

Рекомендована д.ф.н., професором А.Г.Сербінім

УДК 581.45:582.579.2:661.732.9

ДОСЛІДЖЕННЯ ЛІПОФІЛЬНОЇ ФРАКЦІЇ З ЛИСТЯ *IRIS PSEUDACORUS*

О.О.Затильнікова, С.В.Ковальов, Т.П.Осолодченко, Е.Ю.Ахмедов

Національний фармацевтичний університет

Інститут мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова НАМН України

Наведені результати дослідження ліпофільних сполук листя півників болотяних. У результаті хроматографічного аналізу встановлено наявність каротиноїдів, токоферолів та хлорофілів. Визначено кількісний вміст каротиноїдів – 14,46±0,04%, хлорофілів – 23,03±0,05%. Наведено жирнокислотний склад та встановлено наявність антимікробної активності ліпофільної фракції.

З численних лікарських засобів, які використовуються у світовій медицині, лікарські препарати з рослинної сировини складають не менше 60%, їх перевага полягає в малій токсичності, переважно м'якості дії і рідкісній індукції алергічних реакцій [8]. Тому пошук нових біологічно активних речовин з лікарської рослинної сировини та створення на їх основі препаратів є актуальною задачею.

Науковий інтерес представляють півники болотяні (*Iris pseudacorus L.*) [5], що застосовуються у народній медицині багатьох країн як протизапальний, сечогінний, проносний, болезаспокійливий та кровоспинний засіб [3, 7]. Їх фармакологічна активність визначається сумою біологічно активних речовин, в якій фенольні сполуки займають одне з основних місць [4, 6, 8-10].

Раніше нами було досліджено ліпофільний екстракт з кореневищ півників болотяних, визначено якісний та кількісний склад жирних кислот, встановлено антимікробну активність ліпофільної фракції по відношенню до грампозитивних мікроорганізмів [2].

Метою роботи було дослідження ліпофільної фракції з листя півників болотяних та встановлення її антимікробної активності.

Матеріали та методи

Листя півників болотяних було заготовлено восени 2010 р. в Харківській обл. (с. Борщова). Для виділення ліпофільних речовин було проведено вичерпне екстрагування сировини хлороформом в апараті Сокслета. Отриманий хлороформний екстракт упарювали до видалення екстрагенту та зважували, визначали відсотковий вміст ліпофільної фракції.

Визначення каротиноїдів та хлорофілів проводили методом тонкошарової хроматографії на пластинках «Silufol» UV-254 (Чехія) у системах розчинників гексан-ацетон (6:8) – I напрямок, гексан-ацетон (6:4) – II напрямок. Локалізацію каротиноїдів на хроматограмах визначали у видимому світлі за жовтим

забарвленням, а в УФ-світлі – за коричневою флуоресценцією плям. Для підтвердження наявності каротиноїдів хроматограми обробляли 2% розчином *n*-диметиламінобензальдегіду та хлоридної кислоти, далі хроматографи висушували у сушильній шафі при 90°C протягом 5 хв. Плями, які відповідали каротиноїдам, забарвлювалися в рожево-фіолетовий колір. Речовини 3, 4, 6 віднесені до каротиноїдів (рис. 1). Хлорофіли ідентифікували за характерним темно-зеленим забарвленням у видимому світлі, а в УФ-світлі – за яскраво-червоною флуоресценцією. Речовина 5 віднесена до хлорофілів. Токофероли мали блакитну флуоресценцію в УФ-світлі та характерне синьо-фіолетове забарвлення плям на хроматограмі при обробці парами йоду. Речовини 1, 2 віднесені до токоферолів [1]. Схема ТШХ наведена на рис. 1.

Кількісне визначення каротиноїдів та хлорофілів проводили спектрофотометричним методом; 0,05 г (т.н.) ліпофільного екстракту розчиняли у 50 мл хлороформу та визначали оптичну густину на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі 450 нм (каротиноїди) та 670 нм (хлорофіли). Розчином порівняння слугував хлороформ. Кількісний вміст (%) суми каротиноїдів (хлорофілів) в перерахунку на β -каротин (хлорофіл *a*) розраховували за формулою:

$$C = \frac{10 \cdot A \cdot 50 \cdot 100}{A_{1cm}^{1\%} \cdot m},$$

де: 10 – вміст каротину (хлорофілу) в 1 мл 1% розчину, мг; *A* – оптична густина досліджуваного розчину; *m* – маса наважки, г; $A_{1cm}^{1\%}$ – екстинція β -каротину – 2400 (екстинція хлорофілу *a* – 944,5).

Для дослідження флуоресцюючих компонентів були отримані тривимірні спектри флуоресценції ме-



Рис. 1. Схема тонкошарової хроматограми ліпофільної фракції з листя півників болотяних.

Таблиця 1

Кількісний вміст жирних кислот у ліпофільній фракції з листя півників болотяних

Назва кислоти	Індекс	Вміст кислоти, %
Насичені кислоти		
Міристинова	C14:0	0,73
Стеаринова	C18:0	2,63
Пальмітинова	C16:0	24,07
Лігноцеринова	C24:0	1,57
Арахінова	C20:0	1,58
Бегенова	C22:0	1,36
Ненасичені кислоти		
Міристоолеїнова	C14:1n6	0,69
Олеїнова	C18:1n9	4,33
Лінолева	C18:2n9,12	17,80
Ліноленова	C18:3n9,12,15	27,13
Ерукова	C22:1n13	1,22
Пальмітоолеїнова	C16:1n9	0,99
Сума насичених кислот		31,94
Сума ненасичених кислот		52,16
Сума неідентифікованих кислот		15,89

тодом тривимірної скануючої спектрофлуориметрії в ультрафіолетовому та видимому діапазонах спектра за допомогою спектрофлуориметра «Hitachi F4010». Вимірювання спектра проводили в діапазонах збудження (λ_{exc}) і випромінювання (λ_{em}) від 350 до 750 нм з кроком сканування 5 нм. Подальшу обробку записів з побудовою тривимірних графіків виконували за допомогою програмного пакету Spectra Data Lab, розробленого в НДІ хімії ХНУ ім. В.Н.Каразіна.

Визначення якісного та кількісного вмісту жирних кислот проводили методом газорідинної хроматографії (ГРХ) метилових ефірів жирних кислот на хроматографі з полум'яно-іонізаційним детектором «Shimadzu GC-14B» при наступних умовах: газ-носій – гелій; швидкість газу-носія – 1 мм/хв; температура колонки – 175°C; інжектора – 240°C; детектора – 250°C; колонка капілярна кварцева розміром 60 м × 0,32 мм; розділення 1:70, розчинник – циклогексан. Ідентифікацію жирних кислот проводили за показниками часу утримання піків метилових ефірів і стандартної суміші. Вміст жирних кислот розраховували у відсотках від їх суми. Результати наведені у табл. 1.

Для визначення антимікробної активності ліпофільної фракції з листя півників болотяних використовували метод дифузії в агар (метод «колодязів») з використанням наступних тест-мікроорганізмів: *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. vulgaris* ATCC 4636, *B. subtilis* ATCC 6633, *C. ablicans* ATCC 885/653, *St. pyogenes* ATCC 2431. Мікробне навантаження до музейних штамів становило 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища та встановлювалось за оптичним стандартом мутності ДІСК ім. Л.А.Тарасевича [1]. Визначення антимікробної дії проводили за допомогою методу серійних розведень у рідких поживних середовищах.

Результати та їх обговорення

Отримана хлороформна фракція має вигляд смолоподібної рідини темно-зеленого кольору з характерним запахом, нерозчинна у воді та етиловому спирті. Вихід ліпофільної фракції становить $3,50 \pm 0,34\%$.

Внаслідок проведеного хроматографічного аналізу ліпофільної фракції встановлено наявність хлорофілів, каротиноїдів та токоферолів. Спектрофотометричним методом визначено кількісний вміст хлорофілів ($23,03 \pm 0,05\%$) і каротиноїдів ($14,46 \pm 0,04\%$) у ліпофільній фракції.

Вперше проведено аналіз тривимірного спектра флуоресценції та проєкції спектра на площину збудження/випромінювання, який наведено у логарифмічних шкалах інтенсивності (рис. 2). Зареєстровані піки в областях λ_{exc} – 280-450, 480-530, 600-700 нм і λ_{em} – 650-760 нм, характерні для хлорофілів *a* і *b*, також у спектрі зареєстровані піки в області λ_{exc} – 340-370 нм і λ_{em} – 440-510 нм, що відповідають агліконам флавонів.

Газорідинною хроматографією у ліпофільній фракції виявлено 22 жирні кислоти, з яких 12 ідентифіковано. Значну кількість складають ліноленова (27,13%), пальмітинова (24,07%) та лінолева (17,80%) кислоти. Слід відмітити, що кислоти: лігноцеринову, арахінову, бегенову, міристоолеїнову, ерукову та пальмітоолеїнову вперше виявлено у листі півника болотяного.

Результати проведених мікробіологічних досліджень показали, що ліпофільна фракція листя півників має антибактеріальну активність по відношенню до всіх тест-штамів мікроорганізмів. Чутливими виявилися *B. subtilis* ATCC 6633 – діаметри зон затримки

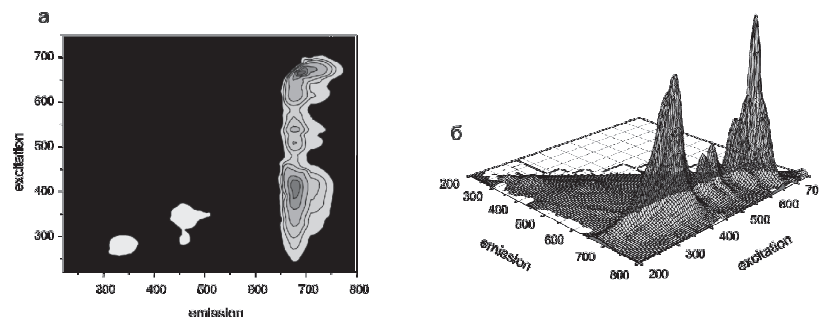


Рис. 2. Тривимірний спектр флуоресценції (б) та логарифмічна проєкція тривимірного спектра флуоресценції на площину (а) ліпофільної фракції листя півників болотяних.

Таблиця 2

Визначення антимікробної активності ліпофільної фракції з листя півників болотяних методом дифузії в агар

Діаметр зони затримки росту (мм), $M \pm m$, $p \leq 0,05$						
S.aureus ATCC 25923	S.aureus ATCC 6538	E.coli ATCC 25922	Paeruginosa ATCC 27853	B.subtilis ATCC 6633	Paeruginosa ATCC 9027	C.ablicans ATCC 885/653
14,0±0,5	16,5±0,5	14,0±0,6	13,5±0,5	20,0±0,6	12,3±0,7	15,5±0,5

Таблиця 3

Визначення антибактеріальної активності ліпофільної фракції з листя півників болотяних методом серійних розведень

Концентрація, мг/мл	МПК мг/мл		
	S.aureus ATCC 25923	E.coli ATCC 25922	Paeruginosa ATCC 27853
1,0	ріст	ріст	ріст
5,0	відсутній ріст	ріст	ріст
10,0	відсутній ріст	відсутній ріст	ріст

росту – 19-21 мм, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 25922 – 15-16 мм, діаметри зон затримки росту 12-14 мм у *St. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *C. ablicans* ATCC 885/653 вказують на малу чутливість до препарату (табл. 2).

Було зроблено кількісну оцінку антимікробної активності ліпофільної фракції листя півників боло-

тяних методом серійних розведень [1]. Результати визначення мінімальної пригнічуючої концентрації (МПК) по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів наведені у табл. 3, дані якої показують, що МПК ліпофільної фракції з листя півників болотяних до *S. aureus* складає 5,0 мг/мл, до *E. coli* – 10,0 мг/мл, по відношенню до *P. aeruginosa* відмічено ріст.

ВИСНОВКИ

1. Отримано ліпофільну фракцію з листя півників болотяних. Встановлено наявність хлорофілів, каротиноїдів, токоферолів. Визначено кількісний вміст каротиноїдів – 14,46±0,04%; хлорофілів – 23,03±0,05%.

2. Методом газорідинної хроматографії визначено якісний склад та кількісний вміст жирних кислот. Найбільшу кількість складають ліноленова (27,13%), пальмітинова (24,07%) та ліолева (17,80%) кислоти.

3. Встановлено наявність антимікробної активності ліпофільної фракції з листя півників болотяних відносно грампозитивних мікроорганізмів та визначено її кількісну оцінку.

4. Ліпофільна фракція з листя півників болотяних є перспективною сировиною у подальших розробках фітопрепаратів на її основі.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РИПЕГ, 2001. – 556 с.
2. Затильнікова О.О., Ковальов В.М., Осолодченко Т.П. // Вісник фармації. – 2008. – №3 (55). – С. 9-12.
3. Растительные ресурсы России и сопредельных государств: цветковые растения, их химический состав, использование: семейства *Butomaceae-Typhaceae*. – С.-Пб.: Наука, 1994. – 271 с.
4. Hanawa F., Tahara S., Mizutani J. // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30, №1. – P. 157-163.
5. Hanawa F., Tahara S., Mizutani J. // *Phytochemistry*. – 1991. – Vol. 30, №7. – P. 2197-2198.
6. James A. Duke Handbook of Medicinal Herbs. – Ontario: Jones & Bartlett Learning, 2009. – 624 p.
7. Khare C.P. Indian medicinal plants. – Berlin, Heidelberg: Springer – Verlag, 2007. – 836 p.
8. Materska M. // *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* – 2010. – Vol. 9 (1). – P. 61-69.
9. Reynaud J., Guilet D., Terreux R. // *Natural Product Reports*. – 2005. – Vol. 22. – P. 504-515.
10. Williams C.A., Harborne J.B., Colasante M. // *Biochem. Systematics and Ecol.* – 1997. – Vol. 25, №4. – P. 309-325.

УДК 581.45:582.579.2:661.732.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ЛИПОФИЛЬНОЙ ФРАКЦИИ ИЗ ЛИСТЬЕВ IRIS PSEUDACORUS

О.А.Затильникова, С.В.Ковалев, Т.П.Осолодченко, Е.Ю.Ахмедов
Приведены результаты исследования липофильных соединений листьев ириса болотного. В результате проведенного хроматографического анализа установлено наличие каротиноидов, токоферолов и хлорофиллов. Установлено количественное содержание каротиноидов – 14,46±0,04%, хлорофиллов – 23,03±0,05%. Определен жирнокислотный состав липофильной фракции листьев ириса болотного и установлено наличие антимикробной активности.

UDC 581.45:582.579.2:661.732.9

INVESTIGATION OF THE LIPOPHILIC FRACTION FROM LEAVES OF YELLOW IRIS

O.O.Zatylnikova, S.V.Kovalyov, T.P.Osolodchenko, E.Yu.Akhmedov
The article deals with the results of the investigation of lipophilic compounds from leaves of Yellow Iris. The presence of carotenoids, tocoferols and chlorophylls has been determined by the chromatographic analysis performed. The quantitative content of carotenoids is 14.46±0.04%, chlorophylls – 23.03±0.05%. The fatty acid content of the lipophilic fraction in Yellow Iris leaves has been determined and the presence of the antimicrobial activity has been found.