

УДК 615.2:615.3;632.151

Л. В. Еберле^{1,2}, Я. В. Рожковський¹, О. В. Устянська^{1,2}, С. І. Богату¹,
Б. В. Приступа¹, І. В. Улізко¹, Д. Г. Тодорова¹

¹Одеський національний медичний університет, фармацевтичний факультет,
кафедра загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії;
вул. Софіївська, 2, м. Одеса, 65082, Україна

²Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
факультет хімії та фармації, кафедра загальної та клінічної фармації,
вул. Змієнка Всеволода, 2, м. Одеса, 65082, Україна;

¹e-mail: lidaeberle@gmail.com

ОЦІНКА ПОЛІФЕНОЛЬНОГО СКЛАДУ ТА ТОКСИКОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК ЕКСТРАКТУ *ARMORACIA RUSTICANA*

Дослідження методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) водно-етанольного екстракту з кореневища *Armoracia rusticana* показало присутність в сировині шести груп поліфенольних сполук, серед яких домінуюче місце займали катехіноподібні речовини та фенольні кислоти. В незначних кількостях були ідентифіковані групи флавонолів, флаванонів, катехинів та флавонів. За результатами дослідження встановлено, що загальний вміст поліфенолів в екстракті *Armoracia rusticana* становив 271,86 мкг/мл.

Токсикологічні дослідження, проведені методом *in vivo* показали, що екстракт відноситься до помірно токсичних сполук (III клас токсичності). Це свідчить про перспективи використання *Armoracia rusticana* як джерела біологічно активних речовин для подальших фармакологічних досліджень та впровадження в фітотерапії.

Ключові слова: поліфенольні сполуки, високоефективна рідинна хроматографія, екстракт *Armoracia rusticana*, гостра токсичність.

Зростання інтересу до натуральних продуктів веде до збільшення попиту на фітозасоби, які є більш безпечними та мають менше побічних ефектів порівняно з синтетичними ліками, що робить їх популярними для широкого кола споживачів.

Рослинні екстракти є корисними не лише для лікування, але й для профілактики різних захворювань. А детальне дослідження їх хімічного складу дозволяє створювати препарати з високою біодоступністю та ефективністю. Виготовлення фітозасобів на основі рослин сприяє збереженню екологічної чистоти та підтримує сталий розвиток, адже рослини є відновлювальним ресурсом. Крім того, вивчення нових рослинних джерел стимулює інновації у медицині та фармацевтиці, що дозволяє вдосконалювати традиційні методи терапії.

Серед різноманітного рослинного світу України особливу увагу заслуговує *Armoracia rusticana* (хрін звичайний) багаторічна трав'яниста рослина з роду *Armoracia* родини *Brassicaceae*, яка розповсюджена на всій території країни.

Згідно літературних даних, *Armoracia rusticana* містить ряд біологічно активних речовин, серед яких основними є алілгірчична олія та глікозиди, зокрема синігрин, що відповідають за пекучий смак рослини та вважається головним компонентом, що забезпечує рослину протизапальними, антисептичними властивостями [1]. Важливими компонентами є також флавоноїди, такі як кемпферол та

кверцетин, що мають антиоксидантну активність [2]. Вітаміни, зокрема вітамін С, сприяють зміцненню імунної системи та підтримці загального здоров'я. Відомо, що у складі присутні мінерали, зокрема калій, кальцій та магній, які підтримують нормальне функціонування організму. Комплекс активних речовин надають *Armoracia rusticana* широкий спектр фармакологічних властивостей, що робить його перспективним об'єктом для подальших поглиблених досліджень та потенційного впровадження в фітотерапевтичну практику [3–4].

Метою роботи було дослідження поліфенольного складу екстракту з кореневища *Armoracia rusticana* та встановлення його токсикологічної характеристики *in vivo*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Дослідження поліфенольних сполук проводили в кореневищі *Armoracia rusticana*, яке попередньо екстрагували 50% водно-етанольною сумішшю в співвідношенні рослинної сировини до екстрагенту 1:8 та подрібненні розміром до 5 мм. Екстракцію сировини проводили протягом двох тижнів методом мацерації в темному місці без потрапляння сонячного проміння.

Ідентифікація поліфенольних сполук була виконана за допомогою вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) на обладнанні Shimadzu (Японія), що включає автоматичну подачу проб Auto sampler SIL-20A/20AC, модуль рухомої фази LC-20 AD, колонний модуль CTO-20A/20AC, дегазатор DGU-20A3/DGU-20A5 та діодний ультрафіолетовий детектор SPD-20A/SPD-20AV. Хроматографічне розділення проводилось на зворотно-фазовій колонці Microsorb-MV C18 (150×4,6 мм, з розміром зерна сорбенту 5 мкм). Для аналізу використовували реактиви, розчинники та чисті речовини виробників Fluka, Merck, Lab-Scan.

Як рухому фазу обрали суміш «метанол-0,9%-й розчин ортофосфорної кислоти» у співвідношенні 1:9. Ця система була обрана на основі методичних рекомендацій для отримання чітких піків стандартних речовин, що дозволяють точно визначити сумарний вміст окремих фенольних сполук. Швидкість подачі елюента становила 0,5 мл/хв, температура колонки – 40 °С, об'єм проби – 5 мкл.

Ідентифікація сполук у екстрактах здійснювалась за часом утримання та спектральними характеристиками, порівнюючи їх з характеристиками стандартів.

Статистична обробка результатів ВЕРХ проводилась за допомогою програми STATISTICA 8. Для порівняння результатів використовувався параметричний критерій Ст'юдента, де статистично значущими вважались різниці з рівнем значущості $p < 0,05$ (95%) [5, 6].

Дослідження токсичності екстракту *Armoracia rusticana* проводили на здорових статевозрілих білих щурах масою тіла 170–190 г, які пройшли карантин в умовах віварію протягом 14 діб. Кожна експериментальна група складалася з 10 тварин.

Гостру токсичність (LD_{50}) досліджуваного екстракту проводили при однократному та багаторазовому (впродовж 4 тижнів) пероральному введенні в дозах 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 мг/кг маси тіла. Введення екстракту проводили щодня натще, реєструючи зовнішній стан тварин, особливості поведінки, інтенсивність і характер рухів, стан волосяного покриву і слизових оболонок.

Для обробки отриманих результатів та визначення середньої летальної дози (LD_{50}) використовували метод Спірмена-Кербера.

$$M = M_1 - d * (P_1 - 0,5) \quad (1)$$

M – середня доза ефекту

M_1 – мінімальна d , яка викликає ефект у 100%

d – різниця між дозами

P_1 – сумарна частка реагуючих на дози індивідів.

$$Sm = d * \sqrt{2P_2P - P_1^2 - P_1 - 0,83} \quad (2)$$

Sm – середнє квадратичне відхилення;

P_2 – сума накопичених часток індивідів, що реагують на попередні дози.

$$m = \frac{Sm}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

m – відхилення від середнього значення;

n – кількість тварин в кожній групі.

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримані вимоги нормативних документів з доклінічного вивчення потенційних лікарських засобів, біоетики відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», затверджених Першим національним конгресом України з біоетики (Київ, 2001 р.), положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), Закону України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» [7].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Аналіз водно-етанольного екстракту з кореневища *Armoracia rusticana*, методом вискоєфективної рідинної хроматографії, зареєстрував присутність шести груп поліфенольних сполук (фенольні кислоти, катехіноподібні, катехіни, флавоноли, флаванони, флаволи).

Найбільшу частину зареєстрованих сполук складали катехіноподібні речовини, кількісний вміст яких становив 178,99 мкг/мл. Друге місце посідали фенольні кислоти, становлячи 46,24 мкг/мл. Серед них були ідентифіковані хлорогенова кислота в кількості 1,22 мкг/мл, галова кислота – 2,31 мкг/мл, та в незначній кількості ферулова кислота – 0,48 мкг/мл (табл. 1, рис. 1).

Катехіноподібні речовини та фенольні кислоти разом становили майже 83% від загальної кількості усіх поліфенольних сполук, що були зафіксовані в дослідному зразку екстракту, що свідчить про унікальний та особливий склад рослинної сировини.

В незначних концентраціях екстракт з кореневища *Armoracia rusticana* містив сполуки груп флаванонів та флавонів, сумарна кількість яких складала 5,75 мкг/мл та 4,78 мкг/мл, відповідно. Зокрема, серед флаванонів було зареєстровано присут-

ність нарингіну (1,24 мкг/мл) та гесперидину (1,17 мкг/мл), а серед флавонів – лютеолін (1,53 мкг/мл). Усі інші групи поліфенольних сполук, (флаваноїди, катехіни та флавоноли) були виявлені в низьких концентраціях в межах від 0,30 до 1,86 мкг/мл. (табл. 1, рис. 1).

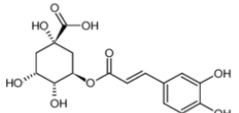
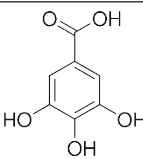
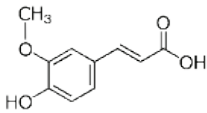
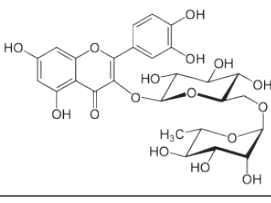
Згідно проведеної хроматографії, сумарний вміст поліфенольних сполук в кореневищі *Armoracia rusticana* складав 271,86 мкг/мл, де на долю не ідентифікованих речовин приходилось 34,15 мкг/мл (табл. 1).

Таблиця 1

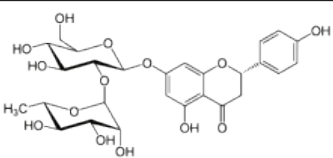
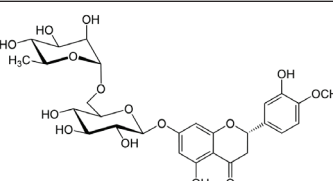
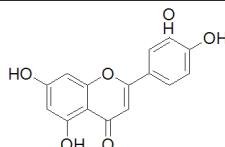
**Аналіз вмісту поліфенольних сполук екстракту
з кореневища *Armoracia rusticana***

Table 1

**Analysis of the content of polyphenolic compounds
in the extract from the rhizome of *Armoracia rusticana***

Група поліфенолів	Вміст, (мкг/мл)	Окремі речовини	Вміст, мкг/мл	Структурна формула
Фенольні кислоти	46,24	хлорогенова кислота	1,22	
		кавова кислота	-	Не ідентифіковано
		галова кислота	2,31	
		ферулова кислота	0,48	
		корична кислота	-	Не ідентифіковано
Катехіни	1,56	(+) катехін	-	Не ідентифіковано
Катехіноподібні*	178,99	—		
Флавоноли	0,30	рутин	0,10	
		кверцетин	-	Не ідентифіковано
		глікозид мірицитина	-	Не ідентифіковано

Продовження таблиці 1

Група поліфенолів	Вміст, (мкг/мл)	Окремі речовини	Вміст, мкг/мл	Структурна формула
Флаванони	5,75	нарингін	1,24	
		нарингенін	-	Не ідентифіковано
		гесперидин	1,17	
		гесперетин	-	Не ідентифіковано
Флаволи	4,78	глікозид лютеоліна	-	Не ідентифіковано
		лютеолін	1,53	
		глікозид апігеніна	-	Не ідентифіковано
		апігенін	-	Не ідентифіковано
Не ідентифіковані				34,15
Загальний вміст поліфенолів				271,86

Слід зауважити, що такі речовини, як кавава кислота, корична кислота, кверцетин, глікозид мірицитина, нарингенін, гесперетин, глікозид лютеоліна, апігенін та глікозид апігеніна в екстракті з кореневища *Armoracia rusticana* зафіксованими не були.

Присутність в екстракті великої кількості катехіноподібних речовин та фенольних кислот свідчить про високий рівень антиоксидантної активності екстракту. Катехіноподібні сполуки, зокрема катехіни, сприяють зниженню оксидативного стресу, захищаючи клітини від пошкоджень та зменшуючи ризик розвитку захворювань, пов'язаних з окислювальними процесами. Фенольні кислоти, в свою чергу, мають виражену протизапальну та кардіопротекторну активність, що робить екстракт корисним для підтримки здоров'я серцево-судинної системи. Високий вміст цих сполук також вказує на потенціал екстракту для боротьби з хронічними запаленнями та підтримки нормального метаболізму.

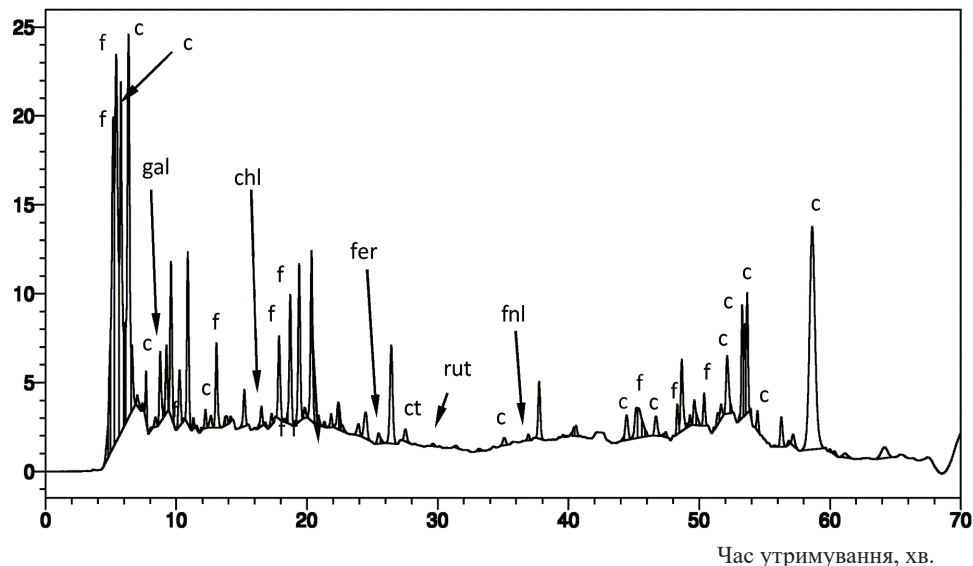


Рис. 1. Хроматограма спиртового екстракту хрину за умов сканування при довжині хвилі 255 нм.

Примітка: f – фенольні кислоти, c – катехіноподібні, gal – галова кислота, chl – хлорогенова кислота, caf – кавова кислота, fer – ферулова кислота, ct – катехіни, fnl – флавоноли, rut – рутин.

Fig. 1. Chromatogram of horseradish alcohol extract under scanning conditions at a wavelength of 255 nm.

Note: f – phenolic acids, c – catechinlike, gal – gallic acid, chl – chlorogenic acid, caf – caffeic acid, fer – ferulic acid, ct – catechins, fnl – flavonols, rut – rutin.

Наступним етапом роботи було встановлення токсикологічної характеристики (LD_{50}) екстракту з кореневища *Armoracia rusticana* за умов перорального введення.

Згідно результатів дослідження показано, що однократне пероральне введення екстракту *Armoracia rusticana* в обраних концентраціях (в межах від 150 до 500 мг/кг маси тіла) не чинило жодних впливів на фізіологічний стан та поведінку піддослідних щурів. Аналогічна картина відзначалась і при щоденному однократному введенні екстракту впродовж двох тижнів, де усі тварини мали однаковий рівень активності, слизові оболонки та шкіра були світло-рожевого кольору, а шерстяний покрив був гладким та блискучим без симптомів подразнення.

Наприкінці третього тижня експерименту у деяких тварин відмічався пригнічений стан, без звичної для щурів рухової активності та відмова від їжі. Подальше введення екстракту з кореневища *Armoracia rusticana* сприяло збільшенню продукції слини та призводило у поодиноких випадках до підвищення температури тіла, що можливо було реакцією на інтоксикацію. Тварини почали агресивно реа-

гувати на зовнішні подразники (звуки та дотик), особливо при повторних введеннях екстракту, в поведінці відмічалась дезорієнтація та млявість.

В період з 26 по 28 добу дослідження були зареєстровані перші летальні випадки серед тварин, які отримували концентрації екстракту у великих дозах 450 та 500 мг/кг маси тварин. Проведене дослідження свідчить про негативні впливи високих концентрацій екстракту за умов щоденного тривалого застосування. Тоді як концентрації екстракту *Armoracia rusticana* в діапазоні від 150 до 350 мг/кг маси тіла не викликали подразнюючого впливу та добре переносились тваринами (табл. 2).

Таблиця 2

**Гостра токсичність (LD_{50}) екстракту *Armoracia rusticana*
за умов тривалого перорального введення**

Table 2

**Acute toxicity (LD_{50}) of *Armoracia rusticana* extract
under conditions of prolonged oral administration**

Токсична характеристика		Вижило		Загинуло	
		Кількість тварин	%	Кількість тварин	%
Кількість введеного екстракту мг/кг маси тіла тварин	150	10	100	-	-
	200	10	100	-	-
	250	10	100	-	-
	300	10	100	-	-
	350	10	100	-	-
	400	8	80	2	20
	450	7	70	3	30
	500	5	50	5	50
Середня доза ефекту (M)				475	
Середнє квадратичне відхилення (Sm)				57,37	
Відхилення від середнього значення (m)				18,15	

Згідно розрахунків за правилом Спірмена-Кербера LD_{50} для екстракту з кореневища *Armoracia rusticana* становило $475 \pm 18,15$ мг/кг маси тіла тварин. За класифікацією токсичності речовин за Стефановим О. В. дослідний зразок екстракту відноситься до III класу сполук – помірно токсичні сполуки.

Отже, згідно проведених досліджень, екстракт з кореневища *Armoracia rusticana* може слугувати новим джерелом біологічно активних сполук поліфенольної природи та в подальшому може бути використаний як компонент у розробці нових фітопрепаратів з комплексною дією.

ВИСНОВКИ:

1. Аналіз високоефективної рідинної хроматографії показав присутність в екстракті з *Armoracia rusticana* шести груп поліфенольних сполук (фенольні кислоти, катехіни, катехіноподібні речовини, флавоноли, флаванони, флаволи, флаванолі).

2. Встановлено, що сумарний вміст поліфенольних сполук в кореневищі *Armoracia rusticana* L. складав 271,86 мкг/мл, де на долю не ідентифікованих речовин приходилось 34,15 мкг/мл

3. Показано, що серед сполук поліфенольної природи найбільша кількість (83%) виявлених фенолів приходиться на долю катехіноподібних речовин та фенольних кислот.

4. Методом *in vivo* встановлено, що згідно класифікації токсичності речовин О.В. Стефанова, екстракт *Armoracia rusticana* відноситься до III класу сполук – помірно токсичні сполуки.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Крусір Г.В., Присяжнюк К.О., Севастьянова О.В., Пилипенко Л.М., Сагдєєва О.О. Виділення та дослідження молекулярної маси та складу лізоциму *Armoracia rusticana* методом фермент-субстратної хроматографії. // J. Chem. Technol.– 2022. – Vol. 30, N1. – P. 132–138. <http://dx.doi.org/10.15421/jchemtech.v30i1.255480>
2. Kroener E.M., Buettner A. Sensory Analytical Comparison of the Aroma of Different Horseradish Varieties (*Armoracia rusticana*). // Front. Chem.– 2018. – Vol. 30, N3. – P. 149–157. <http://doi.org/10.3389/fchem.2018.00149>.
3. Мельник Л., Вашкеба, Е., Лихацький, П., Фіра, Л. Вивчення хімічного складу надземної частини хрону звичайного // Фармац. час.– 2009.– № 1. – С. 10–12. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2009.1.2937>
4. Anam Y., Qayyum F., Ahmad Mugha A., Amjad O. Phytochemical and biological investigation of *Armoracia rusticana*. // J. Pharm. Integr. Health Sci.– 2020. – Vol. 1, N1. –P. 58–75. <https://doi.org/10.56536/ijpihs.v1i1.9>
5. Еберле Л.В., Цісак А. О., Радасєва І. М., Казанцева А. С. Аналіз фенольних сполук у екстракті плодів чорного горіха (*Juglans nigra* L.) за допомогою високоефективної рідинної хроматографії // Фармац. журн.– 2023. – Т. 78, № 2. – С. 49–57. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.23.06>
6. Еберле Л.В., Цісак А.А., Смокіна Ю.І. Оптимізація екстракції та аналіз фенольних сполук у плодах *Ficus carica* L. методом високоефективної рідинної хроматографії. // Вісник ОНУ. Хімія.– 2023. – Т. 28, № 3(86). – С. 93–100. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2023.3\(86\).297829](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2023.3(86).297829)
7. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 року № 3447-IV. Відомості Верховної Ради України.– 2006.– № 27. – Ст. 230.
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg: Council of Europe. // Eur. Treaty Series.– 1986. – N123.– 11 p.

Стаття надійшла до редакції 12.02.2025

L. V. Eberle^{1,2}, Y. V. Rozhkovskiy¹, O. V. Ustianska^{1,2}, S. I. Bohatu¹,
B. V. Prystupa¹, I. V. Ulizko¹, D. G. Todorova¹

¹ Odesa National Medical University, 2 Sofiivska St, Odesa, 65082, Ukraine

² Odesa I. I. Mechnikov National University, 2 Zmiiienka Vsevoloda St, Odesa, 65082, Ukraine; e-mail: lidaberle@gmail.com

POLYPHENOL COMPOSITION AND TOXICOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *ARMORACIA RUSTICANA* EXTRACT EVALUATION

High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis of the aqueous-ethanolic extract of *Armoracia rusticana* rhizome revealed the presence of six main groups of polyphenolic compounds in the raw material, among which catechin-like substances and phenolic acids were the dominant ones. These components are known for their ability to deactivate free radicals, prevent the development of oxidative stress and slow down the aging process of cells.

Flavanols, flavanones, catechins and flavones were also found in small concentrations, which have anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant effects. All of these bioactive substances can play an important role in strengthening the immune system, maintaining cardiovascular health and preventing chronic diseases.

According to the results of quantitative analysis, it was found that the total content of polyphenolic compounds in the *Armoracia rusticana* extract was 271.86 µg/ml. This indicator indicates a high biological activity of the extract, which allows us to consider it as a promising source of natural antioxidants for use in the pharmaceutical industry and phytotherapy.

Toxicological studies conducted by the in vivo method on laboratory animals showed that the extract belongs to moderately toxic compounds (III toxicity class). This corresponds to the permissible limits of toxicity and indicates the relative safety of the agent for further study and clinical application.

The results obtained indicate the prospect of using *Armoracia rusticana* as a plant source of biologically active substances with a wide spectrum of action. This opens up opportunities for the development of new phytotherapeutic drugs that meet modern medical requirements for effectiveness and safety.

Key words: polyphenolic compounds, high-performance liquid chromatography, *Armoracia rusticana* extract, acute toxicity.

REFERENCES

1. Krusir G. V., Prysyazhnyuk K. O., Sevastyanova O. V., Pylypenko L. M., Sagdeeva O. O. *Isolation and study of the molecular weight and composition of Armoracia rusticana lysozyme by enzyme-substrate chromatography*. J. Chem. Eng. Technol., 2022, vol. 30, no 1, pp. 132–138. <http://dx.doi.org/10.15421/jchemtech.v30i1.255480> (in Ukrainian)
2. Kroener E. M., Buettner A. *Sensory Analytical Comparison of the Aroma of Different Horseradish Varieties (Armoracia rusticana)*. Front. Chem, 2018, vol. 30, no 3, pp. 149–157. <http://doi.org/10.3389/fchem.2018.00149>
3. Melnyk L., Vashkeba, E., Likhatsky, P., Fira, L. *Study of the chemical composition of the above-ground part of horseradish*. Pharmac. J., 2009, no 1, pp. 10–12. <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2009.1.2937> (in Ukrainian)

4. Anam Y., Qayyum F., Ahmad Mugha A., Amjad O. *Phytochemical and biological investigation of Armoracia rusticana*. J. Pharm. Integr. Health Sci., 2020, vol. 1, no 1, pp. 58–75. <https://doi.org/10.56536/ijpihs.v1i1.9>
5. Eberle L. V., Tsisak A. O., Radayeva I. M., Kazantseva A. S. *Analysis of phenolic compounds in the extract of black walnut fruits (Juglans nigra L.) using high-performance liquid chromatography*. Pharm. J., 2023, vol. 78, no 2, pp. 49–57. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.23.06> (in Ukrainian)
6. Eberle L. V., Tsisak A. A., Smokina Y. I. *Optimization of extraction and analysis of phenolic compounds in the fruits of Ficus carica L. by high-performance liquid chromatography*. Visn. Odes. nac. univ., Him., 2023, vol. 28, no 3(86), pp. 93–100. [https://doi.org/10.18524/2304-0947.2023.3\(86\).297829](https://doi.org/10.18524/2304-0947.2023.3(86).297829) (in Ukrainian)
7. Law of Ukraine “On the Protection of Animals from Cruelty” dated February 21, 2006 No. 3447-IV. Bulletin of the Verkhovna Rada of Ukraine. 2006, no 27, an. 230. (in Ukrainian)
8. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. Strasbourg: Council of Europe. Eur. Treaty Series. 1986, no 123, 11 p.