

АНАЛІЗ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ *ACONITUM EULOPHUM RCHB.* НА ВМІСТ СПОЛУК ФЕНОЛЬНОЇ ПРИРОДИ

Л. М. ЧЕБАН, І. В. МАЛІЩУК

Чернівецький національний університет імені Юрія Федьковича,
Україна, 58012, м. Чернівці, вул. Коцюбинського, 2
e-mail: larisa.cheban@mail.ru

Досліджено рослинну сировину *A. eulophum* на вміст фенольних сполук як джерела для отримання фітокомплексів із антиоксидантними властивостями. Вивчено екстрагуючі властивості 80% спирту по відношенню до сполук фенольної природи *A. eulophum*. Досліджено кількісний та якісний вміст флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, глікозидів флавоноїдів, дубильних речовин у смолі з різних органів *A. eulophum* спектрофотометричними методами за відповідних довжин хвиль. При УФ-аналізі етанольних екстрактів рослинної сировини *A. eulophum* встановлено кілька максимумів поглинання, що свідчать на користь сполук фенольної природи, зокрема їх глікозильованих форм. Встановлено, що максимальним вмістом у листках даної рослинної сировини характеризуються глікозильовані флавоноїди (5,2%), що є типовим для більшості представників роду *Aconitum* L., мінімальним – гідроксикоричні кислоти, присутність яких встановлена в межах 1–2 %. Вміст інших сполук фенольної природи коливається в межах 2–4 %. Підібрані умови проведення тонкошарової хроматографії флавоноїдів. Опробовані в якості рухомої фази при ТШХ 11 систем розчинників, що відрізнялися за якісним та кількісним складом. Оптимальною рухомою фазою для їх розділення визначено н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2). Для ідентифікації сполук використано 4 % етанольний розчин H_2SO_4 . Встановлено присутність у рослинній сировині *A. eulophum* трьох компонентів спектру флавоноїдів з відповідним R_f 0.46, 0.62, 0.82, що відповідають рутину, монозиду ізокверцетину та кверцетину.

Ключові слова: *A. eulophum* Rchb., фенольні сполуки, флавоноїди, поліфеноли, гідроксикоричні кислоти, спектральний аналіз, тонкошарова хроматографія.

Вступ. Основними фармакологічно активними речовинами рослинної сировини представників роду *Aconitum* L. є алкалоїди (Антипова и др., 2004). Однак, у виявленні біологічної активності комплексних рослинних екстрактів суттєва роль також належить фенольним сполукам, зокрема поліфенолам, які проявляють антиоксидантну, протизапальну, капіляррозміцнюючу та антиметастатичну активності (Mariani, 2008). У рослинній сировині представників роду *Aconitum* L. встановлено наявність флавоноїдів та флавонол глікозидів, зокрема кверцетину 3-О-глюкопіранозид-7-О-β-D-глюкопіранозил (1→3) – α-L-рамнопіранозиду, кверцетину 3-О-β-D-глюкопіранозид-7-О-β-D-глюкопіранозил (1→3) – α-L-рамнопіранозиду, які ідентифіковані для *A. burnatii*, кемпферолу 3-О-((β-D-глюкопіранозил (1→3)-4-О-α-L-рамнопіранозиду, кловіну, робініну, які ізольовані з рослинного матеріалу *A. anthora*, а також кверцетин-3-О-глюкопіранозил (1→2) глюкопіранозил – 7-О-α-рамнопіранозиду, кемпферолу, кверцетину рослин *A. napellus*, *A. vulparia*, *A. naviculare* (Gajalakshmi, 2011). Не дивлячись на різноманітність та багатофункціональність поліфенольних сполук вищезгаданих видів, їх компонентний склад та механізм дії все ще залишаються не до кінця вивченими. Це пов'язано з різноманітністю їх окислених форм, складним вмістом компонентів рослинних екстрактів, а та-

кож із наявністю великої кількості природних продуцентів цих сполук (Курулькин и др., 2007). Так, до останніх можна також віднести маловивчені карпатські та волино-подільські види, такі як *A. eulophum* Rchb., *A. besseranum* Andrzej., *A. moldavicum* Hacq.

Aconitum eulophum Rchb. – ендемічний волино-подільський вид I категорії, що у Червоній книзі України наводиться як вразливий з категорією рідкості «VU» (Дідух, 2009). Локальні популяції *A. eulophum* нечисленні, представлені окремими особинами. Вид на сьогодні залишається практично невивченим на предмет наявності біологічно активних речовин. Тому метою даної роботи є біохімічне вивчення якісних і кількісних показників сполук фенольної природи рослинної сировини *A. eulophum*

Матеріали та методи. Рослинний матеріал для дослідження наданий співробітниками природного заповідника «Медобори», за що висловлюємо їм подяку. Місце збору розташоване в околицях села Вікно Гусятинського району Тернопільської області. Відповідно до вимог Державної Фармакопеї України, зібрану сировину висушували, упаковували у паперові пакети і зберігали у сухому прохолодному місці (ДФУ, 2011). Рослинний матеріал *A. eulophum* подрібнювали до часток розміром 2 - 5 мм, екстрагували органічними розчинниками у декілька етапів при ви-

сокій температурі, об'єднували та фільтрували. Після фільтрації залишок у колбі і на фільтрі багатократно промивали органічним розчинником (Ботиров и др., 2006, Бреусова и др., 2008). Об'єднаний кінцевий продукт екстракції безпосередньо використовували для дослідження в УФ-області та встановлення кількості флавоноїдів, глікозидів флавоноїдів, гідроксикоричних кислот, дубильних речовин. Ідентифікацію органічних сполук здійснювали на основі електронних спектрів поглинання в інтервалі 200-400 нм (Антипова и др., 2004). Кількісний вміст різних класів фенольних сполук визначали спектрофотометрично за відповідних довжин хвиль. Як стандарт для визначення гідроксикоричних кислот використовували хлорогенову кислоту виробництва фірми Aldrich Chem. Co. (Швеція). Вміст флавоноїдів та їх глікозидів визначали в реакції комплексоутворення спектрофотометрично при 430/415 нм на СФ-46. Як стандарт використовували кверцетин та 3-О-рамнозид мірицетину (Лобанова и др., 2004).

Якісний склад суми флавоноїдів аналізували методом ТШХ на папері та у тонкому шарі сорбенту на пластинках «Silufol – UV – 254» (Чехія) в системах розчинників, тип та співвідношення яких підбирали емпірично, відповідно до вимог Державної Фармакопеї та за типовими рекомендаціями у літературі (Антипова и др., 2004, ДФУ, 2011). Сполуки на хроматограмах ідентифікували 2 % розчином $AlCl_3$, 4 % спиртовим розчином H_2SO_4 та в УФ-світлі (Лобанова и др., 2004). Встановлювали величини R_f кожного компоненту спектру.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили за допомогою програмного забезпечення *Microsoft Excel*. Відмінності результатів, що обговорюються в роботі, вірогідні при рівні значимості $P \leq 0,05$ за критерієм Ст'юдента. Кількісні визначення проводились у 5-кратній повторюваності. На рисунках представлені типові хроматограми.

Результати та обговорення. Відомо, що рослинна сировина представників роду *Aconitum L.* містить різні класи фенольних сполук (Gajalakshmi, 2011). Однак, повнота їх вилучення в першу чергу залежить від підбору оптимальних параметрів екстракції. Правильний вибір методу пробопідготовки досліджуваних зразків є одним із ключових моментів при кількісному і якісному аналізі складних багатокомпонентних систем. Найчастіше в якості екстрагента для вилучення флавоноїдів використовують 80 % етанол. Для отримання екстрактів рослинної сировини *A. eulophum* нами застосований такий же розчинник із співвідношенням рослинна сировина: екстрагент 1 : 5. При УФ-аналізі етанольних екстрактів

рослинної сировини *A. eulophum* встановлено кілька максимумів поглинання, які свідчать на користь сполук фенольної природи (Рис.1).

При цьому спостерігається гіпохромний зсув на 10-15 нм, що є наслідком появи вуглеводневого замісника у 3' - 5' положеннях у молекулі флавоноїду. Наявні максимуми поглинання в областях 195 - 230 та 240 - 360 нм, дають можливість припустити присутність рамно- та глюкопіранозидів кемпферолу, кверцетину, флавонолу, які характерні і для інших представників роду *Aconitum L.* (Gajalakshmi, 2011). Поява спектральної активності у межах 290 – 330 нм підтверджує присутність гідроксикоричних кислот у всій досліджуваній сировині. Для детальної оцінки досліджуваної сировини були застосовані методи кількісного аналізу (Таб. 1).

Табл. 1.

Кількісний вміст сполук фенольної природи *A. eulophum*

Табл. 1.

The quantitative content of phenolic nature compounds of *A. eulophum*

Загальний вміст, %	листки	стебла	корені	оцвітина
флавоноїди	3,70± 0,07	1,42±0,013	2,22±0,03	1,53±0,12
глікозильовані флавоноїди	5,24±0,04	3,95±0,07	3,75±0,06	2,36±0,02
гідроксикоричні кислоти	1,84±0,13	1,15±0,016	1,70±0,09	0,85±0,01
дубильні речовини	1,66±0,02	1,40±0,01	0,65±0,02	0,96±0,02

Так, із усіх проаналізованих сполук максимальний вміст у листках *A. eulophum* встановлено для глікозильованих флавоноїдів (5,2 %), який є типовим для більшості представників роду *Aconitum L.* (1-5 %) (Luis, 2006; Mariani, 2008). Відомо, що антиоксидантна активність сполук фенольної природи зростає при переході від глікозидів флавоноїдів до агліконів. Крім того фенольні сполуки, що містять у своєму складі вуглеводний залишок, володіють вищою спорідненістю до біологічних тест-об'єктів (Rice-Evons, 2006; Kumar, 2012). У мінімальній кількості у рослинній сировині знаходяться гідроксикоричні кислоти, присутність яких встановлено в межах 1-2 %. Гідроксикоричні кислоти із-за наявності у складі хімічної структури –ОН груп проявляють антиоксидантні властивості та займають центральне положення у біосинтезі всіх фенольних сполук у клітинах вищих рослин, являючись попередниками халконів, катехинів, флавононів та антоціанів. Вміст інших сполук фенольної природи коливається в межах 2-4 %. В усіх інших органах зберігається дана закономірність.

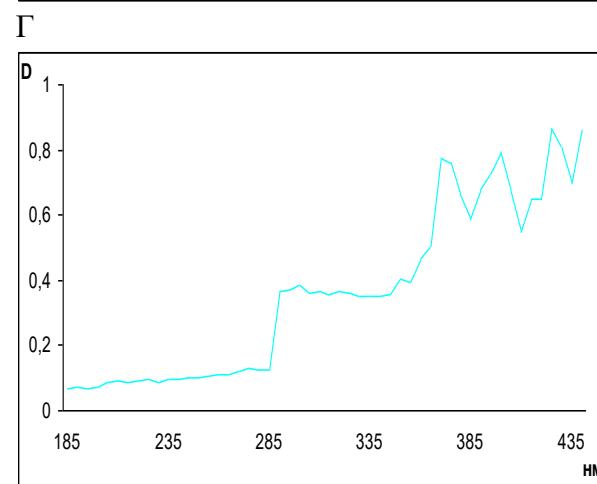
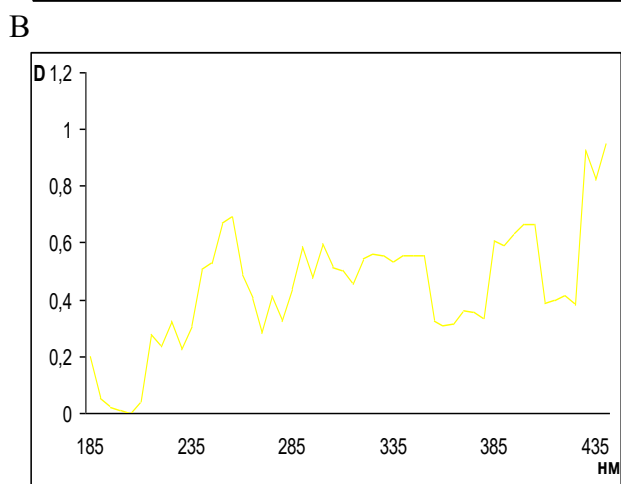
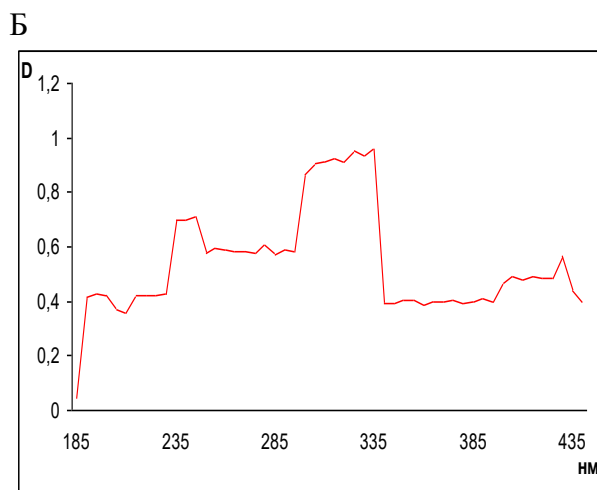
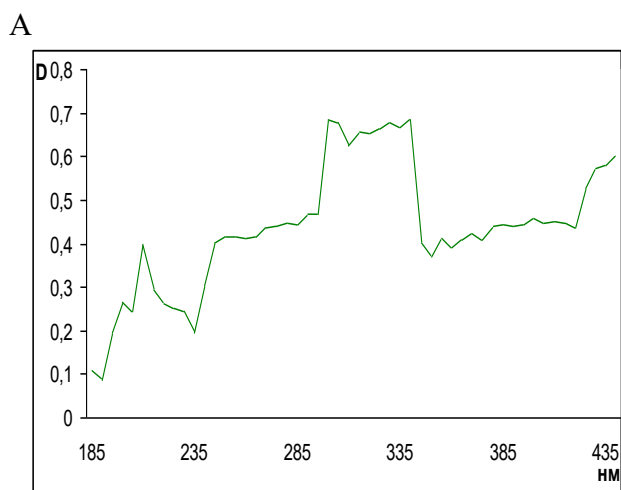


Рис.1. УФ-спектри екстрактів рослинної сировини *A. eulophum*.

Fig. 1. UV-spectr of the plant material extracts *A. eulophum*.

Примітка: А – листки; Б – стебла; В – корені; Г – оцвітнина.

Note: A – leaves; B – stalks; C – roots; D – perianth.

Отже, враховуючи відносно високий рівень накопичення різних класів флавоноїдів у листках *A. eulophum*, їх можна розглядати як джерело для отримання фітокомплексів з антиоксидантними властивостями. Оскільки нами показано наяв-

ність у рослинній сировині *A. eulophum* флавоноїдів, актуальною є розробка методу їх розділення. Нами були опробовані як рухому фазу при ТШХ 11 систем розчинників, що відрізнялися за якісним та кількісним складом (Таб. 2.).

Табл. 2.
Системи розчинників для ТШХ та ідентифікації флавоноїдів *A. eulophum*.

Tab. 2.
Solvent system for TLC and identification of flavonoids *A. Eulophum*

Система	Забарвлення			результат ТШХ
	УФ - детекція	4 % H ₂ SO ₄	2 % AlCl ₃	
ацетат : вода (3 : 7)	жовто-зелене	рожеве	жовте	R _f 0.82
хлороформ : етанол (9:1)	-	-	-	-
хлороформ-етанол-вода (26 : 14 : 3)	-	-	-	-
хлороформ-етанол –аміак (25 %) (44 : 10 : 1)	-	-	-	-
хлороформ : етанол : ацетат (8 : 1 : 1)	-	-	-	-
хлороформ : бензол : етанол (3 : 9 : 1)	-	-	-	-
н-бутанол : ацетат : вода (5 : 4 : 2)	-	-	-	-
н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 5)	оранжеве	рожеве	-	R _f 0.46
н-бутанол : ацетат : етанол (4 : 1 : 2)	жовто-зелене	рожеве	жовте	R _f 0.46
		рожеве	-	R _f 0.62
	жовто-зелене	оранжеве	жовте	R _f 0.82
ацетон : аміак (25 %) (10 : 1)	-	-	-	-
бензол : метанол : хлороформ (5 : 1 : 4)	-	-	-	-

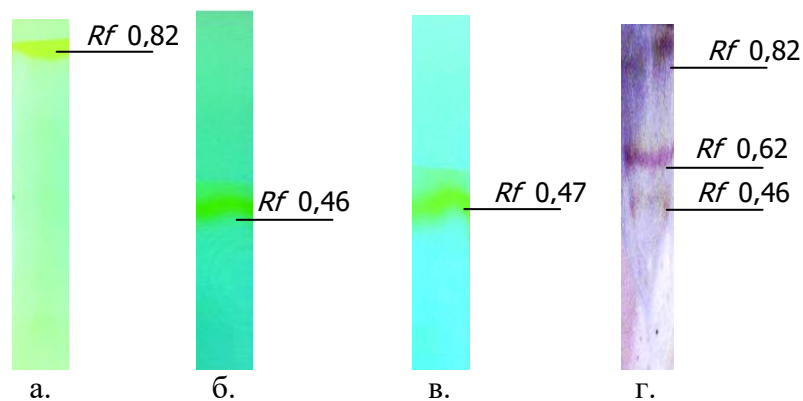


Рис. 2. Хроматограми флавоноїдів листків *A. eulophum*

Примітка: а. рухома фаза – ацетат : вода (8 : 2), проявник – 2 % $AlCl_3$ та УФ-спектр; б. рухома фаза – н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 5), проявник – 2 % $AlCl_3$ та УФ-спектр; в. рутин; рухома фаза – н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2), проявник – 2 % $AlCl_3$ та УФ-спектр; г. рухома фаза – н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2), проявник – 4 % етанольний розчин H_2SO_4 .

Fig. 2. Flavonoids leaves chromatogram *A. eulophum*.

Note: a. moving phase – acetate : water (8 : 2), the developer – 2 % $AlCl_3$ and UV-spectrum; b. moving phase – n-butanol : acetate : water (4 : 1 : 5), developer – 2 % $AlCl_3$ and UV-spectrum; c. rutin, moving phase – n-butanol : acetate : water (4 : 1 : 2), the developer – 2 % $AlCl_3$ and UV-spectrum; d. moving phase – n-butanol : acetate : water (4 : 1 : 2), the developer – 4 % ethanol solution of H_2SO_4 .

При проведенні ТШХ оптимального розділення вдалося досягти при використанні системи н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2) (Рис. 2.). Так, на хроматограмах ідентифіковано три сполуки, що при обробці 4 % етанольним розчином H_2SO_4 забарвлюються у рожевий та оранжевий кольори. R_f досліджуваних сполук встановлено на рівні 0.46, 0.62 та 0.82 відповідно. Індивідуальні сполуки з R_f 0.46 та 0.82 за літературними даними відповідають рутину та кверцетину, що підтверджено експериментально зі стандартними розчинами (Ботиров и др., 2006)

На хроматограмах також вдається ідентифікувати третій компонент з R_f 0.62, що відповідає монозиду ізокверцетину, який утворюється при відщепленні від біозиду рутину залишку моносахариду рамнози, що спричинено екстракцією при високих температурах.

Отже, оптимального розділення флавоноїдів з рослинної сировини *A. eulophum* вдалося досягнути при використанні системи розчинників н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2), в якості проявника – 4 % етанольний розчин H_2SO_4 .

Така схема проведення ТШХ дозволяє виділити та ідентифікувати три представники індивідуальних сполук флавоноїдів.

Отже, отримані результати дозволяють прогнозувати використання рослинної сировини *A. eulophum* як джерела флавоноїдів, зокрема їх глікозильованих форм.

Висновки. Встановлено вміст основних класів фенольних сполук на рівні, типовому для представників роду *Aconitum* L., і розроблені оптимальні умови проведення ТШХ (н-бутанол : ацетат : вода (4 : 1 : 2)) та ідентифікації (4 % ета-

нольний розчин H_2SO_4) флавоноїдів *A. eulophum*; ідентифіковано три індивідуальні сполуки з R_f 0.46, 0.62 та 0.82, що відповідають рутину, монозиду ізокверцетину, та кверцетину відповідно.

Список літератури

1. Антипова Е. А. Определение биологически активных веществ в *Alocasia macrorrhiza* / Е. А. Антипова, С. М. Юдина, Л. Е. Тимофеева и др. // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 103-107
2. Ботиров Э. Х. Химическое исследование флавоноидов лекарственных и пищевых растений / Э. Х. Ботиров, А. А. Дренин, А. В. Макарова // Химия растительного сырья. – 2006. – № 1. – С. 45-48
3. Державна фармакопея України. – 1-е вид. Доп. 4. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармацевтичний центр якості лікарських засобів». – 2011. – 538 с.
4. Курулькин Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Курулькин, Ж. А. Абилов, Р. А. Музычкина, Г. А. Толстикова; Рос. акад. наук. Сиб. отд., Новосибирск. ин-т органической химии. – Новосибирск: Академическое изд-во «Гео», 2007. – 232с.
5. Лобанова А. А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А. А. Лобанова, В. В. Будаева, Г. В. Сакович // Химия растительного сырья. – 2004. – №1. – С. 47-52
6. Новіков А. В. Рід *Aconitum* L. в Українських Карпатах / А. В. Новіков, Ю. Н. Мітка // Біологічні Студії. – 2011. – Т. 5, № 2. – С. 153 – 172
7. Червона книга України. Рослинний світ / За ред. Я. П. Дідуха. – К.:Глобаконсалтинг, 2009. – 912с.
8. Gajalakshmi S. N. Phytochemical constituent of *Aconitum* species-a review / S. N. Gajalakshmi, P.

- O. Jeyanthi // International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. – 2011. - № 2. – P. 121 - 127
9. Kumar P. Antioxidant activity determining catechol grouping flavonol glycosides from the flowers of *Aconitum hetrophyllum* / P. Kumar , Beena C., Verma D. L. // International Journal of Research in Chemistry and Environment. – 2012. - № 2. – P. 145 – 147.
10. Mariani C. V. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae) // C. V. Mariani, A. A Braca, S. A. Vitalini // Phytochemistry. – 2008. - № 69. – P. 1220 – 1226
11. Luis J. C. DPPH radical scavenging activity of two flavonol glycosides from *Aconitum napellus* sp. Lusitanicum./ J. C. Luis, F. N. Valdes // Fititerapia. – 2006. –№ 77. P 469 - 471
12. Rice-Evons C. A. Flsvonoids *Aconitum hetrophyllum* / C. A. Rice-Evons, Miller N. I. // Free Radical Biol. Med. - 2006. – 933 p.

THE ANALYSIS OF ACONITUM EULOPHUM RCHB. PLANT MATERIAL ON THE CONTENT OF PHENOLIC NATURE COMPOUNDS

Cheban L.M., Malischuk I.W.

The plant material of A. eulophum was investigated on the content of phenolic compounds as a source of phytocomplexes with antioxidant properties. The extractive properties of 80 % alcohol in relation to phenolic nature compounds of A. eulophum were studied. The quantitative and qualitative content of flavonoids, hydroxycinnamic acids, glycosides, flavonoids, tannins in extract from various organs of A. eulophum were investigated by spectrophotometric method with appropriate wavelengths. When UV-analysis the herbal ethanol extracts from A. eulophum the several absorption maxima were established that indicate the phenolic nature compounds, including their glycosylated forms. It was found that glycosylated flavonoids are characterized by maximum content in the leaves of plant material (5.2%), which is typical for most species of the genus Aconitum L., while the minimal content is observed for the hydroxycinnamic acids, whose presence is set in the range of 1-2 %. The content of other phenolic nature compounds ranges in 2-4%. The conditions for thin-layer chromatography of flavonoids were selected. The optimal mobile phase for their separation was defined with the conjunction of n- butanol: acetate : water (4: 1 : 2). To identify the compounds the 4% ethanol solution of H₂SO₄ was used. It was established the presence in A. eulophum plant material three components of flavonoids spectrum with appropriate R_f 0.46, 0.62, 0.82, corresponding to routine monozyd, izokvertsetin and quercetin.

Keywords: *A. eulophum Rchb., phenolic compounds, flavonoids , polyphenols, hydroxycinnamic acids, spectral analysis, thin-layer chromatography.*

Одержано редколегією 12.02.2013