (Chemistry), Associate Professor, the Department of Pharmacy, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine. vronska_liudmyla@ukr.net, ORCID <http://orcid.org/0000-0002-7223-6966>.

Demyd A. Ye. – PhD (Chemistry), Associate Professor, the Department of General Chemistry, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine. E-mail: demyd@tdmu.edu.ua, ORCID <http://orcid.org/0000-0001-8275-1307>.

Shanaida M. I. – DSc (Pharmacy), Associate Professor, the Department of Pharmacognosy and Medical Botany, Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ukraine. E-mail: shanayda@tdmu.edu.ua, ORCID <http://orcid.org/0000-0003-1070-6739>.