

## ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ КИСЛОТ ГІДРОКСИКОРИЧНИХ У ТИРЛИЧУ ХРЕЩАТОГО ТРАВИ (*GENTIANA CRUCIATA* L.)

**Ключові слова:** кислоти гідроксикоричні, тирлич хрещатий, спектрофотометричний метод, високоефективна рідинна хроматографія

Тирлич хрещатий (*Gentiana cruciata* L.) – багаторічна трав'яниста рослина родини тирличеві (*Gentianaceae*). Ареалом поширення досліджуваного об'єкта є територія України, а саме південна частина лісових районів, лісостеп та Крим. Зростає тирлич хрещатий на сухих луках і схилах, серед чагарників, у молодих рідких соснових лісах та по узліссях.

Із давніх-давен рослину широко застосовують у народній медицині для збудження апетиту, стимулювання секреції травних залоз, посилення моторики травного каналу, а також як протизапальний, антисептичний та антигельмінтний засіб [1]. Фармакологічна активність тирличу хрещатого зумовлена наявністю біологічно активних речовин (БАР), вміст яких недостатньо вивчений. Одними з таких БАР є кислоти гідроксикоричні.

### Матеріали та методи дослідження

Об'єктом для досліджень була тирличу хрещатого трава, заготовлена на території урочища Волове Тернопільської області у період цвітіння рослин у 2014 році.

Наявність кислот гідроксикоричних у тирличу хрещатого траві встановлювали за реакцією з розчином ферум (III) хлориду.

Для визначення якісного складу кислот гідроксикоричних готували спиртово-водний витяг із сировини. Для цього 2,0 г подрібненої сировини вміщували у колбу ємністю 250 мл і заливали 70 мл етанолу (20%, об/об) *P*. Колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на водяній бані протягом 15 хв. Отриманий витяг фільтрували через паперовий фільтр. Екстракцію сировини повторювали двічі новими порціями екстрагента. Об'єднані витяги концентрували і хроматографували на папері Filtrak FN 4 (ПХ – хроматографія на папері) у системі розчинників: *n*-бутанол–кислота оцтова–вода (4:1:2). Хроматограму висушували у сушильній шафі та розглядали в ультрафіолетовому світлі до і після проявлення парами амоніаку.

Кількісний вміст суми кислот гідроксикоричних визначали відповідно до вимог Європейської фармакопеї методом спектрофотометрії.

**Вихідний розчин.** 0,2 г (точна наважка) подрібненої на порошок сировини вміщували у колбу об'ємом 250 мл, додавали 190 мл етанолу (50%, об/об) *P*, нагрівали зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 30 хв, охолоджували до кімнатної температури та фільтрували у мірну колбу ємністю 200 мл. Фільтр промивали 10 мл етанолу (50%, об/об) *P* і промивну рідину фільтрували у ту саму мірну колбу. Доводили об'єм розчину етанолом (50%, об/об) *P* до позначки і перемішували.

**Випробовуваний розчин.** 1 мл вихідного розчину вміщували у мірну колбу ємністю 10 мл, послідовно додавали, перемішуючи після кожного додавання, 2 мл 0,5 М

розчину кислоти хлоридної  $P$ , 2 мл свіжоприготовленого розчину 10 г натрію нітриту  $P$  і 10 г натрію молібдату  $P$  у 100 мл води  $P$ , 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного  $P$ , доводили об'єм розчину водою  $P$  до позначки та перемішували.

*Компенсаційний розчин.* 1 мл вихідного розчину вміщували у мірну колбу об'ємом 10 мл, послідовно додавали, перемішуючи після кожного додавання, 2 мл 0,5 М розчину кислоти хлоридної  $P$  і 2 мл натрію гідроксиду розчину розведеного  $P$ , доводили об'єм розчину водою  $P$  до позначки та перемішували.

Відразу вимірювали оптичну густину випробовуваного розчину за довжини хвилі 505 нм у кюветі з шаром завтовшки 10 мм, використовуючи як розчин порівняння компенсаційний розчин.

Вміст суми кислот гідроксикоричних, у перерахунку на кислоту розмаринову, у відсотках, обчислювали за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 5}{m},$$

де  $A$  – оптична густина випробовуваного розчину за довжини хвилі 505 нм;

$m$  – маса наважки випробуваної сировини, г [2].

Дослідження якісного складу та кількісного вмісту кислот гідроксикоричних у траві *Gentiana cruciata* L. виконували також методом вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Хроматографічне розділення здійснювали на рідинному хроматографі Agilent 1200 3 D LC System Technologies (США) із діодноматричним детектором G1315C, на колонці Supelco Discovery C18 HPLC column 5 мкм, за температури термостата колонок 25 °С. Введення проби здійснювали автосамплером, обсяг проби 10 мкл, швидкість потоку – 0,7 мл/хв, робочий тиск елюента – 10 000–12 000 кПа.

Для приготування рухомої фази використовували ацетонітрил марки Chromasolv gradient grade, for HPLC, > 99,9% (Sigma-Aldrich), кислоту ортофосфатну – Chromasolv gradient grade, for HPLC, > 99,9% (Sigma-Aldrich), бідистильовану воду отримували на Simplicity SIMSV00 Water Purification System Millipore (Merck KGaA, Darmstadt, Німеччина). Для екстракції кислот гідроксикоричних застосовували метанол марки Chromasolv gradient grade, for HPLC, > 99,9% (Sigma-Aldrich). Стандартні речовини – хлорогенова, кофейна,  $n$ -кумарова, ферулова, розмаринова кислоти – виробництва Sigma Chemical Co.

Підготовка проб для аналізу: близько 1 г рослинної сировини (точна наважка), екстрагували 50 мл 60%-го розчину метанолу  $P$  протягом 15 хв на водяній бані зі зворотним холодильником за перемішування. Після цього фільтрували, кількісно переносили в мірну колбу ємністю 100 мл і доводили до мітки об'єм розчину 60%-м метанолом  $P$ . Одержаний розчин відфільтровували через мембранний фільтр із розміром пор 0,45 мкм.

Для поділу фенольних сполук застосовували такі умови: градієнтне елюювання сумішшю бідистильованої води підкисленої кислотою ортофосфатною до рН = 2,85 (А) і ацетонітрилу (В): 0 хв 5% «В», 8 хв 8% «В», 15 хв 10% «В», 30 хв 20% «В», 40 хв 40% «В», 41–42 хв 75% «В», 43–50 хв 5% за довжини детектування 320 і 330 нм [3, 4, 5].

### **Результати дослідження та обговорення**

У результаті взаємодії спиртово-водного витягу з розчином ферум (III) хлориду спостерігали появу зелено-сіруватого забарвлення, що свідчить про наявність у тирличу хрещатого траві сполук фенольної природи.

Методом ПХ у досліджуваній сировині тирличу хрещатого виявлено наявність ферулової, розмаринової, неохлорогенової та кофейної кислот (рис. 1).

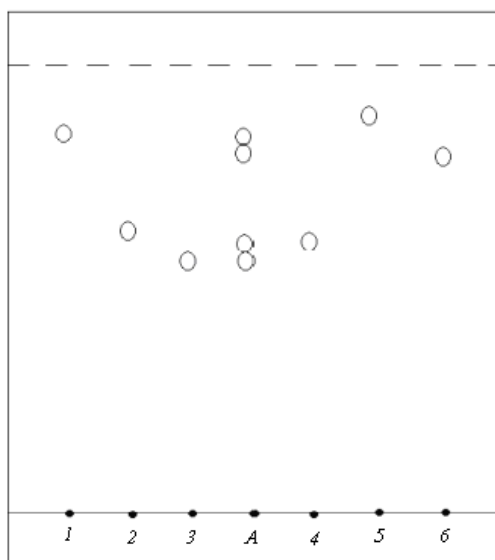


Рис. 1. Хроматограма водно-спиртового витягу трави *Gentiana cruciata* L.(А):  
 1 – кислота ферулова; 2 – кислота хлорогенова; 3 – кислота розмаринова;  
 4 – кислота неохлорогенова; 5 – кислота *n*-кумарова; 6 – кислота кофейна.  
 Система розчинників: *n*-бутанол–кислота оцтова–вода (4:1:2)

Хроматографічну характеристику ідентифікованих кислот гідроксикоричних наведено в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

**Хроматографічна характеристика кислот гідроксикоричних, виявлених у тирличу хрещатого трави**

Кислоти гідроксикоричні	Забарвлення		Rf
	в УФ-світлі	+ пари амоніаку	
Кислота ферулова	Блакитне	Фіолетово-блакитне	0,85
Кислота розмаринова	Блакитне	Зелено-блакитне	0,56
Кислота неохлорогенова	Блакитне	Зелено-блакитне	0,61
Кислота кофейна	Блакитне	Світло-блакитне	0,80

Кількісний вміст суми кислот гідроксикоричних, визначених спектрофотометричним методом, у перерахунку на кислоту розмаринову наведено в табл. 2.

Т а б л и ц я 2

**Метрологічна характеристика результатів кількісного вмісту суми кислот гідроксикоричних у тирличу хрещатого трави**

<i>m</i>	<i>f</i>	$X_i$	$X_{\text{сеп}}$	$S^2$	$S_{\text{сеп}}$	<i>P</i>	$t(P, f)$	Кількісний вміст	$\epsilon, \%$
5	4	3,7622	3,7525	0,00004429	0,0030	0,95	2,78	$3,7525 \pm 0,0083$	0,220
		3,7452							
		3,7476							
		3,7524							
		3,7549							

Результати визначення індивідуальних кислот гідроксикоричних тирличу хрещатого трави методом ВЕРХ наведено на рис. 2 та у табл. 3.

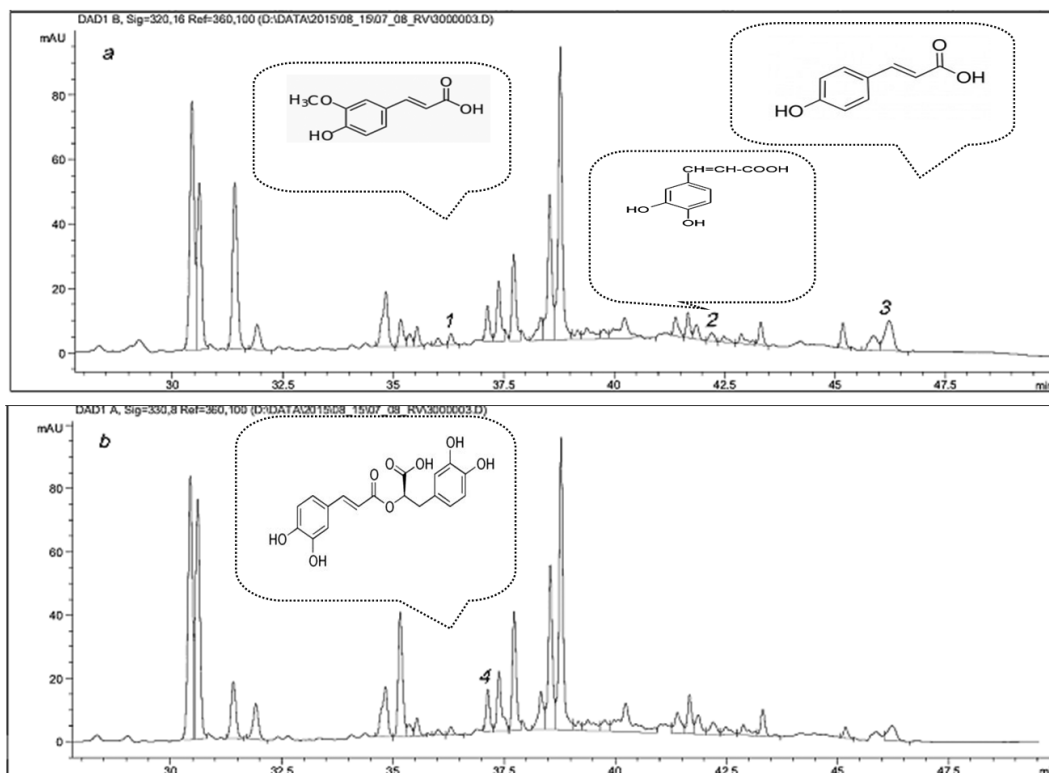


Рис. 2. Хроматограма водно-спиртового витягу трави *Gentiana cruciata* L. за  $\lambda = 320$  нм (а) та  $\lambda = 330$  нм (б):

1 – кислота ферулова; 2 – кислота кофейна; 3 – кислота *n*-кумарова,  
4 – кислота розмаринова

Т а б л и ц я 3

**Кількісний вміст індивідуальних кислот гідроксикоричних у траві *Gentiana cruciata* L.**

БАР	УФ-спектр $\lambda_{\max}$ , нм	RT, хв	Кількісний вміст, %
Кислота ферулова (3-метокси-4-гідроксикорична кислота)	320	36,305	$10,58 \cdot 10^{-3}$
Кислота кофейна (3,4-дигідроксикорична кислота)	320	42,208	$19,36 \cdot 10^{-3}$
Кислота <i>n</i> -кумарова (4-гідроксикорична кислота)	320	46,229	$16,04 \cdot 10^{-3}$
Кислота розмаринова (депсид 3,4-дигідроксикоричної кислоти)	330	37,136	$51,28 \cdot 10^{-3}$

За результатами ВЕРХ-аналізу встановлено, що трава *Gentiana cruciata* L. містить кислоти ферулову, кофейну, *n*-кумарову і розмаринову.

**В и с н о в к и**

1. Методом ПХ у тирличу хрещатого траві вперше виявлено кислоти гідроксикоричні: ферулову, розмаринову, неохлорогенову та кофейну.

2. Встановлено кількісний вміст суми кислот гідроксикоричних у тирличу хрещатого траві, що становив  $3,75 \pm 0,01\%$  у перерахунку на кислоту розмаринову.

3. Методом ВЕРХ ідентифіковано 4 кислоти гідроксикоричних, вміст яких становив: ферулової –  $10,58 \cdot 10^{-3}\%$ , кофейної –  $19,36 \cdot 10^{-3}\%$ , *n*-кумарової –  $16,04 \cdot 10^{-3}\%$ , розмаринової –  $51,28 \cdot 10^{-3}\%$ . Домінуючою є кислота розмаринова.

## Список використаної літератури

1. Гродзінський А. М. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник. – К.: Олімп, 1992. – 544 с.
2. European Pharmacopoeia. 6th edition. – Council of Europe. – Strasbourg, France, 2007. – 3308 p.
3. Hauser M., Ganzera M., Abel G. et al. Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography // *Chromatographia*. – 2002. – V. 56, N 7/8. – P. 407–411.
4. Медведев Ю. В., Передеряев О. И., Арзамасцев А. П. и др. Определение гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения // *Вопр. биол. мед. фармац. химии*. – 2010. – № 3. – С. 25–31.
5. Марчишин С. М., Стойко Л. І. Визначення фенольних сполук у траві *Centaurium erythraea* Rafn. методом ВЕРХ // *Фармац. часопис*. – 2014. – № 1 (29). – С. 15–17.

Надійшла до редакції 18 липня 2016 року.

С. М. Марчишин, Л. І. Стойко, І. С. Дахим  
ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет  
имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины»

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА И КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ КИСЛОТ ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ В ГОРЕЧАВКИ КРЕСТОВИДНОЙ ТРАВЕ (*GENTIANA CRUCIATA* L.)

**Ключевые слова:** кислоты гидроксикоричные, горечавка крестовидная, спектрофотометрический метод, высокоэффективная жидкостная хроматография

## АННОТАЦІЯ

Горечавка крестовидная (*Gentiana cruciata* L.) – многолетнее травянистое растение семейства горечавковые (*Gentianaceae*). Ареалом распространения исследуемого объекта является территория Украины, а именно южная часть лесных районов, лесостепь и Крым. Растет горечавка крестовидная на сухих лугах и склонах, среди кустарников, в молодых редких сосновых лесах и по опушкам.

С давних времен растение широко применяют в народной медицине для возбуждения аппетита, стимулирования секреции пищеварительных желез, усиление моторики желудочно-кишечного тракта, а также как противовоспалительное, антисептическое и антигельминтное средство. Фармакологическая активность горечавки крестовидной обусловлена наличием биологически активных веществ, содержание которых недостаточно изучено. Одними из таких биологически активных веществ являются кислоты гидроксикоричные.

Объектом для исследований была горечавка крестовидной трава, заготовленная на территории урочища Воловое Тернопольской области в период цветения растений в 2014 году.

Наличие кислот гидроксикоричных в горечавки крестовидной траве устанавливали по реакции с раствором железа (III) хлорида. Наблюдали появление зелено-серого цвета, который свидетельствует о наличии в горечавки крестовидной траве соединений фенольной природы.

Методом бумажной хроматографии в горечавки крестовидной траве впервые обнаружены кислоты гидроксикоричные: феруловая, розмариновая, неохлорогеновая и кофейная.

Спектрофотометрически определяли количественное содержание суммы кислот гидроксикоричных в горечавки крестовидной траве, которое составило  $3,75 \pm 0,01\%$  в пересчете на кислоту розмариновую.

Исследование качественного состава и количественного содержания кислот гидроксикоричных в траве *Gentiana cruciata* L. осуществляли также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Идентифицировано 4 кислоты гидроксикоричных, содержание которых составляет: феруловой –  $10,58 \cdot 10^{-3}\%$ , кофейной –  $19,36 \cdot 10^{-3}\%$ , *n*-кумаровой –  $16,04 \cdot 10^{-3}\%$ , розмариновой –  $51,28 \cdot 10^{-3}\%$ . Доминирует кислота розмариновая.

**Key words:** hydroxycinnamic acids, *Gentiana cruciata* L., spectrophotometry, high- performance liquid chromatography

#### ABSTRACT

*Gentiana cruciata* L. is a herbaceous perennial flowering plant in the *Gentianaceae* family. This plant is widespread in the territory of Ukraine, namely the southern forest areas, forest-steppe and Crimea. *Gentiana cruciata* L. grows on dry meadows and slopes, among shrubs, young rare pine forests and along the edges.

From ancient times *Gentiana cruciata* L. was used in folk medicine as appetizing and stimulating the secretion of digestive glands agent; it increases the motility of digestive tract. *Gentiana cruciata* L. also has anti-inflammatory, antiseptic and anthelmintic properties. Pharmacological action of *Gentiana cruciata* L. is caused by the presence of biologically active substances, the content of which is insufficiently studied. And hydroxycinnamic acids are among these substances.

The object of our research is the *Gentiana cruciata* L. herb, collected at territory Volove, Ternopil region, during flowering period in 2014.

Identification of hydroxycinnamic acids in *Gentiana cruciata* L. herb was performed using iron (III) chloride. The greenish gray colour appeared and this tells about the presence of phenolic substances in our object.

Using paper chromatography ferrulic, rosmarinic, neochlorogenic and caffeic acids were firstly identified in *Gentiana cruciata* L.

Content of hydroxycinnamic acids in our object was analyzed using spectrophotometry and it was determined at  $3,75 \pm 0,01\%$  in recalculation into rosmarinic acid.

Determination of qualitative and quantitative content of hydroxycinnamic acids in *Gentiana cruciata* L. was also performed using high-performance liquid chromatography. 4 hydroxycinnamic acids were identified and their content was determined at  $10,58 \cdot 10^{-3}\%$  for ferrulic acid,  $19,36 \cdot 10^{-3}\%$  for caffeic acid,  $16,04 \cdot 10^{-3}\%$  for *p*-coumaric acid, and  $51,28 \cdot 10^{-3}\%$  for rosmarinic acid. The highest content belongs to rosmarinic acid.

*Електронна адреса для листування з авторами: [svitlanafarm@ukr.net](mailto:svitlanafarm@ukr.net)*