

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПЛУК У ЗБОРІ АНТИАЛЕРГІЧНОМУ МЕТОДОМ ВЕРХ

© С. С. Козачок

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: встановлено профіль фенольних сполук збору лікарських рослин з антиалергічною активністю, його інгредієнтів та відвару збору (1:10) методом ВЕРХ. У досліджених об'єктах ідентифіковано і встановлено кількісний вміст: апігеніну, лютеоліну та їх глікозидів, рутину, ізокверцитрину, галової та елагової кислот, галокатехіну, катехіну, епігалокатехіну, епікатехіну та епікатехін галату.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, флавоноїди, складові дубильних речовин, збір антиалергічний.

Вступ. Враховуючи те, що на фармацевтичному ринку України відсутні збори лікарських рослин з антиалергічною активністю, на кафедрі фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського під керівництвом д. фарм. н., проф. С. М. Марчишин розроблено антиалергічний збір, фармакологічна активність якого підтверджена скринінговими дослідженнями на базі ЦНДЛ Національного фармацевтичного університету під керівництвом д. фарм. н., проф. Л. В. Яковлевої [1].

До збору лікарських рослин для лікування і профілактики хворих з алергічними захворюваннями ми включили лікарську рослину сировину (ЛРС), яка проявляє імуностимулюючу, антигістамінну, антиоксидантну, детоксикуючу, антиексудативну, мембраностабілізуючу, капіляррозміщуючу, протимікробну, протизапальну, антикомплементарну, регенеруючу, кровоочисну, седативну та в'язучу дії [4]. Вище перелічені активності ЛРС, а, відповідно, і збору антиалергічного обумовлені наявністю у них біологічно активних речовин.

З джерел літератури відомо, що ряд флавоноїдів мають здатність інгібувати вивільнення гістаміну та Ca^{2+} АТФазу, яка регулює надходження іонів Ca^{2+} в опасисті клітини після дії на них антигена. Досліджено, що виражену антиоксидантну активність проявляють катехіни, які, взаємодіючи з вільними радикалами, нейтралізують їх. Катехіни також інгібують алергічні реакції IV типу у щурів та мишей [7, 10].

Враховуючи вищенаведене, метою нашого дослідження було встановити профіль фенольних сполук у зборі антиалергічному, відварі збору (1:10) та його інгредієнтах методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [3].

Методи дослідження. Для розділення суми фенольних сполук на окремі компоненти вико-

ристовували метод ВЕРХ. Дослідження проводили на хроматографі Agilent 1200 3 D LC System Technologies (США), який укомплектований проточним вакуумним дегазатором G1322A, чотириканальним насосом градієнта низького тиску G13111A, автосамплером G1329A, термостатом колонки G 1316A, детекторами діодноматричного G1315C та рефрактометричного G1362A.

Умови хроматографування: колонка Supelco-Discovery C_{18} розміром 250×4,6 мм із сорбентом – силікагель з діаметром зерен 5 мкм, елюенти: (А) 0,0017 моль/м³ фосфорна кислота (Sigma-Aldrich), (В) ацетонітрил (Sigma-Aldrich) для визначення флавоноїдів; (А) 0,1 % трифлуороцтова кислота, 5 % ацетонітрил, (В) 0,1 % трифлуороцтова кислота (Fluca) та ацетонітрил – фрагментів дубильних речовин. Градієнтний режим елюювання (табл. 1). Швидкість подачі рухомої фази та робочий тиск: 0,8 мл/хв, 156×10⁵ Па (флавоноїди) і 0,1 мл/хв, 400 bar (складові дубильних речовин), температура термостата колонки 25 °С.

Пробопідготовка. Подрібнену ЛРС масою 1,00 г (точна наважка) та збір антиалергічний – 5,00 г (точна наважка) поміщали в круглодонну колбу на 50 мл, додавали 25 мл 60 % розчину метанолу, 2 мл розчину фосфорної кислоти Р і біді-

Таблиця 1. Параметри градієнтного режиму елюювання

		Флавоноїди						
Час, хв	0	30	33	38	40	41	49-60	
Елюент В, %	12	25	25	30	40	80	12	
		Фрагменти дубильних речовин						
Час, хв	0	8	10	15	20	25	28	29-40
Елюент В, %	100	12	12	25	25	75	75	100

стильованої води (1:10) з рН = 2,8; екстрагували на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при перемішуванні протягом 30 хв. Екстракт охолоджували, фільтрували, кількісно переносили в мірну колбу на 50 мл і доводили до мітки 60 % метанолом (флавоноїди).

Складові дубильних речовин із досліджуваних об'єктів (подрібнена ЛРС масою 1,00 г (точна наважка) та збір антиалергічний – 5,00 г (точна наважка)) екстрагували 50 мл 95 % розчину метанолу в ультразвуковій бані при 80 КHz та 45 °С протягом 30 хв. Екстракт охолоджували і фільтрували, фільтрат упарювали при 50 °С у роторному випарювачі. Сухий залишок розчиняли у 100 мл мобільної фази А [2, 6, 8, 9].

Відвар збору (1:10) готували згідно з [5].

Перед хроматографуванням одержані витяги фільтрували через фільтр одноразового використання з діаметром пор 0,45 мкм. Об'єм введеної проби 5-20 мкл.

Для вибору оптимальних аналітичних довжин хвиль детектування були вивчені УФ-спектри

стандартних зразків (виробник Sigma-Aldrich). Стандартні зразки: кверцетину, ізокверцитрину, рутину, апігеніну, лютеоліну, галової кислоти розчиняли в метанолі Р (gradient grade, for HPLC, > 99,9 %, Sigma-Aldrich), елагової кислоти – метанолі Р із додаванням розчину натрію гідроксиду розведеного. Вищезазначені стандартні розчини готували концентрацією від 50-200 мг/л та здійснювали їх п'ятирівневе градуювання у мануальному режимі. Процедуру п'ятирівневого градуювання метанольних стандартних розчинів катехінів (галокатехін, катехін, епігалокатехін, епікатехін, епікатехін галат) виконували в автоматичному режимі інжекції із програмуванням інжектваного об'єму (4, 12, 20, 28, 40 мг/л).

Результати й обговорення. УФ-спектри флавоноїдів і складових дубильних речовин показали 2 максимуми поглинання – при 255 та 340 нм і 255 та 280 нм відповідно. За результатом ВЕРХ-аналізу у досліджуваних об'єктах ідентифіковано аглікони та глікозиди флавоноїдів, фрагменти дубильних речовин (рис. 1–3).

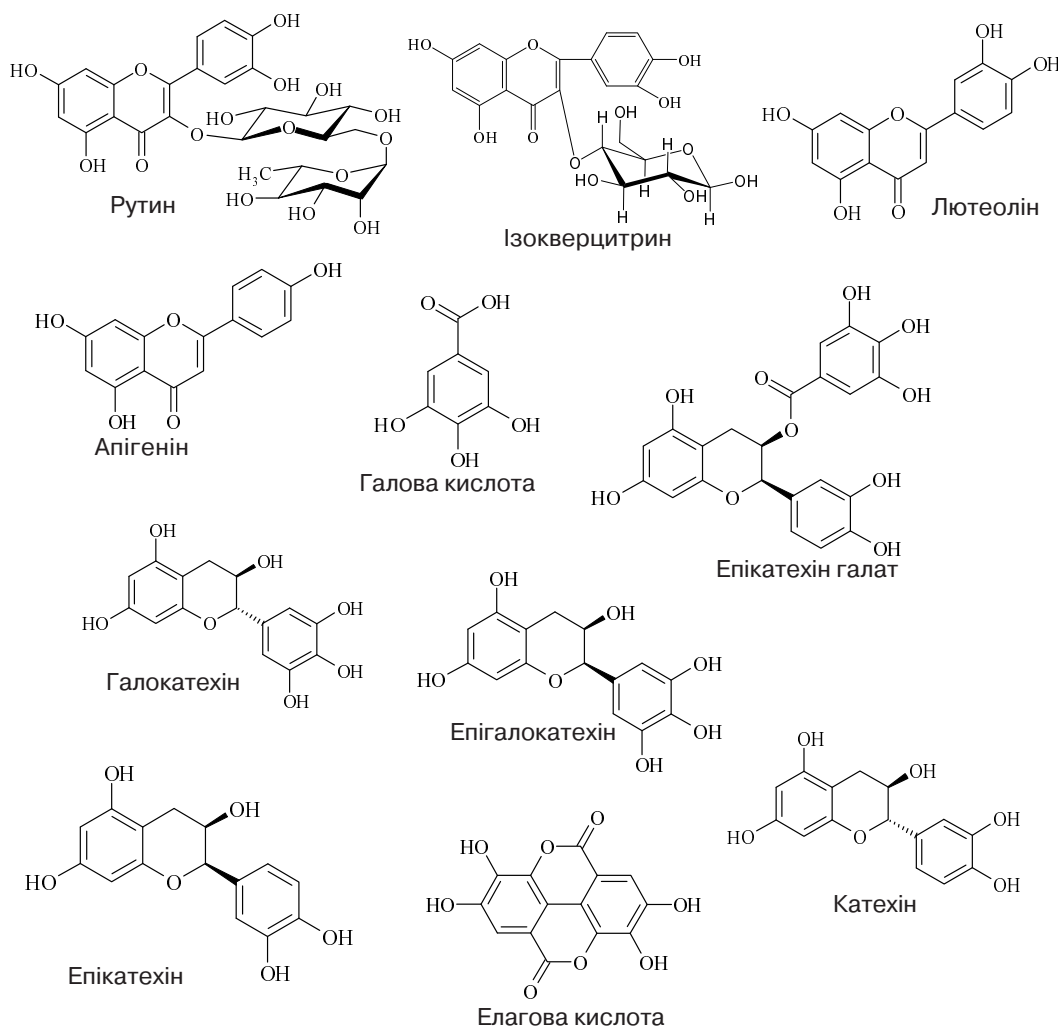


Рис. 1. Хімічні формули виділених сполук.

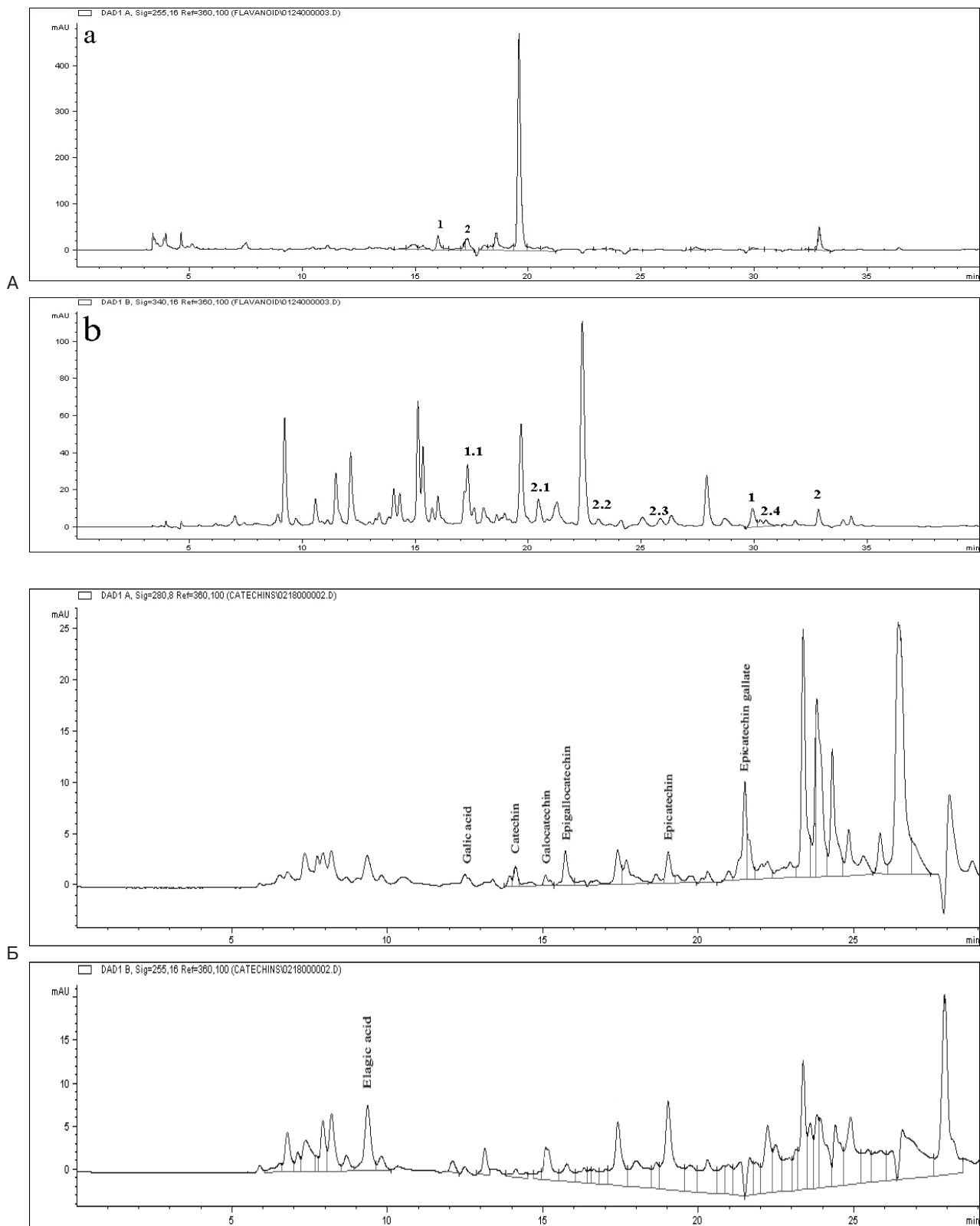


Рис. 2. Хроматограми фенольних сполук збору антиалергічного.

A: **a** – $\lambda = 255$ нм: 1 – рутин, 2 – ізокверцитрин; **b** – $\lambda = 340$ нм: 1 – лютеолін, 1.1 – глікозиди лютеоліну, 2 – апігенін, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4 – глікозиди апігеніну. **Б:** при 280 нм: галова кислота, катехін, галокатехін, епігалокатехін, епікатехін, епікатехін галат; при 255 нм: елагова кислота.

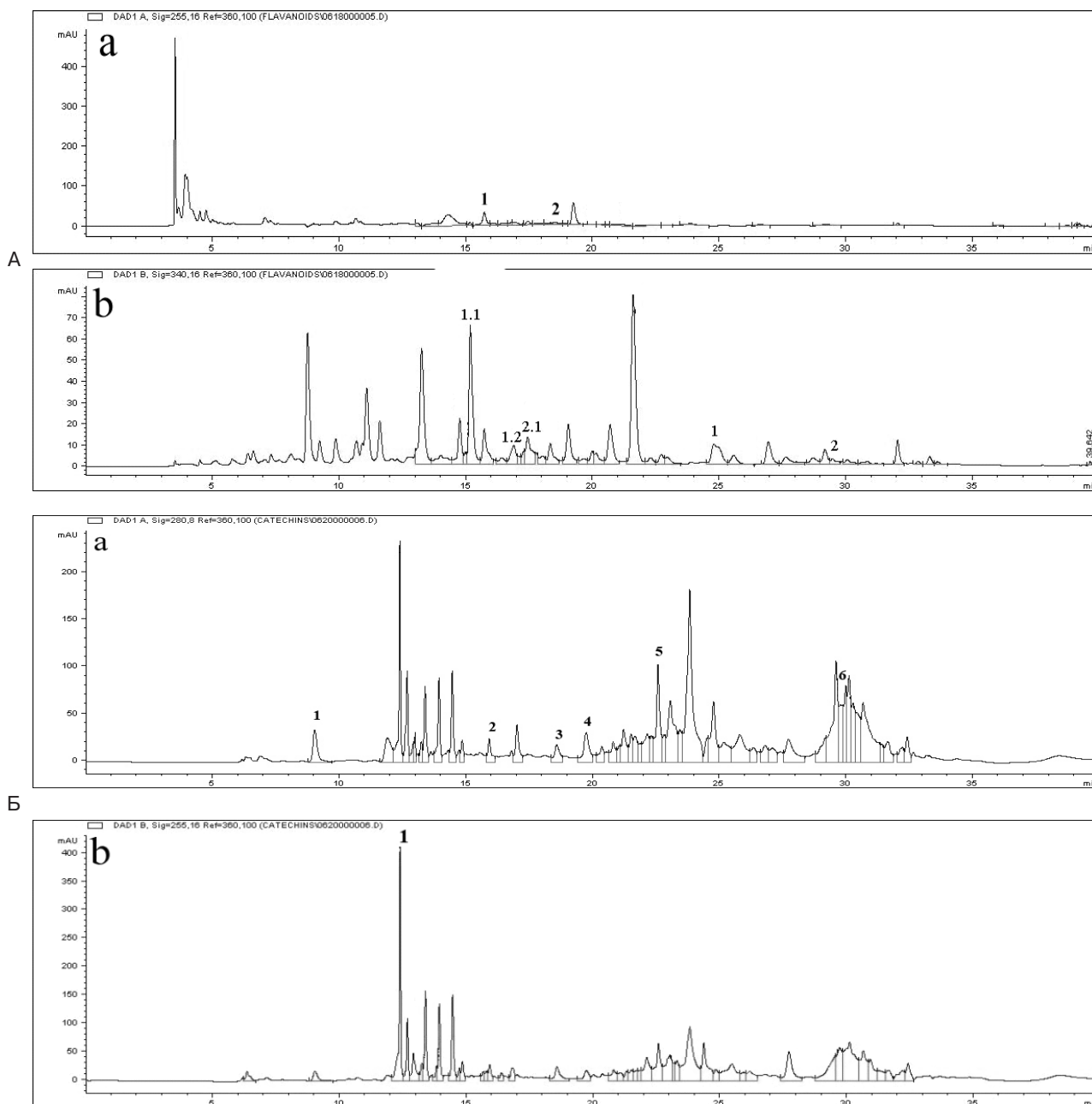


Рис. 3. Хроматограми фенольних сполук відвару збору лікарських рослин з антиалергічною активністю (1:10). А: а – при $\lambda = 255$ нм: 1 – рутин, 2 – ізокверцитрин; б – при $\lambda = 340$ нм: 2 – лютеолін, 2.1 – глікозиди лютеоліну, 1 – апігенін, 1.1, 1.2 – глікозиди апігеніну. Б: а – при $\lambda = 280$ нм: 1 – галова кислота, 2 – галокатехін, 3 – катехін, 4 – епігалокатехін, 5 – епікатехін, 6 – епікатехін галат; б – при 255 нм: 1 – елагова кислота.

Результати досліджень показали, що найбільше водно-спиртовий витяг збору антиалергічного містив рутин (0,22 %) та епігалокатехін (0,13 %) (табл. 2). Серед компонентів збору значну кількість рутину ідентифіковано у фіалки траві (0,77 %), че-реди траві (0,21 %), кропиви листках (0,12 %), епігалокатехіну – у меліси листках (1,2 %).

У відварі збору (1:10) найбільша кількість при-падала на фрагменти конденсованих дубильних речовин (катехіни): епігалокатехін – 0,7 %, гало-

катехін – 0,18 %, епікатехін – 0,15 % (табл. 2).

Висновки. За допомогою ВЕРХ-аналізу у зборі антиалергічному, його компонентах та відварі збору (1:10) ідентифіковано і встанов-лено кількісний вміст апігеніну і лютеоліну та їх глікозидів, рутину, ізокверцитрину, фрагментів дубильних речовин, що гідролізуються (галової та елагової кислот), простих катехінів (галока-техіну, катехіну, епігалокатехіну, епікатехіну) та складного катехіну (епікатехін галату).

Таблиця 2. Кількісний вміст речовин фенольного характеру у зборі лікарських рослин з антиалергічною активністю та його інгредієнтах, %

Назва речовини	Збір відвар (1:10)	Збір	ЧТ	ФТ	ПВЛ	МЛ	КЛ	РК	ПКК
Рутин	0,10	0,22	0,21	0,77	0,01	0,05	0,12	0,04	–
Ізокверцитрин	0,02	0,01	–	0,04	0,002	0,03	0,02	–	–
Лютеолін	0,002	0,01	0,04	–	0,01	–	–	0,03	–
Сума глікозидів у перерахунку на лютеолін	0,01	0,04	0,16	–	–	0,005	–	0,01	–
Апігенін	0,005	0,01	–	–	0,07	0,12	–	0,01	–
Сума глікозидів у перерахунку на апігенін	0,035	0,05	–	0,28	0,12	0,03	–	0,11	–
Галова кислота	0,01	0,001	–	0,005	–	0,001	0,001	–	–
Елагова кислота	0,04	0,002	0,002	0,003	0,002	0,002	0,003	0,004	0,003
Галокатехін	0,18	0,02	–	0,02	0,12	–	–	0,09	0,008
Епігало-катехін	0,70	0,13	–	0,08	0,022	1,2	–	0,08	0,02
Катехін	0,04	0,004	0,02	0,006	–	0,009	0,005	0,007	0,004
Епікатехін	0,15	0,02	0,04	–	0,002	0,004	–	0,01	–
Епікатехін галат	0,03	0,02	0,1	–	0,024	0,4	0,002	0,008	0,01

Примітки:

1. ЧТ – череди трава.
2. ФТ – фіалки трава.
3. ПВЛ – подорожника великого листки.
4. МЛ – меліси листки.
5. КЛ – кропиви листки.
6. РК – ромашки квітки.
7. ПКК – пирію кореневища і корені.

Література

1. Вивчення антиалергічної дії нових оригінальних рослинних зборів / Л. В. Яковлева, С. М. Марчишин, О. Б. Леницька, С. С. Козачок // Фітотерапія. Часопис. – 2013. – № 2. – С. 37-41.
2. Марчишин С. М. Определение гидроксикоричных кислот в антиаллергическом сборе методом ВЭЖХ [Электронный ресурс] / С. М. Марчишин, С. С. Козачок // Медицина и образование в Сибири : сетевое научное издание. – 2013. – № 4. – Режим доступа : http://ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1101.
3. Патент на корисну модель № 73556 Україна МПК А 61 К 35/00 Збір лікарських рослин для лікування і профілактики хворих з алергічними захворюваннями / Марчишин С. М., Яковлева Л. В., Козачок С. С., Леницька О. Б.; заявник і патентовласник ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України». – № у 2012 03896 ; заявл. 30.03.12 ; опубл. 25.09.12, Бюл. № 18.
4. Принципи створення приписів лікарських засобів природного походження / Н. О. Ветютнева, В. І. Тодорова, Л. Б. Пилипчук, А. П. Радченко // IV Національний з'їзд фармакологів України : тези доповідей, 10-12 жовтня 2011 р., м. Київ. – К : Науково практичне, медичне видання, 2011 – С. 47-48.
5. Тихонов О. І. Аптечна технологія ліків : посібник

для студентів фармацевтичних факультетів ВМНЗ III-IV рівнів акредитації / О. І. Тихонов, Т. Г. Ярних. – Вінниця : Нова книга, 2004. – 639 с.

6. Gudej Jan Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus L. species* / Jan Gudej, Michal Tomczyk // Arch. Pharm. Res. – 2004. – Vol. 27, № 11. – P. 1114-1119.
7. Inhibitory effects of tea catechins and O-methylated derivatives of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate on mouse type IV allergy / Masazumi Suzuki, Kyoji Yoshino, Mari Maeda-Yamamoto [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48. – P. 5649-5653.
8. Portet Benedicte Analysis of minor flavonoids in *Piper hostmannianum* var. *berbicense* using liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / Benedicte Portet, Nicolas Fabre, Raoul Rozenberg [et al.] // J. of Chromatography A. – 2008. – Vol. 1210. – P. 45-54.
9. Sensitive Determination of Catechins in Tea by HPL // Thermo scientific. DIONEX corporation. – 2011. – AN 275 – http://www.dionex.com/en-us/webdocs/113734-AB150-LC-Catechins-Tea-07Sep2012-AB70164_E-200912S.pdf.
10. Webb T. Green tea experiments in lab, clinic yield mixed results / T. Webb // J. Nat. Cancer Inst. – 2000. – Vol. 92. – P. 1038-1059.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СБОРЕ АНТИАЛЛЕРГИЧЕСКОМ МЕТОДОМ ВЭЖХ

С. С. Козачок

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: установлен профиль фенольных соединений сбора лекарственных растений с антиаллергической активностью, его ингредиентов и отвара сбора (1:10) методом ВЭЖХ. В исследованных объектах идентифицировано и установлено количественное содержание: апигенина, лютеолина и их гликозидов, рутина, изокверцитрина, галловой и эллаговой кислот, галокатехина, катехина, эпигаллокатехина, эпикатехина и эпикатехин галата.

Ключевые слова: высокоэффективная жидкостная хроматография, флавоноиды, компоненты дубильных веществ, сбор антиаллергический.

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN ANTIALLERGIC HERBAL COMPOSITION BY HPLC

S. S. Kozachok

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: the profile of phenolic compounds of the composition of medicinal plants with antiallergic activity, its ingredients and decoction from antiallergic herbal composition (1:10) by HPLC was set up. Identified and established quantitative content of apigenin, luteolin and their glycosides, rutin, isoquercitrin, gallic and ellagic acids, gallo catechin, catechin, epigallocatechin, epicatechin and epicatechin gallate in the investigated objects.

Key words: high performance liquid chromatography, flavonoids, compounds of tannins, antiallergic herbal composition.

Отримано 09.12.13