

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК ТРАВИ ДЕРЕВ'Ю ЗВИЧАЙНОГО

У результаті вивчення якісного складу та кількісного вмісту фенольних сполук трави дерев'ю звичайного та надземних органів встановлено, що фенольні сполуки досить рівномірно накопичуються в усій надземній частині рослини, тільки в листі вміст флавоноїдів та похідних гідроксикоричної кислоти децю вищий. У траві дерев'ю звичайного виявлено 33 фенольні сполуки, 14 з яких ідентифіковано.

Екстракти з надземних органів трави дерев'ю звичайного проявляють антимікробну активність відносно *S. aureus*, *B. subtilis* та *E. coli*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: фенольні сполуки, дерев'ю звичайний, листя, квітки, стебло, трава, антимікробна активність.

ВСТУП. Рід дерев'ю *Achillea* налічує понад 150 видів, поширених у Європі, Азії, Північній Африці та Північній Америці. На території України зростає 19 видів дерев'ю. В офіційній медицині використовують в основному дерев'ю звичайний *Achillea millefolium* L.s. [5].

На ринку України та Російської Федерації існує близько 20 препаратів (ротокан, вундехіл тощо), до складу яких входять біологічно активні речовини (БАР) трави дерев'ю, що мають кровоспинну, антимікробну та протизапальну дію [4].

Трава дерев'ю містить ефірні олії, флавоноїди, дубильні та гіркі речовини, вітамін К, алкалоїди та органічні кислоти [5]. Найбільш глибоко та ретельно вивчено якісний склад та кількісний вміст ефірної олії, в якій містяться сесквітерпеноїди (проазулені – до 25–30 %) та монотерпеноїди. Але всі ці дані наведено тільки для цільної трави дерев'ю, щодо даних про хімічний склад надземних органів, то в доступній нам літературі їх не виявлено. Тому метою цієї роботи було дослідити якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук надземних органів трави дерев'ю звичайного і визначити антимікробну активність їх спиртових екстрактів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження були трава, листя, стебло та квітки дерев'ю звичайного, зібрані на території Харківської області влітку 2010 року. Аналіз даної сировини проводили відповідно до вимог ДФУ [3]. Екстрагували суму БАР 96 % спиртом етиловим.

© О. А. Кисличенко, О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко, Т. П. Осолодченко, 2011.

Для виділення та ідентифікації БАР використовували фракціонування у системі рідина–рідина, методи паперової хроматографії (ПХ) та хроматографії в тонкому шарі сорбенту (ТШХ).

Похідні гідроксикоричної кислоти. Одержані з трави дерев'ю звичайного витяжки обробляли етилацетатом. Етилацетатну фракцію упарювали та хроматографували на папері з достовірними зразками гідроксикоричних кислот у системах: I – н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2) і II – 15 % оцтова кислота з наступною обробкою хроматограм парами аміаку та діазореактивом. Встановили, що в траві дерев'ю містяться кофейна (I – $R_s=0,81$; II – $R_s=0,50$) та хлорогенова кислоти (I – $R_s=0,63$; II – $R_s=0,71$). В подальшому ці сполуки було виділено в індивідуальному стані методом препаративної ТШХ та ідентифіковано на основі фізичних, хімічних властивостей та їх УФ-спектральних характеристик. В екстракті також виявили три похідні гідроксикоричної кислоти, які ідентифікувати не вдалося.

Флавоноїди. Етилацетатно-спиртову фракцію (8:2) витяжки вивчали за допомогою двомирної ПХ (Filtrak № 4): I – н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2); II – 2 % оцтова кислота. Хроматографічно було виявлено не менше 10 флавоноїдних сполук. Для встановлення аглікону, який входить до складу цих сполук, після сумарного гідролізу досліджуваної фракції 5 % сірчаною кислотою методом ПХ із достовірними зразками агліконів у системах н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2), 30 та 60 % оцтова кислота, хлороформ–оцтова кислота–вода (13:6:2) було ідентифіковано апи-

генін, лютеолін та кверцетин. Продукти сумарного гідролізу було розділено методом колонкової хроматографії (сорбент – поліамід). В результаті отримано зазначені аглікони, які ідентифікували за температурою плавлення та характеристикою УФ-спектрів.

Кумарини. Для пошуку кумаринових сполук спиртовий екстракт з трави деревію упарювали та водний залишок фракціонували сумішшю хлороформу та спирту (9:1). Отримані хлороформно-спиртові (9:1) витяжки хроматографували в системах хлороформ (формамід 25 %) та гексан (формамід 25 %). При перегляді хроматограм у фільтрованому УФ-світлі та обробці 10 % спиртовим розчином гідроксиду калію виявлено 5 речовин кумаринової природи. Для диференціації виявлених речовин кумаринової природи від похідних гідроксикоричної кислоти було проведено реакцію відщеплення різних замісників у кумариновому ядрі йодистоводневою кислотою [1] в середовищі рідкого фенолу й оцтового ангідриду.

Якісний склад і кількісний вміст основних фенольних сполук трави деревію звичайного та його надземних органів (табл. 1) вивчали за допомогою вискоєфективного рідинного хроматографа фірми “Agilent Technologies” (модель 1100), укомплектованого проточним вакуумним дегазатором G1379A, чотириклапанним насосом градієнта низького тиску G13111A, автоматичним інжектором G1313A, термостатом колонки G13116A та діодноматричним детектором G1316A.

0,5 г екстракту (точна наважка) поміщали у віалу на 5,0 мл та доводили до мітки 90 % метанолом. Після цього віалу герметично закривали та витримували 30 хв на ультразвуковій бані, настоювали при кімнатній температурі протягом 3–4 год. Потім зразок знову поміщали на ультразвукову баню на 15 хв. Вміст віали центрифугували та фільтрували крізь мембранний тефлоновий фільтр з розміром пор 0,45 мкм у віалу для аналізу.

Для хроматографування використовували колонку розміром 2,1×150 мм, заповнену октадецилсилільним сорбентом, зернистістю 3,5 мкм, “ZORBAX-SB C-18”; як рухому фазу – розчин А (0,6 % трифтороцтова кислота), розчин В (70 % MeOH та 0,6 % трифтороцтова кислота) та розчин С (100 % MeOH); швидкість подачі рухомої фази – 0,25 мл/хв; робочий тиск елюенту – 240–300 кПа; температура термостата колонки – 35 °С; об'єм проби – 2 мкл. Параметри детектування встановлено такі: масштаб виміру – 1,0, час сканування – 0,5 с, кожен пік – 190–600 нм. Ідентифікацію фенольних сполук проводили за часом утриман-

ня стандартів (Sigma Chemical Company, США) та спектральними характеристиками.

Кількісне визначення похідних гідроксикоричної кислоти, флавоноїдів та поліфенольних сполук проводили спектрофотометричним методом. Оптичну густину вимірювали у кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі Spescol 1500 (Швейцарія) за відповідної довжини хвилі. Вміст похідних гідроксикоричних кислот визначали в перерахунку на хлорогенову кислоту при довжині хвилі 327 нм, вміст суми флавоноїдів – у перерахунку на рутин при 417 нм після утворення комплексу з алюмінієм хлоридом, вміст суми поліфенольних сполук – у перерахунку на галову кислоту при 270 нм [2]. Для статистичної достовірності досліди проводили не менше п'яти разів.

Вивчення антибактеріальної активності спиртових екстрактів, одержаних з надземних органів трави деревію звичайного, проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології імені І. І. Мечникова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом канд. біол. наук. Т. П. Осолодченко.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ, для оцінки активності препаратів використовували рефренс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Candida albicans* 885/653 ATCC. Для дослідження використовували 1 % спиртові розчини екстрактів.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Ваговим методом встановили, що трава деревію звичайного складається з листя ((10,2±6,7) %), квіток ((54,9±14,7) %) та стебел ((34,8±9,7) %).

В результаті попереднього хімічного дослідження фенольного складу в усіх органах трави деревію звичайного встановлено наявність похідних гідроксикоричної кислоти, кумаринів, флавоноїдів та поліфенольних сполук [2].

Якісний склад і кількісний вміст основних фенольних сполук трави деревію звичайного та його надземних органів наведено в таблиці 1.

У траві деревію звичайного виявлено 33 фенольні сполуки, 14 з яких ідентифіковано.

Статистично оброблені результати кількісного визначення БАР наведено в таблиці 2. З одержаних даних видно, що фенольні сполуки досить рівномірно накопичуються в усій надземній частині рослини, тільки в листі вміст флавоноїдів та похідних гідроксикоричної кислоти дещо вищий.

Результати дослідження антимікробної активності екстрактів наведено в таблиці 3.

Таблиця 1 – Фенольний склад трави деревію звичайного

Час утримання, хв	Речовина	Кількісний вміст, мг/кг			
		трава	листя	квітки	стебло
12.53	Хлорогенова кислота	1468,3	1752,5	85,8	469,7
13.02	Похідна кофейної кислоти 1	78,5	88,7	10,7	30,1
15.66	Віценін-2	676,2	1075,5	103,9	62,6
16.38	Флавоноїд 1	181,5	18,5	13,5	0,0
17.03	Лютеолін-3',7'-О-диглюкозид	298,4	97,0	87,9	27,6
17.23	Флавоноїд 2	36,2	338,8	0,0	88,5
17.37	Глікозид апігеніну	177,2	918,4	170,6	0,0
17.73	Похідна кофейної кислоти 2	1276,1	685,5	418,1	24,6
18.56	Похідна кофейної кислоти 3	143,8	200,7	63,7	28,8
18.80	Похідна кофейної кислоти 4	2660,6	2494,0	422,0	339,8
19.09	Похідна кофейної кислоти 5	291,5	884,1	225,6	168,7
19.33	Лютеолін-7-О-глюкозид	2797,1	2728,9	3711,5	163,5
19.64	Рутин	625,6	1894,8	0,0	410,6
20.00	Флавоноїд 3	1663,1	1020,8	592,8	357,8
20.24	Похідна кофейної кислоти 6	1855,0	3044,6	508,5	544,6
20.57	Апігенін-7-О-рутинозид	552,7	183,1	533,8	94,5
20.87	Апігенін-7-О-глюкозид	666,1	163,6	1249,6	0,0
21.04	Флавоноїд 4	2814,7	2475,6	867,4	747,7
21.26	Флавоноїд 5	1177,6	1222,6	1612,1	146,8
22.42	Похідна апігеніну 1	321,7	246,2	120,5	81,7
22.80	Похідна апігеніну 2	582,6	186,4	1144,5	0,0
24.23	Лютеолін	1335,7	241,8	5799,7	12,6
25.84	Апігенін	153,9	41,8	1263,9	4,5
26.21	Флавоноїд 6	236,7	95,1	769,6	23,5
26.65	Хризаріол	159,4	1246,6	0,0	42,7
27.48	Флавоноїд 7	298,0	123,6	38,3	0,0
27.88	Дисметин	272,4	404,1	532,7	20,4
28.95	Флавоноїд 8	315,1	550,8	790,0	32,0
29.45	Флавоноїд 9	175,6	97,1	0,0	0,0
29.57	Флавоноїд 10	337,0	101,1	63,4	4,3
30.22	Генкваніїн	58,1	54,4	0,0	0,0
30.39	Флавоноїд 11	522,4	317,0	369,7	9,2
30.91	Акацетин	108,9	33,9	0,0	0,0

Таблиця 2 – Кількісний вміст фенольних сполук у траві деревію звичайного

Метод аналізу	Кількісний вміст, % (в перерахунку на суху сировину)			
	трава	листя	квітки	стебло
Вихід спиртового екстракту, %	1,92	1,98	1,29	1,06
Похідні гідроксикоричної кислоти				
Спектрофотометричний метод у перерахунку на хлорогенову кислоту	0,468±0,011	0,499±0,023	0,47±0,041	0,466±0,021
Флавоноїди				
Спектрофотометричний метод у перерахунку на рутин	0,0315±0,016	0,049±0,006	0,035±0,003	0,032±0,004
Фенольні сполуки				
Спектрофотометричний метод у перерахунку на галову кислоту	0,410±0,015	0,320±0,002	0,332±0,004	0,279±0,003

Таблиця 3 – Антимікробна активність екстрактів з трави деревію звичайного

Мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту, мм			
	трава	листя	квітки	стебло
<i>S. aureus</i> 25923	20	21	21	20
<i>E. coli</i> 25922	13	18	16	16
<i>Proteus vulgaris</i> 4636	–	–	–	11
<i>B. subtilis</i> 6633	15	15	15	16
<i>P. aeruginosa</i> 27853	–	–	12	11
<i>S. pyogenes</i> 2432	12	–	12	12
<i>Candida albicans</i> 885/653	13	–	12	11

Примітка. “–” – ріст мікроорганізму.

Екстракти з надземних органів трави деревію звичайного проявляють антимікробну активність відносно *S. aureus*, *B. subtilis* та *E. coli*.

ВИСНОВКИ. В результаті вивчення якісного складу та кількісного вмісту фенольних сполук трави деревію звичайного та надземних органів рослини встановлено, що фенольні сполуки досить рівномірно накопичуються в усій надземній частині рослини, тільки в листі вміст флавоноїдів та похідних гідроксикорич-

ної кислоти дещо вищий. Враховуючи вихід спиртових екстрактів, отриманих з різних видів досліджуваної сировини, доцільно використувати обмолочену траву деревію звичайного, але це потребує подальшого вивчення. У траві деревію звичайного виявлено 33 фенольні сполуки, 14 з яких ідентифіковано. Екстракти з надземних органів трави деревію звичайного проявляють антимікробну активність відносно *S. aureus*, *B. subtilis* та *E. coli*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Гиоргобиани Э. Д. Действие йодистоводородной и хлористоводородной кислот на природные кумарины / Э. Д. Гиоргобиани, Н. Ф. Комиссаренко // Сообщ. АН ГрССР. – 1969. – 32, № 2. – С. 265–268.

2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-ше вид. – Харків : РІРЕГ, 2001. – 556 с.

3. Дослідження фенольних сполук листя евкалипта / О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко, А. М. Ковальова [та ін.] // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 151–161.

4. Машковский М. Д. Лекарственные средства : в 2 т. – 14 изд. – М. : Новая волна, 2000. – 608 с.

5. Фармацевтична енциклопедія / під ред. В. П. Черних. – 2-ге вид. – К. : МОРИОН, 2010. – С. 415–416.

А. А. Кисличенко, О. Н. Кошевой, А. Н. Комиссаренко, Т. П. Осолодченко
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

Резюме

В результате изучения качественного состава и количественного содержания фенольных соединений травы тысячелистника обыкновенного и надземных органов установлено, что фенольные соединения довольно равномерно накапливаются во всей надземной части растения, только в листьях отмечается несколько большее содержание флавоноидов и производных гидроксикоричной кислоты. В траве тысячелистника обыкновенного обнаружено 33 фенольных соединения, из которых 14 было идентифицировано.

Экстракты из надземных органов травы тысячелистника обыкновенного проявляют антимикробную активность по отношению к *S. aureus*, *B. subtilis* и *E. coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фенольные соединения, тысячелистник обыкновенный, листья, цветки, стебло, антимикробная активность.

О. А. Kyslychenko, О. М. Koshovyi, А. М. Komisarenko, Т. Р. Osolodchenko
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

STUDY OF ACHILLEA MILLEFOLIUM HERBS PHENOL COMPOUNDS

Summary

As a result of the study of qualitative and quantitative composition of *Achillea millefolium* herbs phenol compounds and elevated organ, the fact that phenol compounds are enough accumulated in the whole elevated part of the plant was installed, only in leaves a little more flavonoids and derivatives of hydroxycinnamic acids are kept. In *Achillea millefolium* herb 33 phenol compounds were installed, from which 14 were identified. The Extracts of *Achillea millefolium* elevated organs show antibacterial activity against to *S. aureus*, *B. subtilis* and *E. coli*.

KEY WORDS: phenol compounds, *Achillea millefolium*, leaves, flower, stem, antibacterial activity.

Отримано 18.10.11

Адреса для листування: О. М. Кошовий, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна.