

ПОРІВНЯЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ЕЛАГОВОЇ ТА ГАЛОВОЇ КИСЛОТ У СИРОВИНІ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДУ ГЕРАНЬ (*GERANIUM L.*) МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

Ключові слова: рослини роду Герань (*Geranium L.*), елагова кислота, галова кислота, високоєфективна рідинна хроматографія

Елагова та галова кислоти – сполуки, що відносяться до природних поліфенолів, похідних пірогалолу і входять до складу комплексів дубильних речовин, а саме елаго-, галотанінів та танінів змішаного типу.

Елагова кислота дуже поширена у рослинному світі як у вільному стані, так і у зв'язаному, зокрема у таких родинях рослин герані, як *Geraniaceae*, *Punicaceae*, *Betulaceae*, *Coriariaceae*, *Fagaceae*, *Hamamelidaceae*, *Lecythidiaceae*, *Lythraceae*, *Myrtaceae*, *Populaceae*, *Rosaceae* тощо. Галова кислота є одною із діючих речовин, що входить до складу танінів дуба звичайного, галів китайських, листя сумаху і скумпії, зеленого чаю тощо [3,7,8].

Галова та елагова кислоти виявляють сильні антиоксидантні та анти радикальні властивості; комплекси, що утворені цими речовинами, такі як гераніїн та корилагін справляють сильну протипухлинну дію. Похідні галової кислоти, такі як 6-о-галлоїл-D-глюкозид і 1,2,3,4,6-пента-о-галлоїл-b-D-глюкозид за літературними джерелами блокують вироблення норадреналіну і тим самим справляють гіпотензивний ефект і можуть використовуватися для лікування гіпертензії [6, 7, 8]. Вільна елагова кислота привертає до себе увагу вчених різних країн світу як перспективна сполука з багатогранною фармакологічною дією: антиоксидантною, противірусною, антирадикальною, кардіопротекторною, протипухлинною тощо [4, 5, 7, 8].

Попередньо були ідентифіковані і кількісно визначені галова та елагова кислота у витяжках із сировини герані методами тонкошарової хроматографії (ТШХ) та високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), спектрофотометричним методом було встановлено кількісний вміст поліфенольних сполук [1,2].

Отримані дані дають можливість стверджувати, що дані сполуки та їхні комплекси є основними діючими речовинами сировини герані. Це спонукало до поглибленого вивчення питань, які стосуються кількісного вмісту у рослинній сировині герані галової та елагової кислот як у вільній формі, так і зв'язаній, накопичення цих речовин залежно від фази вегетації та органу рослини. Отже, метою роботи було ідентифікувати і встановити кількісний вміст елагової та галової кислоти у траві і кореневищах різних видів рослин роду Герань (*Geranium L.*) залежно від онтогенезу – початок вегетації та масове цвітіння з використанням хроматографічних методів аналізу.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були: трава і кореневища чотирьох видів роду Герань (*Geranium L.*): г. Роберта (*G. robertianum L.*), г. криваво-червона (*G. sanguineum L.*), г. сибірська (*G. sibiricum L.*) та г. великокореневищна (*G. macrorrhizum L.*), що були зібрані на початку вегетації (перша декада травня 2010 р.) та у фазу масового цвітіння (початок липня 2010 р.) на дослідних ділянках Національного ботанічного саду

ім. М.М. Гришка НАН України і Ботанічного саду імені акад. О.В. Фоміна Київського національного університету ім. Тараса Шевченка.

Екстракти досліджуваної сировини герані отримували шляхом вичерпної екстракції повітряно-сухої сировини 70 % спиртом етиловим (співвідношення сировина–екстрагент – 1:50). Частину кожного з отриманих екстрактів піддавали гідролізу з 1М хлористоводневою кислотою протягом 60 хв.

Ідентифікацію та кількісне елагової та галової кислот проводили методом ВЕРХ на рідинному хроматографі «Shimadzu LC-20». Використовували колонку з сорбентом типу «C18, Symmetry», з розмірами 250*4,6 мм і розміром зерна 5 мкм. В якості рухомих фаз використовували суміші ацетонітрилу (для ВЕРХ) і розчину 5% фосфорної кислоти (*Sigma Aldrich*) у співвідношеннях 10об:90об і 90об:10об. Подача рухомих фаз відбувалася у градієнтному режимі. Детектування проводили при довжині хвилі 360 нм. Інжектували по 10 мкл досліджуваних екстрактів сировини герані до та після гідролізу і розчини вірогідних стандартних зразків галової та елагової кислот з точно відомою концентрацією. До гідролізу розраховували кількісний вміст вільної галової та елагової кислот. Після гідролізу визначали сумарний вміст галової та елагової кислот у сировині. За різницею між двома значеннями розраховували кількісний вміст зв'язаної галової та елагової кислот.

Результати дослідження та їх обговорення

Результати дослідження елагової та галової кислот у сировині герані методом ВЕРХ представлені в таблиці, а хроматограма стандартного зразка елагової кислоти та деяких екстрактів герані представлено на рисунках 1–3.

Т а б л и ц я

Результати дослідження кількісного вмісту елагової та галової кислот у сировині герані

Об'єкт дослідження	Фаза вегетації	Частина рослини	Вміст у мг на 100 г абсолютно сухої сировини					
			Галова кислота			Елагова кислота		
			Вільна галова кислота	Зв'язана галова кислота	Σ	Вільна елагова кислота	Зв'язана елагова кислота	Σ
Г. Роберта	*ПВ	Трава	0,52	3,35	3,87	5,83	0,90	6,70
		Кореневище	0,44	2,91	3,35	2,37	0,82	3,19
	**МЦ	Трава	0,76	1,59	2,35	4,95	5,07	10,02
		Кореневище	0,34	1,02	1,36	3,36	2,93	6,28
Г. криваво-червона	ПВ	Трава	3,29	7,79	11,08	4,66	2,41	7,07
		Кореневище	0,84	0,41	1,25	0,03	0,04	0,07
	МЦ	Трава	4,69	4,42	9,11	3,82	0,73	4,55
		Кореневище	0,46	0,53	0,99	0,08	0,11	0,21
Г. сибірська	ПВ	Трава	2,52	2,29	4,81	5,10	2,15	7,25
		Кореневище	2,07	4,53	6,60	1,51	2,62	4,14
	МЦ	Трава	1,35	1,80	3,15	3,95	1,25	5,20
		Кореневище	1,52	1,04	2,56	0,96	2,33	3,29
Г. велико-кореневищна	ПВ	Трава	1,11	16,23	17,34	6,11	5,35	11,46
		Кореневище	1,00	1,97	2,98	1,36	1,84	3,20
	МЦ	Трава	0,75	6,55	7,29	4,55	3,19	7,74
		Кореневище	1,73	1,93	3,66	1,25	4,35	5,60

* «ПВ» – початок вегетації,

** «МЦ» – фенофаза масового цвітіння.

Відносна похибка експеримента – не більше ніж 2 %.

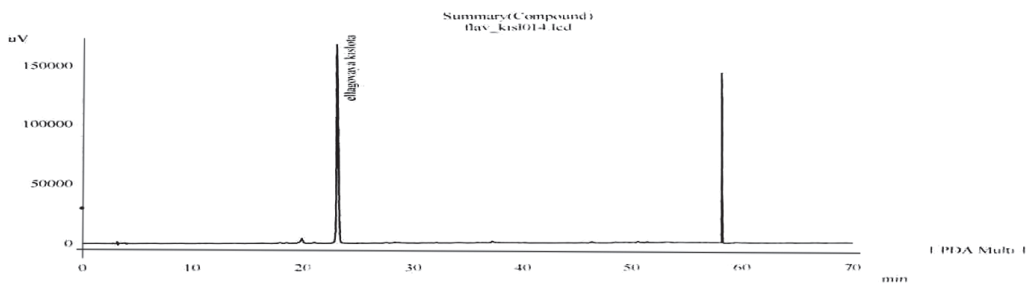


Рис. 1. Хроматограма стандартного зразка елагової кислоти

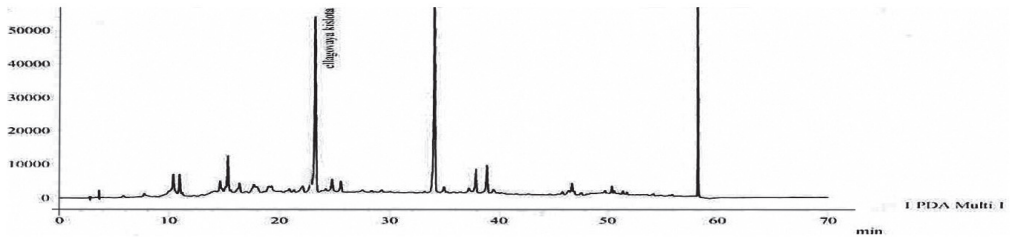


Рис. 2. Хроматограма екстракту трави герані великокореневищної після гідролізу

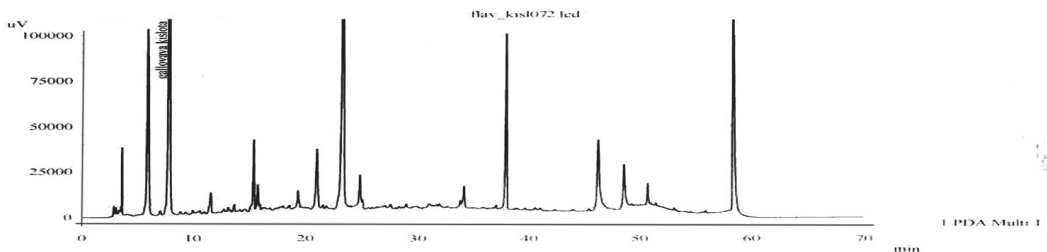


Рис. 3. Хроматограма екстракту трави герані криваво-червоної після гідролізу

Як випливає з таблиці вся досліджувана сировина герані містить як вільні, так і зв'язані елагову та галову кислоти. Найбільший кількісний вміст вільної галової кислоти встановлено для трави г. криваво-червоної у фенофазу масового цвітіння – 4,69 мг/100 г, а зв'язаної – для трави г. великокореневищної на початку вегетації – 16,23 мг/100 г. При цьому для трави г. великокореневищної на початку вегетації виявлено і найвищий сумарний вміст галової кислоти серед досліджуваних зразків сировини – 17,34 мг/100 г. Найбільший кількісний вміст вільної та зв'язаної елагової кислот і відповідно сумарний вміст елагової кислоти встановлено для трави г. великокореневищної на початку вегетації – 6,11 мг/10 г, 5,35 мг/100 г і 11,46 мг/100 г відповідно. Порівнюючи кількісний вміст галової кислоти у надземній та підземній частинах герані, варто відмітити, що у траві г. криваво-червоної галової кислоти як зв'язаної, так і вільної міститься більше, ніж у кореневищах – у 20 і 4 рази на початку вегетації та у 8 і 10 разів у фазу масового цвітіння відповідно. Таким чином, у процесі вегетації в траві підвищується вміст вільної галової кислоти і зменшується вміст зв'язаної, а в кореневищах навпаки.

Вміст вільної та зв'язаної галової кислоти у траві г. Роберта також перевищує вміст цих речовин у кореневищах. На відміну від г. Роберта у г. сибірської та г. великокореневищної спостерігається вищий вміст у траві вільної галової кислоти на початку вегетації та зв'язаної галової кислоти у фазу масового цвітіння, а також у г. великокореневищної вищий вміст зв'язаної галової кислоти у траві і на початку вегетації – 16,23 мг/100 г і 1,97 мг/100 г у траві і кореневищах відповідно.

Порівнюючи кількісний вміст елагової кислоти у траві та кореневищах герані встановлено, що для двох видів герані г. Роберта та г. криваво-червоної вміст вільної, зв'язаної та відповідно сумарний вміст елагової кислоти вищий у траві, ніж у кореневищах, так само як і вміст вільної та зв'язаної галової кислоти – в обох фазах вегетації. Причому найбільш суттєва різниця за вмістом вільної елагової кислоти у траві та кореневищах спостерігається для г. криваво-червоної – 4,66 мг/100 г і 0,03 мг/100 г відповідно. Для сировини г. сибірської та г. великокореневищної локалізація елагової кислоти дещо відрізняється від показників для г. Роберта і г. криваво-червоної і збігається з характером локалізації галової кислоти у цих видах герані. А саме, на початку вегетації вміст вільної та зв'язаної елагової кислоти у траві г. великокореневищної перевищує вміст у кореневищах; г. сибірська має вищий вміст вільної елагової кислоти на початку вегетації у траві та зв'язаної елагової кислоти у кореневищах. У фазу масового цвітіння характер локалізації вільної та зв'язаної елагової кислоти змінюється у порівнянні з галовою, і вищий вміст вільної елагової кислоти спостерігається у траві г. сибірської і г. великокореневищної у порівнянні з кореневищами, а зв'язаної елагової кислоти у кореневищах виявилось більше, ніж у траві.

У результаті проведеного дослідження можна стверджувати, що характер і форма локалізації галової та елагової кислот залежить від виду герані. Так для г. Роберта характерно вищий вміст зв'язаної галової кислоти, ніж вільної на відміну від інших видів герані. Більший вміст зв'язаної галової кислоти у порівнянні з вільною також характерний для г. великокореневищної, але на відміну від г. Роберта у кореневищах цього виду герані спостерігається вищий вміст зв'язаної елагової кислоти, а в траві – вільної.

Діагностичною ознакою г. криваво-червоної може бути незначний вміст вільної та зв'язаної елагової кислоти у кореневищах, а також вищий сумарний вміст галової кислоти у порівнянні з елаговою, на відміну від інших досліджуваних видів герані, де сумарний вміст елагової кислоти перевищує вміст галової.

В и с н о в к и

1. Методом ВЕРХ було ідентифіковано і встановлено кількісний вміст елагової та галової кислот у траві та кореневищах чотирьох видів роду Герань (*Geranium L.*): г. Роберта (*G. robertianum L.*), г. криваво-червоної (*G. sanguineum L.*), г. сибірської (*G. sibiricum L.*) та г. великокореневищної (*G. macrorrhizum L.*) залежно від фази онтогенезу – початок вегетації та масове цвітіння.

2. Найбільший кількісний вміст вільної галової кислоти встановлено для трави г. криваво-червоної у фенофазу масового цвітіння – 4,69 мг/100 г, а зв'язаної і також найбільший сумарний вміст галової кислоти характерний для трави г. великокореневищної на початку вегетації – 16,23 мг/100 г і 17,34 мг/100 г відповідно.

3. Найбільший кількісний вміст вільної та зв'язаної елагової кислоти, встановлено для трави г. великокореневищної на початку вегетації – 6,11 мг/100 г і 5,35 мг/100 г, також для цього виду сировини встановлено і найвищий кількісний сумарний вміст елагової кислоти – 11,46 мг/100 г.

4. Тенденції локалізації та накопичення вільної, зв'язаної елагової і галової кислот є індивідуальними для всіх досліджуваних видів герані і може бути діагностичною ознакою видів.

5. Трава г. великокореневищної на початку вегетації за результатами дослідження є перспективною сировиною з потенціальною кардіопротекторною, гіпотензивною, протипухлинною та противірусною активністю.

6. Трава г. великокореневищної та г. Роберта на початку вегетації є перспективним джерелом для отримання елагової кислоти.

1. Рибак Л.М. Дослідження поліфенольних комплексів деяких видів герані флори України методом ВЕРХ // VII Національний з'їзд фармацевтів України «Фармація України. Погляд у майбутнє»: Тез. доп. – Харків, 15–17 вересня 2010. – Т.1 – С.331–332.

2. Рибак Л.М. Порівняльне дослідження кількісного вмісту поліфенолів у різних видах герані *Geranium L.* методом перманганатометричного титрування та спектрофотометричним методом/ Л.М.Рибак, О.Ю.Коновалова, О.П.Колядич // Фармацевтичний журнал. – 2010. – № 6. – С. 44–47.

3. Хворост О.П. Эллаговая кислота, распространенность в растительном мире и аспекты биологической активности / О.П.Хворост, А.Г.Сербин, Л.В.Яковлева та інші // Провизор. – 1998. – № 9. –С. 40–41.

4. Chemistry and biology of ellagitannins: an underestimated class of bioactive plant polyphenols/ [edit. S.Quideau]. Singapore: World Scientific, 2009. – 374 p.

5. Hagiwara Y. Ellagic acid, a natural polyphenolic compound, induces apoptosis and potentiates retinoic acid-induced differentiation of human leukemia HL-60 cells / Y.Hagiwara, T.Kasukabe, Y.Kaneko, N.Niitsu, J. Okabe-Kado // Int. J. Hematol. – 2010. – № 92(1). – P. 136–143.

6. Pat. 5266319 Uniyed States of America, A61K 35/78, A61K 31/70. Tannin derivatives and their use for treatment of hypertension/ Juei-Tang Cheng, Feng-Lin Hsu.;assignee, National Science Council, Taipei. - №853059; filed 18.03.92; date of patent 30.11.93.

7. Plant polyphenols: Chemistry and biology/ [edit. R.W.Hemingway, G.G.Gross, T.Yoshida]. New York: Plenum Press, 1999. – 926 p.

8. Plant polyphenols: Synthesis, properties, significance / [edit. R.W.Hemingway, P.E.Laks]. – New York: Plenum Press, 1992. – 1063 p.

Надійшла до редакції 07.11.2011.

Л.Н.Рыбак

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ЭЛЛАГОВОЙ И ГАЛЛОВОЙ КИСЛОТ В СЫРЬЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ГЕРАНЬ (*GERANIUM L.*) МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Ключевые слова: растения рода Герань (*Geranium L.*), эллаговая кислота, галловая кислота, высокоэффективная жидкостная хроматография

Методом ВЭЖХ было идентифицировано и установлено количественное содержание эллаговой и галловой кислот в траве и корневиках четырех видов рода Герань (*Geranium L.*): г. Роберта (*G. robertianum L.*), г. кроваво-красная (*G. sanguineum L.*), г. сибирская (*G. sibiricum L.*) и г. крупнокорневищная (*G. macrorrhizum L.*) в зависимости от фазы онтогенеза – начало вегетации и массовое цветение.

Л.М.Рыбак

A COMPARATIVE STUDY OF THE QUANTITATIVE CONTENT OF ELLAGIC AND GALLIC ACIDS IN RAW MATERIAL OF SOME SPECIES OF THE GENUS *GERANIUM L.* BY HPLC.

Key words: plants of genus *Geranium L.*, ellagic acide, gallic acide, high performance liquid chromatography

S U M M A R Y

HPLC has been identified and established the quantitative content of ellagic and gallic acid in the grass and rhizomes of 4 species of the genus *Geranium L.*: *G. robertianum L.*, *G. sanguineum L.*, *G. sibiricum L.* and *G. macrorrhizum L.*, depending on the phase of ontogeny - the beginning of the vegetation and mass blooming.