

УДК 615.32:547.56:543.544.943.3.068.7

DOI <https://doi.org/10.32782/health-2024.3.7>

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ЗИМОЛЮБКИ ЗОНТИЧНОЇ ТРАВИ МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

**Коврегін Олексій Володимирович**,  
аспірант кафедри клінічної фармакології  
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації  
Національного фармацевтичного університету  
ORCID: 0009-0000-5269-4073

**Михайленко Ольга Олександрівна**,  
кандидат фармацевтичних наук,  
доцент кафедри фармацевтичної хімії  
Національного фармацевтичного університету,  
запрошений дослідник у групі «Фармакогнозія та фітотерапія»,  
UCL школа фармації, Лондон, Велика Британія  
ORCID: 0000-0003-3822-8409

**Людас Іванаускас**,  
доктор біомедичних наук, професор,  
завідувач кафедри аналітичної та токсикологічної хімії  
Литовського університету наук здоров'я, Каунас, Литва  
ORCID: 0000-0001-5390-2161

**Владимирова Інна Миколаївна**,  
доктор фармацевтичних наук, професор,  
професор кафедри клінічної фармакології  
Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації  
Національного фармацевтичного університету  
ORCID: 0000-0002-4846-8839

У статті представлені дослідження, присвячені визначенню якісного складу фенольних сполук трави зимолі з зонтичної. Для реалізації поставленої мети застосовано метод високоефективної тонкошарової хроматографії (HPTLC), який широко використовується для фармакопейного аналізу лікарської рослинної сировини.

Для дослідження використовували висушену траву зимолі з зонтичної *Chimaphila umbellata* (L.) (виробник ТМ «Зелена аптека», м. Житомир). Визначення методом високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) проводили за допомогою приладу SAMAG, що складається з напівавтоматичного пробовідбірника Linomat 5, камери автоматичного проявлення 2 (ADC2), нагрівача пластини TLC III і візуалізатора ТШХ, з'єданого з програмним забезпеченням visionCATS 2.1. Використовували пластини ВЕТШХ силікагель Si 60 F254, 20 x 10 см (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина) та стандартні зразки хлорогенової кислоти, кавової кислоти, гіперозиду, рутину, кверцетину, авікулярину, ізокверцетину та галлової кислоти.

Як рухомих фаз використовували: етилацетат – мурашину кислоту – воду очищену 68 : 8 : 8, виявлення хроматографічних зон проводили, використовуючи специфічний реагент – аміноетиловий ефір дифенілборної кислоти Р та макрогол. Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм, 365 нм і під денним світлом до та після дериватизації.

Порівняння зон у траві зимолі з зонами стандартів дало змогу припустити наявність гіперозиду ( $R_f$  0,41), авікулярину ( $R_f$  0,67), ізокверцетину ( $R_f$  0,45), галлової ( $R_f$  0,81), кофейної кислот ( $R_f$  0,87) у траві зимолі з зонтичної.

Таким чином, достатньо різноманітний вміст фенольних сполук у сировині свідчить про можливість стандартизації трави зимолі з зонтичної за такими класами БАР, як гідроксикоричні кислоти та флавоноїди.

**Ключові слова:** зимолі лікарська, фенольні сполуки, гіперозид, ізокверцетин, хроматографічні методи.

## Oleksiy Kovregin, Olha Mykhailenko, Liudas Ivanauskas, Inna Vladymyrova. Identification of phenolic compounds of *Chimaphila umbellata* (L.) herb through high-performance thin-layer chromatography

The article presents a study devoted to the determination of the qualitative composition of phenolic compounds of *Chimaphila umbellata* (L.) herb. The of high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) method was used to realize the set aim, which is widely used for pharmacopoeial analysis of medicinal plant materials.

The dried herb of *Chimaphila umbellata* (producer of TM "Zelena Apteka", Zhytomyr) was used for the research. HPLC determinations were performed using a CAMAG instrument consisting of a Linomat 5 semi-automatic sampler, an automatic developing camera 2 (ADC2), a TLC III plate heater, and a TLC visualizer connected to visionCATS 2.1 software. Plates of HPTLC silica gel Si 60 F<sub>254</sub>, 20 x 10 cm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) were used. Standard samples of chlorogenic acid, caffeic acid, hyperoside, rutin, quercetin, avicularin, isoquercetin and gallic acid were used. The following was used as a mobile phase: ethyl acetate – formic acid – water (68 : 8 : 8), detection of chromatographic zones was carried out using a specific reagent – diphenylboronic acid aminoethyl ether P and macrogol P. Chromatograms were viewed in UV light at wavelengths of 254 nm, 365 nm, and in daylight before and after derivatization.

Comparison of the zones in the plant sample with the zones of the standards allowed us to assume the presence of hyperoside (Rf 0.41), avicularin (Rf 0.67), isoquercetin (Rf 0.45), gallic (Rf 0.81), caffeic acids (Rf 0.87) in *Chimaphila umbellata* herb.

Thus, the sufficiently diverse content of phenolic compounds in the herbal raw materials indicates the possibility of standardization of *Chimaphila umbellata* according to such biologically active compound classes as hydroxycinnamic acids and flavonoids.

**Key words:** *Chimaphila umbellata*, phenolic compounds, hyperoside, isoquercetin, chromatographic methods.

**Вступ.** *Chimaphila umbellata* (L.) – багаторічна трав'яниста рослина [1], що має сечогінну [2], в'яжучу, болезаспокійливу [3] та інші дії і може лікувати різні стани в разі захворювань нирок і сечовивідних шляхів [4]. У траві зимолоубки зонтичної виявлені глікозид арбутин, дубильні речовини (до 5 %), флавоноїди, таніни, гірку речовину (урсон) [5], органічні кислоти, камеді, смоли, слиз [6]. Також у траві містяться ситостерин, хінна та галова кислоти, метиловий ефір саліцилової кислоти [7], вітаміни, мікроелементи й інші біологічно активні речовини [8].

Рослинні поліфеноли як дієтичні антиоксиданти відіграють важливу роль у харчуванні та збереженні здоров'я [9]. Деякі дослідження показали, що серед дієтичних антиоксидантів фенольні сполуки є найбільш поширеними в раціоні людини [10, 11].

Існують різні методи якісного та кількісного визначення фенольних сполук у лікарській рослинній сировині: хроматографічні (ПХ, ТШХ, ВТШХ, ВЕРХ), спектроскопічні (спектрофотометрія, фотоколориметрія) [12].

Сучасний метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) широко використовується для фармакопейного аналізу лікарської рослинної сировини [13]. Це дає можливість порівнювати результати різних видів або екстракції паралельно на одній пластині або порівнювати треки з різних пластин за допомогою «віртуальної пластини». Крім того, результати можуть зберігатися у традиційній формі зображення (хроматограма) або як профілі піків із зображення / денситограми. Таким чином, цей

метод є корисним інструментом для проведення не тільки якісного, але й специфічного та неспецифічного якісного й кількісного визначення [12].

У світовій науковій літературі представлені відомості щодо наявності фенольних сполук у траві зимолоубки в джерелах [14–16]. У дослідженому спиртовому екстракті *C. umbellata* (L.) авторами статті були визначені фенольні сполуки [4] (рис. 1).

**Мета та завдання.** Метою цієї роботи дослідження фенольних сполук трави зимолоубки зонтичної методом високоефективної тонкошарової хроматографії, сировина якої наявна на фармацевтичному ринку України, з перспективою розробки нормативної документації та розробки фітотерапевтичних засобів на її основі.

**Методи дослідження.** Для дослідження використовували висушену траву зимолоубки зонтичної (виробник ТМ «Зелена аптека», м. Житомир).

Визначення методом ВЕТШХ проводили за допомогою приладу CAMAG, що складається з напівавтоматичного пробовідбірника Linomat 5, камери автоматичного проявлення 2 (ADC2), нагрівача пластини TLC III і візуалізатора ТШХ, з'єднаного з програмним забезпеченням visionCATS 2.1. Використовували пластини ВЕШХ силікагель Si 60 F<sub>254</sub>, 20 x 10 cm (Merck KGaA, Дармштадт, Німеччина).

Як рухому фазу використовували: етилацетат – мурашину кислоту – воду очищену 68 : 8 : 8, виявлення хроматографічних зон проводили, використовуючи специфічний реагент – аміоетиловий ефір дифенілборної кислоти Р та макрогол. Хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжини

хвилі 254 нм, 365 нм і під денним світлом до та після дериватизації.

Порошкоподібний рослинний матеріал (50 мг) екстрагували окремо 50%-м, 100%-м (об./об.) метанолом та ацетоном (1 : 10) на ультразвуковій водяній бані протягом 20 хв за температури 30 °С. Екстракт фільтрували за допомогою фільтра Millex R Syringe 0,45 мм. Еталонні зразки хлорогенової кислоти, кавової кислоти, гіперозиду, рутину, кверцетину, авікулярину, ізокверцетину, галової кислоти окремо розчиняли в метанолі з концентрацією 1 мг/мл, потім обробляли ультразвуком протягом 10 хвилин за температури 30 °С.

Зразки наносили на пластину у вигляді смуг шириною 8 мм за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 зі шприцом на 100 мкл. Відстань між лініями становила 2,0 мм, а швидкість нанесення становила 90 нл·с<sup>-1</sup>. Застосовували 2 мкл для стандартів речовин і 7 мкл розчинів зразків.

Планшети проявляли в ADC 2 з насиченням камери (фільтровим папером) протягом 20 хв і після активації за відносної вологості 33 % протягом 10 хв з використанням насиченого розчину хлориду магнію, проявлення етилацетатом – мурашиною кислотою – водою 68 : 8 : 8 (V/V) до відстані міграції 70 мм (від нижнього краю) з подальшим висушуванням протягом 5 хв.

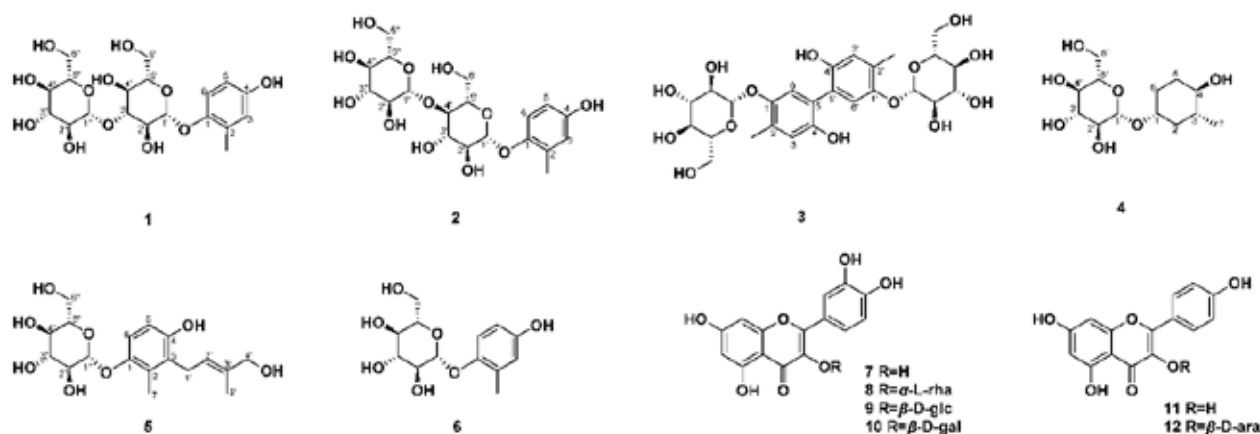
Пластини обробляли шляхом занурення у розчин А (2 г 2-аміноетілдіфенілборинат у 200 мл метанолу), а потім у PEG400 (макрогол 400; 10 г поліетиленгліколю 400 у 200 мл дихлорметану),

потім нагрівали за температури 100 °С протягом 5 хв. Пластини візуалізували за допомогою SAMAG Visualizer під білим денним світлом, УФ 254 нм і УФ 366 нм, фотографували й аналізували за допомогою програмного забезпечення (VisionCats).

**Обговорення результатів.** Ідентифікацію фенольних сполук і флавоноїдів сировини в метанольних екстрактах і екстракту з ацетону проводили за допомогою модифікованої фармакопейної методики тонкошарової хроматографії, яка зазначена в монографіях Державної фармакопеї України для ідентифікації фенольних сполук у ЛРС [12]. Отримані хроматограми наведені на рис. 2.

Для вибору оптимального розчинника для екстракції проводили порівняння результатів хроматографічного аналізу в 50%-му метанольному, 100%-му метанольному екстрактах і екстракті з ацетону. За результатами аналізу хроматографічних профілей, отриманих зі зразків сировини, ідентифіковані зони на рівні гіперозиду, авікулярину й ізокверцетину порівняно із зонами стандартних зразків (рис. 3). Інтенсивність забарвлення ідентифікованих зон відповідних сполук відмічалася приблизно однакова, але в екстракті, отриманому 100%-м метанолом, поділ зон був чітким, не відбувалася інтенсивна екстракція хлорофілів, які заважали розділенню зон. Отже, 100%-й метанол було вибрано як оптимальний розчинник для вилучення фенольних речовин зимолюбки.

Порівняння зон у траві зимолюбки із зонами стандартів дало змогу припустити наявність гіперозиду (Rf 0,41), авікулярину (Rf 0,67), ізокверце-



**Рис. 1.** Фенольні сполуки екстракту *C. umbellata* (L.): глюкопіранозил-ізогемоарбутин (1), 4'-O-β-D-глюкопіранозил-ізогемоарбутин (2) і 5-5'-дегідро-ді(2-метил-4-гідрокси-феніл-1-O-β-D-глюкопіранозид) (3); циклогексанол: (1R,3R,4R)-3-метилциклогексанол β-D-глюкопіранозид (4); 3-[(E)-4-гідрокси-3-метил-2-бутеніл]-4-гідрокси-2-метилфеніл-O-β-D-глюкопіранозид (5); ізогемоарбутин (6), кверцетин (7), кверцитрин (8), ізокверцитрин (9), гіперозид (10), кемпферол (11) і югланін (12)

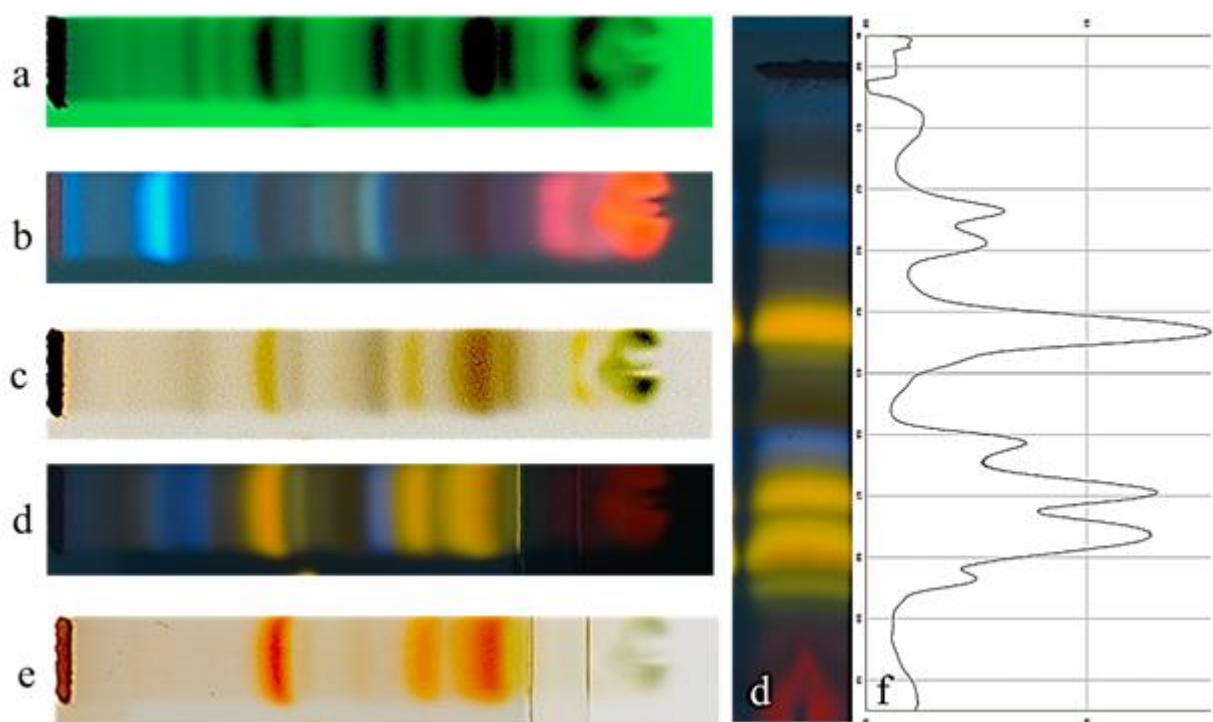


Рис. 2. ВЕТШХ зони метанольного екстракту зимолюбки за довжини хвилі 254 нм (a), 365 нм (b) і під денним світлом (c) до дериватизації та за довжини хвилі 365 нм (d) і під денним світлом (e) після дериватизації та профіль денситометричного сканування (f) зон за 365 нм. Система: етилацетат – мурашина кислота – вода (68 : 8 : 8) (V/V); дериватизація аміноетиловим ефіром дифенілборної кислоти з подальшим макроголом 400 і нагріванням за температури 105 °C 5 хв

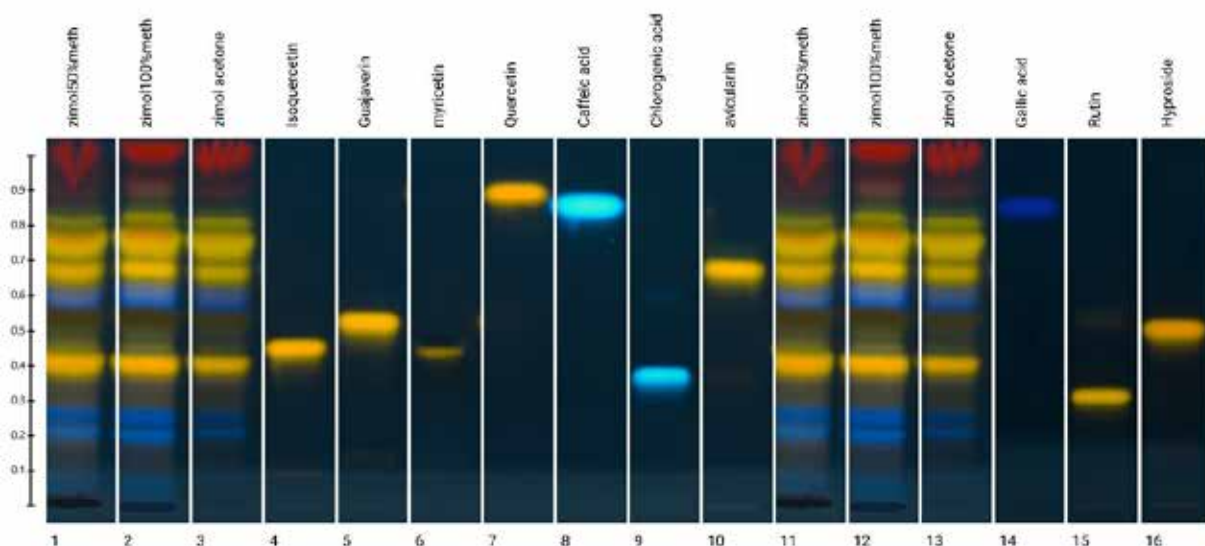


Рис. 3. Профіль ВЕТШХ зразків зимолюбки (50%-й, 100%-й метанол та ацетон) і стандартів під УФ 366 нм після дериватизації

тину (Rf 0,45), галової (Rf 0,81), кофейної кислот (Rf 0,87) у досліджуваній сировині (рис. 4).

Відповідно до проведеного літературного огляду вітчизняних та іноземних джерел наукової літератури, наразі відсутні наукові публікації аналізу біологічно активних сполук зимолюбки

хроматографічними методами. Тільки в оглядовій статті [9] наводиться інформація про присутність у листі і квітів зимолюбки флавоноїдів, серед яких гіперозид, кемпферол і авікулярин є домінуючими.

**Висновки.** Методом ВЕТШХ визначений

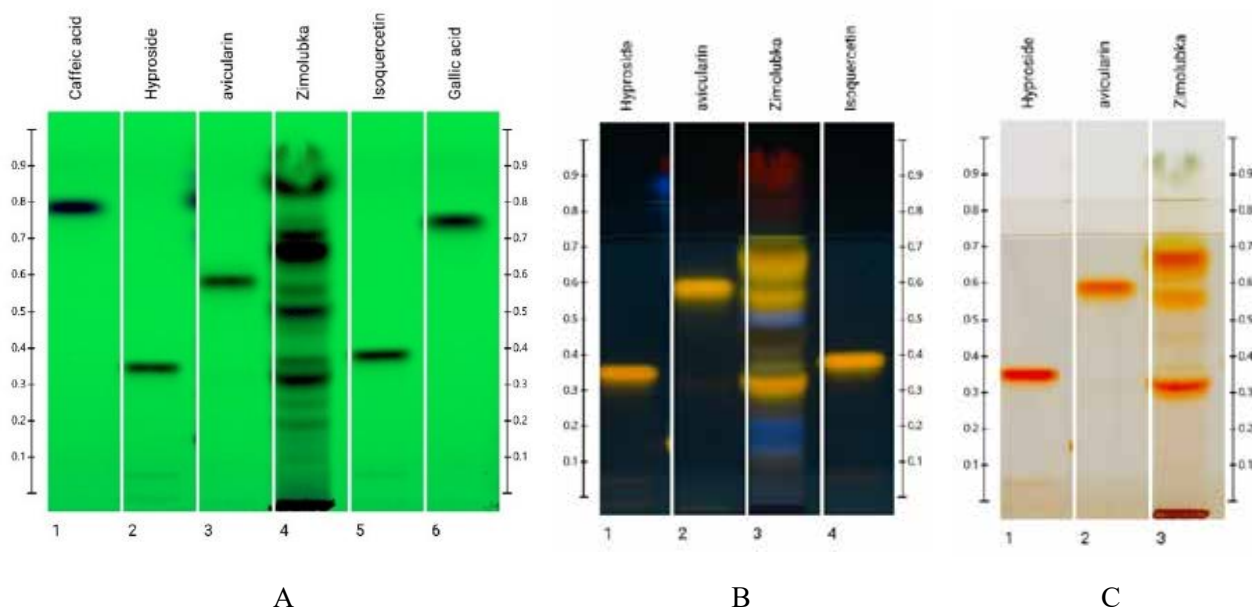


Рис. 4. Профіль ВЕТШХ зразку зимолюбки (100%-й метанол) і визначених стандартів під УФ 254 нм (А) до дериватизації та під УФ 366 нм після дериватизації (В) і білим світлом після дериватизації (С)

якісний склад фенольних сполук трави зимолюбки зонтичної. Ідентифікацію фенольних сполук у досліджуваній сировині проводили за допомогою модифікованої фармакопейної методики тонкошарової хроматографії, яка зазначена в монографіях Державної фармакопеї України для ідентифікації фенольних сполук у ЛРС.

За результатами проведеного дослідження було встановлено, що 50%-й метанол є оптимальним екстрагентом для вилучення фенольних сполук із трави зимолюбки, а результати ВЕТШХ із використанням стандартів дали можливість при-

пустити наявність у траві зимолюбки зонтичної гіперозиду, авікулярину, ізокверцетину, галлової, кофейної кислот. Враховуючи, що нами не було знайдено літературних даних щодо аналізу фенольних сполук у цьому виді сировини методами ПХ, ТШХ або ВЕТШХ, такі дослідження наведені вперше.

Таким чином, достатньо різноманітний вміст фенольних сполук у сировині свідчить про можливість стандартизації трави зимолюбки зонтичної за такими класами БАР, як гідроксикоричні кислоти та флавоноїди.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Шерстюк М. Ю. Аналіз віталітетної структури ценопопуляції *Chimaphila umbellata* (L.) у лісових фітоценозах Новгород-Сіверського полісся. *ScienceRise: Biological Science*. 2017. № 1 (4). С. 40–45.
2. *Chimaphila umbellata* extract exerts anti-proliferative effect on human breast cancer cells via RIP1K/RIP3K-mediated necroptosis / Das Neeladrisingha et al. *Phytomedicine Plus*. 2022. Vol. 2 (1). P. 3–10.
3. Antifungal and antioxidant activities of the phytomedicine pipsissewa, *Chimaphila umbellata* / J. Galván et al. *Phytochemistry*. 2008. Vol. 69 (3). P. 738–746. DOI: <https://10.1016/j.phytochem.2007.09.007>.
4. Constituents of *Chimaphila japonica* and Their Diuretic Activity / Yu Yue et al. *Molecules*. 2024. Vol. 29 (5). P. 1092. DOI: <https://10.3390/molecules29051092>.
5. Фітотерапевтичні лікарські засоби з нефропротекторною активністю / О. А. Подплетня та ін. *Теоретична медицина*. 2017. № 22 (1). С. 10–19.
6. Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols / V. Katalinic et al. *Food Chemistry*. 2006. Vol. 94 (4). P. 550–557. DOI: [10.1016/j.foodchem.2004.12.004](https://10.1016/j.foodchem.2004.12.004).
7. Phenolic compounds in Plants: biogenesis and functions / L. M. Babenko et al. *Ukr. Biochem. J.* 2019. Vol. 91 (3). P. 5–18. DOI: <https://10.15407/ubj91.03.005>.
8. Лікарські рослини : енциклопедичний довідник / відп. ред. А. М. Гродзінський. Київ : Українська енциклопедія ім. М. П. Бажана, Олімп, 1992. 544 с.
9. Raja S., Ravindranadh K., Keerthi T. A complete profile on *Chimaphila umbellata*-traditional uses, pharmacological activities and phytoconstituents. *International Journal of Phytomedicine*. 2014. Vol. 6 (4). P. 464–470.
10. Crozier A., Clifford M., Ashihara H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet. Oxford: Blackwell Publishing Ltd, 2006. 384 p. DOI: [10.1002/9780470988558](https://doi.org/10.1002/9780470988558).

11. Zolotareva O. K., Podorvanov V. V., Dubyna D. V. Polyphenolic compounds of macrophytes and their ecological importance. *Ukr. Bot. J.* 2017. Vol. 74 (4). P. 373–384.
12. Вивчення фенольних речовин у траві маруни дівочої методом тонкошарової хроматографії та високоефективної рідинної хроматографії / К. Р. Гордей та ін. *Український біофармацевтичний журнал.* 2019. № 3 (60). С. 64–70.
13. Isolation, Culture and Comprehensive Characterization of Biological Properties of Human Urine-Derived Stem Cells / M. Culenova et al. *Int J. Mol Sci.* 2021. Vol. 22 (22). P. 12503. DOI: 10.3390/ijms222212503.
14. Chemical constituents of *Chimaphila japonica* Miq / Yu Yue et al. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2021. Vol. 95. P. 104219. DOI: <https://10.1016/j.bse.2020.104219>.
15. *Chimaphila umbellata*; a biotechnological perspective on the coming-of-age prince's pine / Ali Urooj et al. *Phytochem Rev.* 2024. Vol. 23. P. 229–244. DOI: <https://10.1007/s11101-023-09880-1>.
16. Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions / D. Chrpova et al. *Czech J. Food Sci.* 2010. Vol. 28. P. 317–325. DOI: 10.17221/129/2010-CJFS.

#### REFERENCES

1. Sherstiuk, M.Yu. (2017). Analiz vitalitetnoi struktury tsenopopuliatsii *Chimaphila umbellata* (L.) u lisovykh fitotsenozakh Novhorod-Siverskoho polissia. *ScienceRise: Biological Science, 1 (4)*, 40–45.
2. Neeladrisingha, D., Subhashish, S., Chandrachur, G., Komal, K., Debabrata, S., Partha, R. (2022). *Chimaphila umbellata* extract exerts anti-proliferative effect on human breast cancer cells via RIP1K/RIP3K-mediated necroptosis. *Phytomedicine Plus, 2 (1)*, 3–10.
3. Galván, J., Mir-Rashed, N., Jessulat, M., Atanya, M., Golshani, A., Durst, T., Petit, P. (2008). Antifungal and antioxidant activities of the phytochemistry pipsissewa, *Chimaphila umbellata*. *Phytochemistry, 69 (3)*, 738–746. DOI: <https://10.1016/j.phytochem.2007.09.007>.
4. Yue, Y., Deri, H., Jinze, L., Chenghao, W., Yuhong, S., Mingyue, L. (2024). Constituents of *Chimaphila japonica* and Their Diuretic Activity. *Molecules, 29 (5)*, 1092. DOI: <https://10.3390/molecules29051092>.
5. Podprietnia, O.A., Khomiak, N.V., Sokolova, K.V., Kaidash, S.P., Khomiak, O.V. (2017). Fitoterapevtychni likarski zasoby z nefroprotektornoiu aktyvnistiu. *Teoretychna medytsyna, 22 (1)*, 10–19.
6. Katalinic, V., Milos, M., Kulisic, T., Jucic, M. (2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry, 94 (4)*, 550–557. DOI: 10.1016/j.foodchem.2004.12.004.
7. Babenko, L.M., Smirnov, O.E., Romanenko, K.O., Trunova, O.K., Kosakivska I.V. (2019). Phenolic compounds in Plants: biogenesis and functions. *Ukr. Biochem. J., 91 (3)*, 5–18. DOI: <https://10.15407/ubj91.03.005>.
8. *Likarski roslyny: entsyklopedychnyi dovidnyk.* (1992). Kyiv: Ukrainska entsyklopediia im. M.P. Bazhana, Olimp.
9. Raja, S., Ravindranadh, K., Keerthi, T. (2014). A complete profile on *Chimaphila umbellata*-traditional uses, pharmacological activities and phytoconstituents. *International Journal of Phytomedicine, 6 (4)*, 464–470.
10. Crozier, A., Clifford, M., Ashihara, H. (2006). *Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet.* Oxford: Blackwell Publishing Ltd.
11. Zolotareva, O.K., Podorvanov, V.V., Dubyna, D.V. (2017). Polyphenolic compounds of macrophytes and their ecological importance. *Ukr. Bot. J., 74 (4)*, 373–384.
12. Hordiei, K.R., Hontova, T.M., Serbin, A.H., Kotov, A.H., Kotova, E.E. (2019). Vychennia fenolnykh rehovyn u travy maruny divochoi metodom tonkosharovoï khromatohrafiï ta vysokoefektyvnoi ridynnoi khromatohrafiï. *Ukrainskyi biofarmatsevtychnyi zhurnal, 3 (60)*, 64–70.
13. Culenova, M., Nicodemou, A., Novakova, Z. V., Debreova, M., Smolinská V., Bernatova, S. (2021). Isolation, Culture and Comprehensive Characterization of Biological Properties of Human Urine-Derived Stem Cells. *Int J. Mol Sci., 22 (22)*, 12503. DOI: 10.3390/ijms222212503.
14. Yue, Y., Elshafei, A., Zheng, X., Cheng, S., Wang, Y., Piao, M., Wang, Y., Jin, M. ... Zheng, M. (2021). Chemical constituents of *Chimaphila japonica* Miq. *Biochemical Systematics and Ecology, 95*, 104219. DOI: <https://10.1016/j.bse.2020.104219>.
15. Urooj, A., Muhammad, M.K., Naveera, K., Rida tul, H., Muhammad Usama, A., Bilal, H.A. (2024). *Chimaphila umbellata*; a biotechnological perspective on the coming-of-age prince's pine. *Phytochem Rev., 23*, 229–244. DOI: <https://10.1007/s11101-023-09880-1>.
16. Chrpova, D., Kouřimská, L., Gordon, M.H., Heřmanová, V., Roubíčková, I., Panek, J. (2010). Antioxidant activity of selected phenols and herbs used in diets for medical conditions. *Czech J. Food Sci, 28*, 317–325. DOI: 10.17221/129/2010-CJFS.