

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ТА КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ТРАВІ ТИМОФІЇВКИ ЛУЧНОЇ

Бондаренко І.С., Кисличенко В.С.

Національний фармацевтичний університет,
м. Харків, Україна

Вступ. Фенольні сполуки є унікальними компонентами серед ендогенних метаболітів вищих рослин. Фенольний комплекс будь-якої рослини численний за складом і різноманітний за структурою. Вміст фенольних сполук в окремих органах рослини варіює у дуже широких межах: від десятих-сотих часток до багатьох відсотків. Серед фармакологічних властивостей фенольних сполук слід виділити антиоксидантну, радикальнозв'язуючу і комплексоутворюючу активності цих речовин, завдяки чому вони здатні гасити окислювальний «вибух», нейтралізувати активні радикали та виводити з організму важкі метали та радіоактивні елементи, тобто захищати рослини та живі організми від дії несприятливих факторів. Також фенольним сполукам притаманна протипроменева, спазмолітична, ранозагоювальна, протизапальна, гіпоглікемічна, протипухлинна, бактерицидна та капілярозміцнювальна активність [1, 4, 5, 7, 12].

Високий вміст фенольних сполук у рослинах, універсальне поширення та широкий спектр фармакологічних властивостей створюють підґрунтя для їх поглибленого вивчення для створення лікарських рослинних засобів на їх основі. Новим джерелом фенольних сполук можуть стати малодосліджені рослини із досвідом застосування у традиційній медицині.

Рід Тимофіївка (*Phleum* L.), який належить до родини злакових (*Poaceae*), в Україні представлений 3 видами: тимофіївкою лучною (*Phleum pratense* L.), тимофіївкою степовою (*Phleum phleoides* (L.) Simk.) та тимофіївкою волотевидною (*Phleum paniculatum* Huds.), які ростуть на луках, гірських полонинах, у степах, на кам'янистих схилах, піскуватих місцях тощо. З цих видів найпоширенішою є тимофіївка лучна, яка росте у нечорноземній смузі [8].

Це багаторічна, трав'яниста рослина, що формує пухкі кущики. Коренева система мочкувата, добре розвинена і проникає в ґрунт на 100-120 см. Стебла прямі, порожнисті, циліндричні, часто з цибулинками біля основи, з опуклими вузлами, з 5-7 листками на генеративних і 7-15 листками на вегетативних пагонах, до 120-140 см заввишки. Листки плоскі, шорсткі по краях, по краях зазубрені, розеткові до 30-35 см завдовжки, 0,4-0,9 см завширшки, стеблові до 15-18 см завдовжки, листкова пластинка світло-блакитного або зеленого кольору. Суцвіття - циліндрична волоть, слабкоконусоподібна, іноді подовжено-еліптична, шорстка, 5-12 см завдовжки. Колоски одноквіткові. Колоскові луски 2,5-3 мм завдовжки, білувато-синьо-зеленого кольору, з невеликим додаванням фіолетового, по кілю з довгими

віями, на верхівці з тупокутною вирізкою, що закінчується бічними довгими вистепоподібними загостреннями. Плід - плівчаста зернівка, сріблясто-сіра, овальна, дрібна. Цвіте з червня до вересня, плоди дозрівають із серпня до жовтня [6, 8].

Трава тимофіївки містить фенольні сполуки - кумарини, флавоноїди, дубильні речовини тощо. Також виявлені вітаміни, представлені аскорбіною кислотою, каротиноїдами, вітамінами групи В, та органічні кислоти, зокрема хелідонова та *p*-кумарова. У пилку міститься флавоноїд дактилін [6].

Традиційна медицина здавна застосовує траву тимофіївки як антимікробний, імуномодулюючий, протилихоманковий, протиревматичний засіб. Відвар трави у вигляді трав'яних ванн, обгортань сприяє збільшенню еластичності сполучної тканини судин, активізації тканинного обміну, його застосовують при лікуванні ревматичного болю, артрити, артрозу, радикуліту, при порушеннях функції нирок та сечового міхура. Кореневища тимофіївки використовують як болетамувальний засіб проти зубного болю. Траву тимофіївки використовують також як поживний зелений корм та сіно свійським тваринам [6].

Однак вивчення хімічного складу тимофіївки лучної носить фрагментарний характер, що не дозволяє використовувати її у доказовій медицині.

Метою роботи було вивчення фенольних сполук методом ВЕРХ та визначення їх кількісного вмісту у траві тимофіївки лучної.

Матеріали та методи. Для дослідження використовували траву тимофіївки лучної, заготовлену у серпні 2022 року в Харківській області (Україна). Сировину сушили у затінку на відкритому повітрі, періодично перемішуючи.

Для екстракції фенольних сполук 0,500 г подрібненої сировини поміщали в конічну колбу місткістю 100 мл, з'єднували її зі зворотним холодильником, додавали 25,0 мл 70 % етанолу та нагрівали на водяній бані протягом 45 хв. Після цього одержану витяжку охолоджували до кімнатної температури та фільтрували через фільтр «червона стрічка» в мірну колбу місткістю 25,0 мл. Об'єм витяжки доводили до об'єму 25,0 мл 70 % етанолом.

Для аналізу флавоноїдів у траві тимофіївки лучної був проведений їх гідроліз, для чого до 0,500 г подрібненої сировини додавали 25,0 мл суміші наступного складу: 96 % етанол : вода : 25 % хлористоводнева кислота (25:20:5) і нагрівали протягом 90 хв на водяній бані. Після цього одержану витяжку охолоджували до кімнатної температури та фільтрували через фільтр «червона стрічка» в мірну колбу місткістю 25,0 мл. Об'єм витяжки доводили до об'єму 25,0 мл 70 % етанолом.

Визначення якісного складу та кількісного вмісту окремих фенольних сполук проводили методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) за допомогою рідинного хроматографа Agilent 1260 Infinity HPLC System, обладнаному діодноматричним детектором Shimadzu HPLC-system ser. 20. Умови хроматографування: об'єм інжекції – 5 мкл; швидкість рухомої фази – 1 мл/хв; температура термостату

колонки – 35°C; довжина хвилі детектування – 330 нм; колонка Phenomenex Luna C18(2) (Agilent Technologies, USA); 250 мм x 4,6 мм; 5,0 мкм. Градієнтне елюювання – елюєнт А: 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді, елюєнт Б: 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

Режим хроматографування:

Час, хв	Елюєнт А, %	Елюєнт Б, %
0–5	95	5
5–35	95 → 75	5 → 25
35–40	75	25
40–60	75 → 50	25 → 50
60–65	50 → 20	50 → 80
65–70	20	80
70–85	95	5

Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримування та відповідності УФ-спектрів речовинам-стандартам.

Розрахунки кількісного вмісту сполук проводили у перерахунку на абсолютно суху сировину за формулою, %:

$$X, \% = \frac{A_{pr} \times m_{st} \times V_{pr} \times P \times 100}{A_{st} \times V_{st} \times m_{pr} \times 100}$$

A_{pr} – площа піку речовини на хроматограмі досліджуваного розчину;

A_{st} – площа піку речовини на хроматограмі стандартного розчину;

m_{st} – наважка стандартного зразка речовини в стандартному розчині, мг;

m_{pr} – наважка витяжки, мг;

V_{pr} – розведення досліджуваного розчину, мл;

V_{st} – розведення стандартного розчину, мл;

P – активність стандарту, %.

Спектрофотометричні визначення виконували на спектрофотометрі Mecasys Optizen POP (Корея). Кількісне визначення вмісту похідних гідроксикоричних кислот визначали у перерахунку на хлорогенову кислоту за довжини хвилі 525 нм за методикою, наведеною у ДФУ 2.0, т. 3 (монографія «Кропиви листя») [11]. Визначення вмісту флавоноїдів проводили у перерахунку на рутин за довжини хвилі 425 нм за методикою ДФУ 2.1 (монографія «Софори квітки») [9]. Визначення вмісту суми поліфенольних сполук у перерахунку на пірогалол визначали із застосуванням фосфорно-молібденово-вольфрамового реактиву за довжини хвилі 760 нм за методикою ДФУ 2.0, т. 1 (загальна стаття 2.8.14 «Визначення танінів у лікарській рослинній сировині») [10].

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали відповідно до вимог ДФУ 2.0, т. 1 (загальні статті 5.3 «Статистичний аналіз результатів біологічних випробувань та кількісних визначень» та 5.3.N.1 «Статистичний аналіз результатів хімічного експерименту^N») за допомогою програми STATISTICA 8 (StatSoft inc., США) та пакета статистичних функцій програми Microsoft Excel [10].

Результати й обговорення

Попередньо нами була проведена оцінка якісного складу витяжок з трави тимोфіївки лучної за допомогою хімічних реакцій ідентифікації, методів тонкошарової хроматографії (ТШХ) на пластинках «Sorbfil ПТСХ П-А UV-254» у рухомій фазі н-бутанол – кислота оцтова льодяна – вода (4:1:2) та хроматографії на папері у рухомій фазі 15 % кислота оцтова [2, 3]. Хроматограми переглядали у денному та УФ-світлі до і після обробки парами амоніаку. В результаті проведеного аналізу підтверджено наявність у досліджуваній сировині фенольних сполук – флавоноїдів та дубильних речовин конденсованої природи, ідентифіковано рутин та хлорогенову кислоту [2, 3].

Методом ВЕРХ у траві тимофіївки лучної до та після гідролізу було ідентифіковано рутин, кверцетин та хлорогенову кислоту, а також визначено їх кількісний вміст. Результати ВЕРХ-дослідження сировини наведено в таблиці 1 та на рис. 1-2.

Таблиця 1. Результати хроматографічного вивчення фенольних сполук у траві тимофіївки лучної

Назва сполуки	Час утримування, хв	Вміст сполуки у абсолютно сухій сировині (m=3), мкг/г	
		до гідролізу	після гідролізу
Хлорогенова кислота	20,121	0,58±0,02	2,36±0,11
Рутин	34,181	326,40±16,28	268,09±13,35
Кверцетин	49,693	Не ідентифікована	500,62±22,31

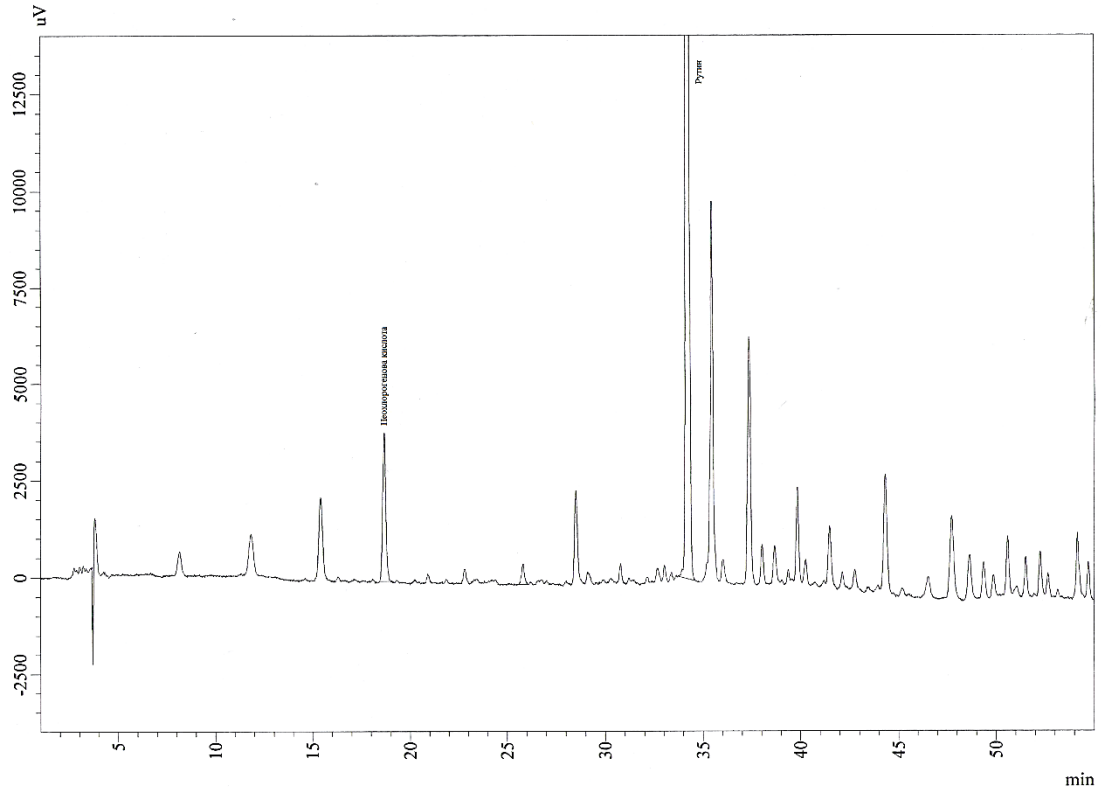


Рис. 1. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук трави тимофіївки лучної до гідролізу

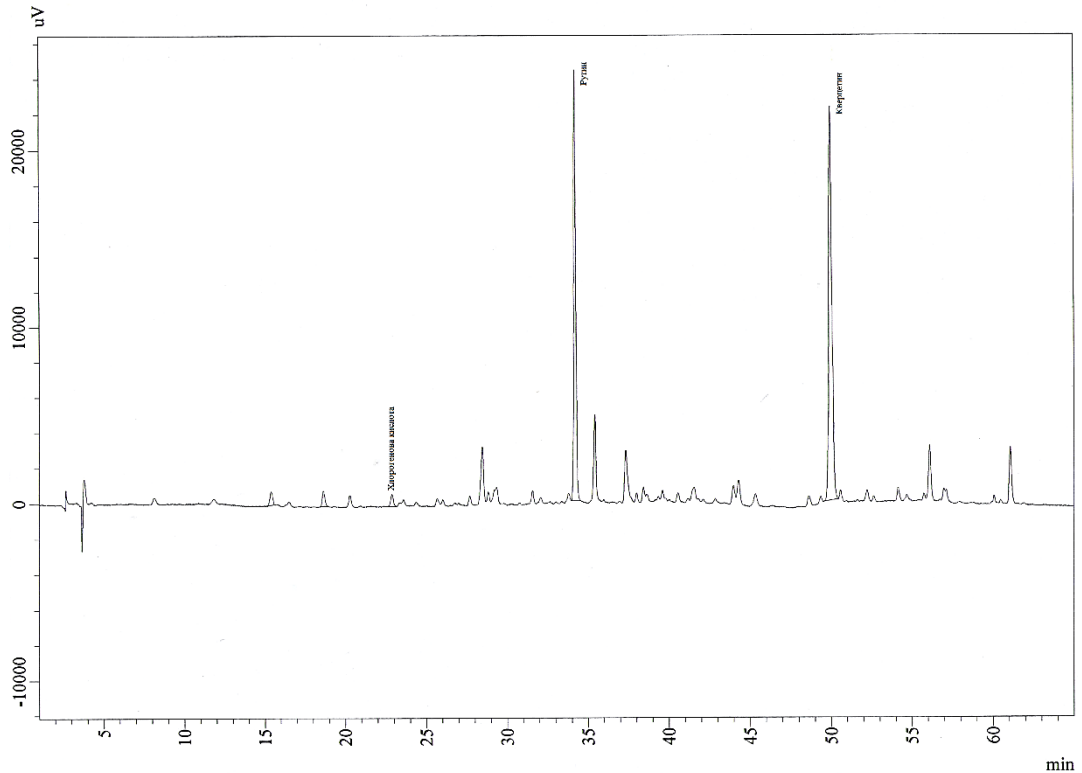


Рис. 2. ВЕРХ-хроматограма фенольних сполук трави тимофіївки лучної після гідролізу

За вмістом у траві тимофіївки лучної переважали флавоноїди: рутин (до гідролізу) - $326,40 \pm 16,28$ мкг/г та кверцетин (після гідролізу) - $500,62 \pm 22,31$ мкг/г, вміст хлорогенової кислоти був

значно менший - $0,58 \pm 0,02$ мкг/г (до гідролізу) та $2,36 \pm 0,11$ мкг/г (після гідролізу).

Результати визначення кількісного вмісту гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та суми поліфенольних сполук спектрофотометричним методом наведені у таблиці 2.

Таблиця 2. Результати спектрофотометричного визначення кількісного вмісту фенольних сполук у траві тимофіївки лучної

Назва групи БАР	Кількісний вміст у абсолютно сухій сировині (m=5), %
Гідроксикоричні кислоти у перерахунку на хлорогенову кислоту	0,73±0,02
Флавоноїди у перерахунку на рутин	1,08 ±0,02
Поліфенольні сполуки у перерахунку на пірогалол	0,11±0,01

Встановлено, що за вмістом у траві тимофіївки лучної переважають флавоноїди (1,08±0,02 %), дещо менший вміст гідроксикоричних кислот (0,73±0,02 %), вміст поліфенольних сполук незначний (0,11±0,01 %).

Відомо, що такі фенольні сполуки, як хлорогенова кислота та рутин можуть проявляти гіпоглікемічну, антирадикальну та антиоксидантну активність, кверцетин може позитивно впливати на метаболізм, перешкоджаючи розвитку ожиріння, а також проявляє антиоксидантну та антиканцерогенну активність [5, 12].

Висновки. Спектрофотометричним методом та методом ВЕРХ було встановлено кількісний вміст фенольних сполук (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів та поліфенольних сполук у перерахунку на пірогалол) у траві тимофіївки лучної. Ідентифіковані хлорогенова кислота, рутин та кверцетин. Було встановлено, що за вмістом переважали флавоноїди. Одержані дані свідчать про перспективність подальшого дослідження і, можливо, майбутнього застосування трави тимофіївки лучної як джерела фенольних сполук для розширення вітчизняної сировинної бази лікарських рослин і створення на їх основі лікарських засобів.

Study of the qualitative composition and quantitative content of phenolic compounds in the *Timothy herb* **Bondarenko I.S., Kyslychenko V.S.**

Introduction. The high content of phenolic compounds in plants, universal distribution and a wide range of pharmacological properties create the basis for their in-depth study in order to create herbal medicinal products based on them. Little-studied plants with experience in traditional medicine can become a new source of phenolic compounds. Such plants include timothy (*Phleum pratense* L.) of the *Poaceae* family. Timothy herb contains phenolic compounds - coumarins, tannins, flavonoids, etc. Vitamins are represented by ascorbic acid, carotenoids, vitamins of group B, and organic acids, in particular chelidonic and *p*-coumaric acids, were also detected. The pollen contains the flavonoid dactylin. Timothy herb has been used in traditional medicine for long time as an antimicrobial, immunomodulatory, antipyretic, antirheumatic agent. A herb decoction in the form of herbal baths and wraps helps to increase the elasticity of the connective tissue of blood vessels, activate tissue metabolism. It is also used in the treatment of viral infection, rheumatic pains, arthritis, arthrosis, sciatica, and disorders of kidney and bladder function. Timothy rhizomes are used as a painkiller against toothache. Timothy herb is used as nutritious green

fodder and hay for domestic animals. However, the study of the chemical composition of timothy is fragmentary, which does not allow its use in evidence-based medicine. The **aim** of the work was to perform a comparative study of phenolic compounds in the timothy herb. **Materials and methods.** The study of hydroxycinnamic acids and flavonoids in timothy herb was carried out by high-performance liquid chromatography (HPLC) on an Agilent 1260 Infinity HPLC System liquid chromatograph. A spectrometric method was used to determine biologically active substances in the studied plant raw materials. Determination of the quantitative content of hydroxycinnamic acids was carried out in accordance with the methodology of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPU) 2.0, volume 3, monograph "Leaves of Nettle"; the content of flavonoids was determined according to the SPU 2.0, Appendix 1, monograph "Flowers of the pagoda tree" method; the content of the sum of polyphenolic compounds was determined according to the SPU 2.0, volume 1, monograph "Determination of tannins in medicinal products of plant origin" method. **Results and discussion.** As a result of a study, hydroxycinnamic acids and flavonoids were detected in timothy herb by HPLC methods. Chlorogenic acids were identified among hydroxycinnamic acids. Rutin and quercetin were identified among flavonoids. The following flavonoids prevailed in timothy herb content: rutin (before hydrolysis) equaled 326.40±16.28 µg/g and quercetin (after hydrolysis) equaled 500.62±22.31 µg/g. It was determined that the content of timothy herb was dominated by flavonoids (1.08±0.02%), the content of hydroxycinnamic acids was slightly lower (0.73±0.02%), the content of polyphenolic compounds turned out to be insignificant (0.11±0.01 %). **Conclusion.** Quantitative content of phenolic compounds (hydroxycinnamic acids, flavonoids and polyphenolic compounds in terms of pyrogallol) in timothy herb was determined by spectrophotometry and HPLC techniques. Chlorogenic acid, rutin and quercetin have been identified. It was detected that flavonoids prevailed in terms of content. The obtained data indicate the perspective of further research and, possibly, the future use of timothy herb as a source of phenolic compounds for expanding the domestic plant raw material base of medicinal plants and creating medicinal products on their basis.

Keywords: Timothy, *Phleum pratense* L., phenolic compounds, identification, quantitative content.

References

1. Babenko LM, Smirnov OE, Romanenko KO, Trunova OK, Kosakivska IV. Phenolic compounds in plants: biogenesis and functions. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2019. 91. 5-18.
2. Bondarenko IS, Kyslychenko VS. Phytochemical study of timothy grass. Modern achievements of pharmaceutical science in the creation and standardization of medicinal products and dietary supplements containing components of natural origin: materials of the 5th International Scientific and Practical Internet Conference (Kharkov, April 14, 2023). Kh.: NUPh, 2023. P. 77-78.
3. Bondarenko IS, Kyslychenko VS. Study of hydroxycinnamic acids in timothy grass. *Planta+*. Science, practice and education: the proceedings of the Third Scientific and Practical Conference with International Participation, dedicated to the 180th anniversary of Bogomolets National Medical University (Kyiv, February 18, 2022). Kyiv, 2022. 1. P. 202-203.
4. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: An overview. *Medicines*. 2018. 5(3). P. 93-109.
5. Flavonoids: biochemistry, biophysics, medicine / Tarakhovskiy YuS, Kim Yu A, Abdrasilov BS, Muzafarov EN. Pushchino: Sunchrobook, 2013. 310 p.
6. Korovina VL, Kozlov NN, Komkova TN. Chemical composition of wild specimens of Timothy grass (*Phleum pratense* L.). Multifunctional adaptive fodder production: a collection of scientific papers. Moscow, 2020. P. 65-69.
7. Minatel IO, Borges CV, Ferreira MI. et al. Phenolic compounds: Functional properties, impact of processing and bioavailability. *Phenolic Compounds – Biological Activity*. 2017. 24.
8. Ovchinnikov PN. *Phleum* L. in the book: *Flora of the USSR*. M.; L., 1934. II. P. 127-129.
9. State Pharmacopoeia of Ukraine / SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for Quality of Medicinal Products". 2nd ed. Supplement 1. Kharkiv: SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicines". 2016. 360 c.
10. State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 volumes / SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for Quality of Medicinal Products". 2nd ed. Kharkiv: SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for Quality of Medicines". 2015. 1. 1130 p.
11. State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 volumes / SE "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for Quality of Medicines". 2nd ed. Kharkiv: Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for Quality of Medicines, 2014. 3. 732.
12. Volynets AP. Phenolic compounds in the vital activity of plants. Minsk: Belarus. Navuka, 2013. 283 p.