

УДК 633.14:633.11:581.19:581.13:577.15

ФЕНОЛЬНІ АНТИОКСИДАНТИ У ПРОРОСТКАХ ГРЕЧКИ В КУЛЬТУРІ *IN VITRO*

**© 2013 р. О. В. Ситар, В. О. Стороженко,
А. М. Косян, Н. Ю. Таран**

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
(Київ, Україна)

В умовах *in vitro* було досліджено антиоксидантну активність, загальний вміст фенолів та композицію фенольних сполук *Fagopyrum tataricum* за допомогою високоефективної рідинної хроматографії. В екстрактах стебел з проростків гречки в умовах культури *in vitro* була виявлена тенденція до збільшення загального вмісту фенолів та висока антиоксидантна активність. За цих умов спостерігали високий вміст хлорогенової кислоти, як в листках, так і в стеблах проростків гречки порівняно з іншими фенольними сполуками. Також у проростках гречки були ідентифіковані кофеїна кислота, катехіни, галлова і кумарова кислоти та кверцетин.

Ключові слова: *Fagopyrum tataricum*, антиоксидантна активність, феноли, культура *in vitro*

Проростки гречки татарської (*Fagopyrum tataricum* L.) у зв'язку з високою антиоксидантною активністю вважаються джерелом фенольних сполук, насамперед, рутину. Водночас проростки гречки татарської мають вищий вміст антоціанів та глікозидів флавонолів порівняно з гречкою звичайною, вони використовуються в кардіології (Golisz et al., 2007; Kim et al., 2007).

Біосинтез антоціанів в гречці регулюється світлом, а також внутрішніми факторами, такими як фітогормони, 13S глобуліни, протолуктази (Shi et al., 2008).

Рослини в культурі *in vitro* здатні синтезувати та накопичувати вторинні метаболіти, які сприяють покращенню здоров'я. Різноманітні технології з використанням стресових чинників, певних прекурсорів, а також мінеральних елементів для поживного середовища в культурі *in vitro* для різних лікарських рослин були використані для збільшення продукції та накопичення сполук антиоксидантної природи (Matkowski, 2008).

Метою даної роботи було дослідження антиоксидантної активності, а також накопичення фенольних сполук та антоціанів у проростках гречки, вирощених за умов *in vitro*.

МЕТОДИКА

Стерилізація насіння та умови вирощування. За природних умов (*in vivo*, контроль) насіння гречки проростало в оранжереї протягом 14 днів за фотоперіоду 16 год світла/8 год темряви і температури 18°C та вологості 65%. Насіння гречки (сорт Антарія) було стерилізовано шляхом промивки його поверхні в проточній воді з милом протягом 20 хв за асептичних умов при ламінарному потоці повітря в камері з промиванням 70% етанолом протягом 1 хв і замочуванням на 20 хв в 10% розчині гіпохлориту натрію. Після замочування насіння промивали три рази в стерильній дистильованій воді. П'ять насінин базально розміщували на агарному поживному середовищі Мурасіге та Скуге (МС) в чашках Петрі (Murashige, 1962). Середовище МС з сахарозою (30 г/л) та агаром (8 г/л) з рН 5,8 стерилізували в автоклаві при 121°C протягом 25 хв. Насіння проростало у ростовій камері за стандартних умов при освітленні люмінесцентною лампою з потужністю освітлення 35 мкмоль с⁻¹м⁻² та 16/8 годинним фотоперіодом за температури 25°C. Після 14 днів росту та культивування рослинний матері-

Адреса для кореспонденції: Стороженко Володимир
Олександрович, Київський національний університет імені
Тараса Шевченка, вул. Володимирська, 64/13, Київ,
01601, Україна;
e-mail: vstoro@ukr.net

ФЕНОЛЬНІ АНТИОКСИДАНТИ У ПРОРОСТКАХ ГРЕЧКИ

ал було використано для біохімічного аналізу. Біологічне повторення експерименту шестиразове.

Підготовка зразків для визначення вмісту сполук фенольної природи. Зразки готували в два етапи. Спочатку 0,02 г сухого матеріалу було поміщено в епандорфи з додаванням 1 мл дистильованої води. Зразки нагрівали протягом 15 хв при температурі 95°C. Потім рослинний матеріал центрифугували протягом 5 хв (12000 g, 25°C). Екстракт повторно переносили в новий епандорф. До супернатанту знову додавали 1 мл дистильованої води нагрівали протягом 10 хв за температури 95°C. Даний супернатант потім знову центрифугували протягом 5 хв (12000 g, 25°C). Потім екстракт було знову перенесено в новий епандорф. Всі зразки було проаналізовано шість разів. Вміст загальних фенолів визначали за допомогою реагенту Фоліна (Singleton, 1965). Для визначення антиоксидантної активності використовували метод, розроблений Моліна (Moluneux, 2004). До екстракту (0,1 мл) додавали 3,9 мл розчину 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразу, через 30 хв вимірювали оптичну густину за довжини хвилі 515 нм. Одночасно аналізували контрольний зразок без додавання екстракту. Антиоксидантна активність (АОА, %) розраховувалась за формулою:

$$АОА = [(A_{\text{контроль}} - A_{\text{дослід}}) / (A_{\text{контроль}})] \times 100,$$

де А – оптична густина.

Визначення складу фенольних кислот за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії. 20 мг сухого рослинного матеріалу екстрагували протягом 15 хв за допомогою 750 мкл 70% метанолу в ультразвуковій бані (Sonogex цифровий 10p, Vandelin) на льоду. Зразки центрифугували протягом 5 хвилин при 6000 g. Супернатанти були відібрані, а зразки повторно екстрагували двічі з 500 мкл 70% метанолу. На наступному етапі зразки доводили до 1 мл 40% ацетонітрилом. Для фільтрування зразків використовували фільтр 0,22 мкмоль, а потім аналізували за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії системою Dionex P680A. Колонка працює за температури 35°C. Рухома фаза складалася з 0,1% фосфорної кислоти в бідистильованій воді, що використовується для вискоєфективної рідинної хроматографії (елюент А) та 40% ацетонітрилу в бідистильованій воді (елюент Б) (Cai et al., 2012). Багатоступінчатий градієнт було використано для всіх розділень з початкового об'єму ін'єкції 40 мкл та швидкості потоку 0,4 мл/хв. Багатоступінчатий градієнт створювали у такому режимі:

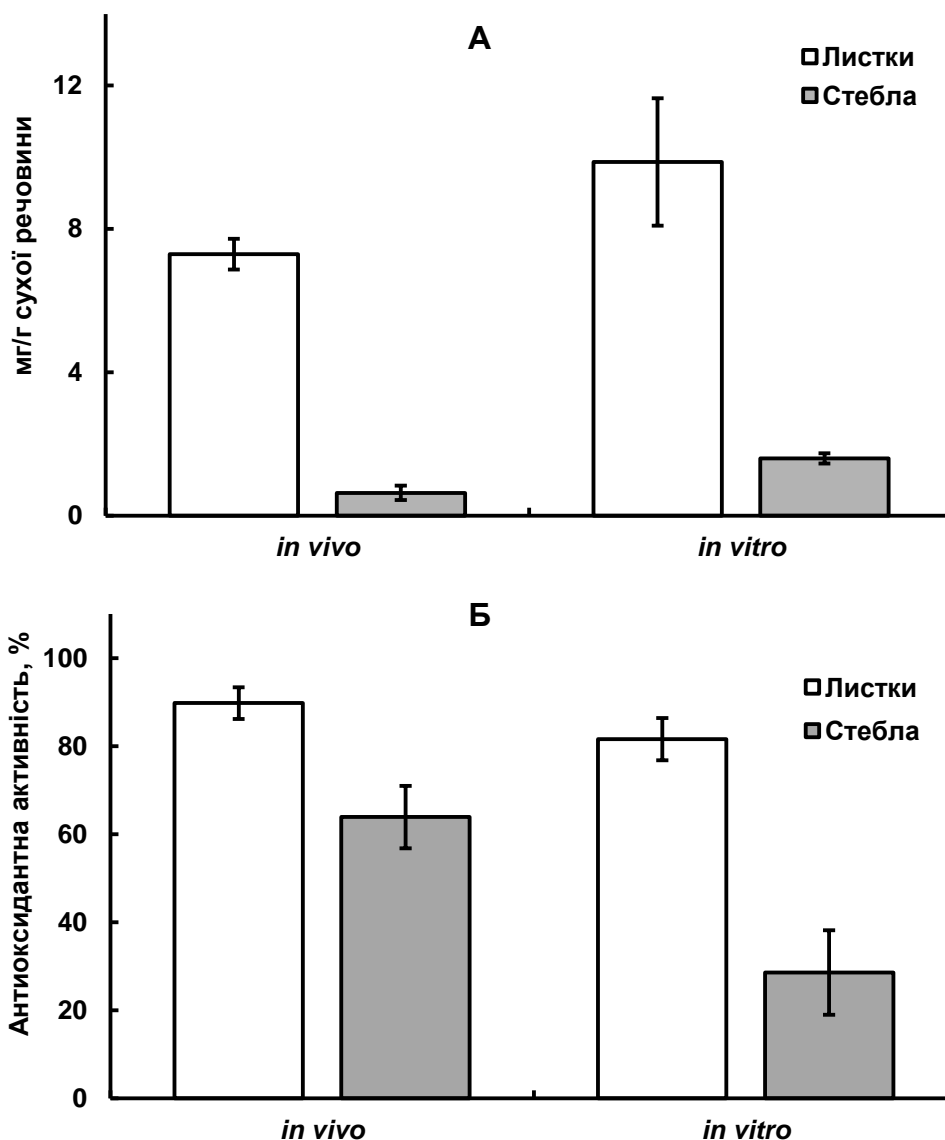
0-1 хв: 0,5% елюент В; 1-10 хв: 0,5-40% елюент В, 10-12 хв 40% елюент В; 12-18 хв: 40-80% елюент В, 18-20 хв: 80% елюент В; 20-24 хв: 80-99% елюент В; 24-30 хв: 99-100% елюент В; 30-34 хв: 100-0,5% елюент В, 34-39 хв: 0,5 % елюент В. Одночасний моніторинг було виконано за довжини хвилі 290, 330 та 254 нм при швидкості потоку 0,4 мл/хв. Кількість фенольних кислот була розрахована за площами піків вискоєфективної рідинної хроматографії при 290 нм проти стандартів та з порівнянням спектрів рідинної хроматографії (Mewis, 2011). Ідентифікацію та якісну оцінку фенольних кислот проводили шляхом порівняння часу пробігу та площі піків екстрактів щодо стандартів фенольних кислот (хлорогенова кислота, кофейна кислота, корична кислота, кумарова кислота, розмаринова та синапова кислоти).

РЕЗУЛЬТАТИ

Отримані результати підтверджують наше припущення про зв'язок між вмістом загальних фенолів та антиоксидантною активністю. За умов *in vitro* загальний вміст фенолів в листках та стеблах проростків гречки, як і загальна антиоксидантна активність були високими (рисунки). Відомо, що загальний вміст фенолів та антиоксидантна активність у проростків гречки, як правило, вища порівняно з антиоксидантною активністю насіння. Було продемонстровано, що рослини гречки мають більш високий вміст фенолів та антиоксидантну активність порівняно з рослинами амаранта, пшениці та лободи, і, водночас, антиоксидантна активність пов'язана з вмістом загальних фенолів (Alvarez-Jubete, 2010).

Тест на антиоксидантну активність показав, що вона була значно вищою в листках проростків гречки як за умов *in vivo* так і *in vitro* порівняно зі стеблами. В той же час антиоксидантна активність за умов *in vitro* у листках і стеблах рослин гречки була нижчою, ніж у тих рослин, які були вирощені *in vivo*. Водночас, показано чіткий зв'язок між антиоксидантною активністю та загальним вмістом фенолів, що відповідає результатам досліджень інших авторів (Rice-Evans et al., 1996).

Профіль ідентифікованих фенольних сполук за умов *in vitro* та *in vivo* у проростках гречки був таким же, але вміст ідентифікованих сполук у стеблах та листках був різним (таблиця). Зокрема, були ідентифіковані кофейна кислота RT 2.1, катехін RT 3.9, ванілінова кислота RT 4.4, епікатехін RT 7.17, галова кислота RT



Загальний вміст фенолів (А) та антиоксидантна активність (Б) в проростках гречки вирощених за умов *in vivo* та *in vitro*.

7.50, *p*-кумарова кислота RT 9.59, ферулова кислота RT 10.70, хлорогенова кислота RT 12.6, неідентифікований RT 14.37, етилгалат RT 15.71, епігалокатехінгалат RT 17.15, кверцитин RT 27.01.

Значно відрізнявся вміст ідентифікованих фенолів, які були виділені зі стебел гречки за умов *in vitro* порівняно з результатами, отриманими на екстрактах листків за умов *in vivo*. Вміст майже всіх ідентифікованих фенолів був більшим в стеблах гречки за умов *in vitro* (таблиця). Особливо збільшився вміст хлорогенової кислоти: в стеблах гречки за умов *in vitro* він був вищим більш ніж втричі порівняно з показником за умов культивування *in vivo*. Вміст епігалокатехінгалату, катехіну та кофейної кислоти був вищим в стеблах гречки за умов *in vitro* порівняно до умов *in vivo*.

ОБГОВОРЕННЯ

Подібні результати були отримані паралельно й іншими дослідниками, які показали, що вміст хлорогенової кислоти особливо високий у проростках гречки (Golisz, 2007). Крім того, було продемонстровано, що вміст хлорогенової кислоти був у два рази вищим саме в зелених проростках гречки порівняно з етіолованими. Вважають, що формування високоокиснених форм флавоноїдів прискорюється за дії природного світла (Yao et al., 2004). Це свідчить про можливу дію світлового ефекту в природних умовах на акумуляцію фенольних сполук в зелених листках проростків гречки за умов нашого експерименту. Високоєфективна рідинна хроматографія показала високий вміст хлорогенової кислоти, етилгалату та епігалло-

ФЕНОЛЬНІ АНТИОКСИДАНТИ У ПРОРОСТКАХ ГРЕЧКИ

Вміст фенолів у проростках гречки (мг/ г сухої речовини)

Фенольні сполуки	Листки		Стебла	
	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
Кофейна кислота	0,050±0,050	0,040±0,060	0,060±0,050	0,020±0,030
Катехін	0,020±0,001	0,020±0,004	0,020±0,002	0,010±0,001
Ванілінова кислота	-	-	0,006±0,0001	-
Епікатехін	0,015±0,003	0,011±0,001	-	-
Галова кислота	0,040±0,002	0,030±0,003	0,050±0,002	0,030±0,001
<i>P</i> -кумарова кислота	0,520±0,030	0,340±0,050	0,200±0,060	0,140±0,070
Ферулова кислота	0,050±0,003	0,010±0,004	0,020±0,002	0,010±0,002
Хлорогенова кислота	2,090±0,080	1,640±0,070	0,390±0,020	0,110±0,020
Етигалат	1,830±0,050	1,490±0,040	0,150±0,030	0,130±0,020
Епігалокатехін галат	0,590±0,070	0,430±0,050	0,450±0,040	0,310±0,030
Кверцетин	0,320±0,030	0,320±0,030	0,320±0,030	0,320±0,030

катехін галату в екстрактах листків та стеблах гречки за вирощування в природних умовах (*in vivo*).

За вирощування рослин в умовах відкритого ґрунту в листових екстрактах кофейна кислота, катехіни, галова кислота, кумарова кислота і кверцетин були представлені в відносно невеликій кількості. У стеблах гречки, вирощеної *in vivo*, був високий вміст кофейної кислоти, катехіну та епігаллокатехін галату. В екстрактах стебел за умов *in vitro* значно збільшилась кількість хлорогенової кислоти.

Епікатехін, катехін, галову кислоту, хлорогенову кислоту, кверцетин, рутин було ідентифіковано в польових дослідах у рослин гречки вже у фазі повного цвітіння (Golisz et al., 2007). Результати наших досліджень демонструють, що кверцетин, катехін, епікатехін, а також хлорогенова, кофейна, ванілова, *p*-кумарова, ферулова та галлова кислоти, були виявлені в листках і стеблах 14-денних проростків гречки. Найвищою концентрація хлорогенової кислоти була в листках (2,09 мг г⁻¹) та стеблах (0,39 мг г⁻¹) в розрахунку на суху речовину за умов *in vitro*. Дані попередніх досліджень показали, що концентрація хлорогенової кислоти була вищою в суцвіттях у порівнянні з листками (Golisz et al., 2007). В нашому експерименті на 14-й день проростки гречки мали високу концентрацію саме хлорогенової кислоти в листках порівняно з вмістом інших ідентифікованих фенольних сполук.

Таку ж тенденцію ми спостерігали для кофейної кислоти у стеблах гречки. Вміст кофейної кислоти в стеблах за умов *in vitro* був вищим, ніж у листках рослин, які вирощувалися як за умов *in vivo*, так і *in vitro* і досягав 0,06 мг⁻¹ г сухої речовини. В рослинах гречки в період повної фази цвітіння вміст кофейної кислоти досягав 0,21 мг⁻¹ г сухої речовини в лист-

ках і 0,08 мг⁻¹ г сухої речовини в стеблах (Golisz et al., 2007).

Вміст катехінів у стеблах з проростків гречки, вирощених за умов *in vitro*, був вищим порівняно з даним показником у листках рослин, вирощених *in vivo*.

У дослідах, проведених у фазі повного цвітіння гречки було показано, що листки та стебла мали низький вміст катехінів, 0,22 і 0,03 мг г⁻¹, відповідно. Водночас, вміст (+)-катехіну в листках гречки був дуже низьким (0,01% від сирої маси) (Iqbal, 2005). Але дослідження, які були проведені з 20-денними рослинами гречки *in vitro*, виявили, що тканини гречки характеризуються високим рівнем біосинтезу катехіну та проціанідину (Moumou et al., 1992), що свідчить про можливість регулювання синтезу сполук фенольної природи певними умовами (середовище, прекурсори, вплив певних стресових факторів) за умов *in vitro*.

Таким чином, ми припускаємо, що протягом перших 14 днів у проростках гречки зростає вміст катехінів в стеблах та листках, що, на нашу думку, може залежати від умов росту та вмісту катехінів в насінні. Чотири види катехінів та рутин були виділені з етанолових екстрактів гречаної крупи (*Fagopyrum esculentum* Moench.) та було встановлено, що антиоксидантна активність даних катехінів була вищою, ніж у рутину (Watanabe et al., 1998; Watanabe et al., 2009). Результати досліджень з використанням рідинної хроматографії продемонстрували, що катехін та його похідні в гречаній крупі були (+)-ізомерами, в той час як епікатехін та його похідні були (-)-ізомерами, які також мають антиоксидантні властивості (Watanabe et al., 1998). Таким чином, висока антиоксидантна активність проростків гречки, які були вирощені за умов *in vitro*, зумовлена високим вмістом

хлорогенової кислоти та наявністю катехинів у даний період розвитку рослин.

ЛІТЕРАТУРА

- Alvarez-Jubete L., Wijngaard H., Arendt E.K., Gallagher E.* Polyphenol composition and in vitro antioxidant activity of amaranth, quinoa buckwheat, and wheat as affected by sprouting and baking // *Food Chem.* – 2010. – V. 119. – P. 770-778.
- Bronner W.E., Beecher G.R.* Method for determining the content of catechins in tea infusions by high-performance liquid chromatography // *J. Chromatography.* – 1998. – V. 805. – P. 137-142.
- Cai Z., Kastell A., Mewis I., Knorr D., Smetanska I.* Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* // *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* – 2012. – V. 108. – P. 401-409.
- Golisz A., Lata B., Gawronski S., Fujii Y.* Specific and total activities of the allelochemicals identified in buckwheat // *Weed Biol. Manag.* – 2007. – V. 7. – P. 164-171.
- Iqbal S., Bhangar M., Anwar F.* Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan // *Food Chem.* – 2005. – V. 93. – P. 265-272.
- Kim S. J., Tomoo M., Mohammed Z. I. S., Shigenobu T., Chie M. E., Hiroaki Y., Yuji M., Kasuichi S., Naoto H., Takahiro N., Tatsuya S., Tatsuro S.* Identification of Anthocyanins in the Sprouts of Buckwheat // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55. – P. 6314-6318.
- Kim S.L., Kim S.K., Park C.H.* Introduction and nutritional evaluation of buckwheat sprouts as a new vegetable // *Food Res. Int.* – 2004. – V. 37. – P. 319-327.
- Kim S. L., Zaidul I.S.M., Suzuki T., Yuji M., Naoto H.* Comparison of phenolic compositions between common and tartary buckwheat (*Fagopyrum*) sprouts // *Food Chem.* – 2008. – V. 110. – P. 814-820.
- Matkowski A.* Plant in vitro culture for the production of antioxidants-a review // *Biotechnol. Advances.* – 2008. – V. 26. – P. 548-560.
- Mewis I., Smetanska I., Muller C., Ulrichs C.* Specific polyphenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl. // *Biochem. Biotechnol.* – 2011. – V. 164. – P. 148-161.
- Molyneux P.* The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity Songklanakarin // *J. Sci. Technol.* – 2004. – V. 26. – P. 211-219.
- Moumou Y., Trotin F., Dubois J., Vasseur J., El-Boustani E.* Influence of culture conditions on polyphenol production by *Fagopyrum esculentum* tissue cultures // *J. Nat. Prod.* – 1992. – V. 55. – P. 33-38.
- Murashige T., Skoog F.* A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture // *Physiol. Plant.* – 1962. – V. 15. – P. 473-497.
- Rice-Evans C., Miller N., Pagang G.* Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids // *Free Rad. Biol. Med.* – 1996. – V. 20. – P. 933-956.
- Shi S., Morita H., Wanibuchi K., Mizuuchi Y., Noguchi H., Abe I.* Enzymatic synthesis of plant polyketides // *Curr. Org. Synth.* – 2008. – V. 5. – P. 250-266.
- Singleton V.L., Rossi, J.A.* Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents // *Am. J. Enol. Vitic.* – 1965. – V. 16. – P. 144-158.
- Watanabe M., Ayugase J.* Chiral separation of catechins in buckwheat groats and the effects of phenolic compounds in mice subjected to restraint stress // *J. Agric. Food Chem.* – 2009. – V. 57. – P. 6438-6442.
- Watanabe M.* Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.) groats // *J. Agri. Food Chem.* – 1998. – V. 46. – P. 839-845.
- Yao L. H., Jiang Y. M., Shi J., Tomas-Barberan F. A., Datta N., Singanusong R.* Flavonoids in Food and Their Health Benefits // *Plant Foods Hum. Nutr.* – 2004. – V. 59. – P. 113-122.

Надійшла до редакції
17. 12.2012 р.

PHENOLIC ANTIOXIDANTS IN BUCKWHEAT SEEDLINGS IN CULTURE IN VITRO

O. V. Sytar, V. O. Storozhenko A. M. Kosyan, N. Yu. Taran

*Taras Shevchenko Kyiv National University
(Kyiv Ukraine)*

Antioxidant activity, total phenols and phenolic composition was investigated by high performance liquid chromatography *in vitro* conditions. In extracts of seedling stems of buckwheat (*in vitro*

ФЕНОЛЬНІ АНТИОКСИДАНТИ У ПРОРОСТКАХ ГРЕЧКИ

culture) was identified the tendency of increasing of total phenol content and high antioxidant activity in buckwheat seedlings *in vitro*. In this conditions observed the high content of chlorogenic acid in leaves and stems of buckwheat seedlings as compared to other phenolic compounds. Caffeic acid, catechin, gallic acid, coumaric acid and quercetin were also identified in seedlings of buckwheat.

Key words: *Fagopyrum tataricum*, antioxidant activity, phenolics, *in vitro* culture

ФЕНОЛЬНЫЕ АНТИОКСИДАНТЫ В ПРОРОСТКАХ ГРЕЧИХИ В КУЛЬТУРЕ *IN VITRO*

О. В. Ситар, В. А. Стороженко, А. М. Косян, Н. Ю. Таран

*Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко
(Киев, Украина)*

В условиях *in vitro* была исследована антиоксидантная активность, общее содержание фенолов и композиция фенольных соединений с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. В экстрактах стеблей из проростков гречки в условиях культуры *in vitro* была выявлена тенденция к увеличению общего содержания фенолов и высокая антиоксидантная активность. В этих условиях наблюдали высокое содержание хлорогеновой кислоты как в листьях, так и в стеблях проростков гречихи по сравнению с другими фенольными соединениями. Также в проростках гречихи были идентифицированы кофейная кислота, катехины, галловая кислота и кумаровая кислоты, кверцетин.

Ключевые слова: *Fagopyrum tataricum*, антиоксидантная активность, фенолы, культура *in vitro*