

І.І. Тернинко¹, В.С. Кисличенко²

Фітохімічне вивчення ліпофільних фракцій з трави *Calendula officinalis* (L.) та *Chamomilla recutita* (L.)

¹Луганський державний медичний університет,²Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: календула, ромашка, жирні кислоти, каротиноїди, хлорофіл.

Ключевые слова: календула, ромашка, жирные кислоты, каротиноиды, хлорофилл.

Key words: marigold, matricaria, fatty acids, carotenoids, chlorophylls.

Наведено результати фітохімічного дослідження ліпофільних фракцій з трави календули лікарської та ромашки лікарської. Вивчено якісний склад і кількісний вміст жирних кислот у сировині. Встановлено, що в траві календули переважають насичені (76,58%), а в траві ромашки – ненасичені (57,81%) кислоти. Методом тонкошарової хроматографії та тривимірної флуоресцентної спектроскопії вивчено якісний склад ліпофільних екстрактів досліджуваних рослин. Методом УФ-спектрофотометрії визначено вміст рослинних пігментів – каротиноїдів і хлорофілу.

Приводятся результаты фитохимического исследования липофильных фракций из травы календулы лекарственной и ромашки лекарственной. Изучен качественный состав и количественное содержание жирных кислот в сырье. Установлено, что в траве календулы преобладают насыщенные (76,58%), а в траве ромашки – ненасыщенные (57,81%) кислоты. Методом тонкослойной хроматографии и трехмерной флуоресцентной спектроскопии изучен качественный состав липофильных экстрактов исследуемых растений. Методом УФ-спектрофотометрии изучено содержание растительных пигментов – каротиноидов и хлорофилла.

The results of phytochemical research of lipophilic fractions from a *Calendula* and *Chamomilla* grass have been given in the article. Qualitative composition and quantitative content of fatty acids in raw materials were studied. It is established that in a *Calendula* grass prevail sated (76,58 %), and in a *Chamomilla* grass – nonsaturated (57,81 %) acids. By a method of thin-layer chromatography and three-dimensional fluorescent spectroscopy it is studied qualitative composition of lipophilic extracts of investigated plants. By a method of UV-spectrophotometry it is studies the maintenance of vegetative pigments – carotinoids and a chlorophyll.

Фітопрепарати завжди посідали чільне місце в асортименті аптечних мереж, а попит на них останнім часом поступово збільшується. Таку тенденцію формують безліч факторів, серед яких зростання довіри споживача до фітопрепаратів. Тому для фітохіміків актуальною задачею є пошук нових альтернативних джерел для виготовлення рослинних лікарських засобів. Особливу увагу привертають рослини, що поширені в нашій місцевості, тобто ті, що мають достатню сировинну базу та лікувальні властивості яких добре відомі.

Перспективними в цьому напрямку є рослини з родини *Asteraceae* (Айстрові): календула лікарська (*Calendula officinalis* (L.)) та ромашка лікарська (*Chamomilla recutita* (L.)). Ці рослини добре відомі та широко використовуються офіційною медициною у якості класичних протизапальних та антибактеріальних засобів [8,10]. У якості офіційальної сировини використовуються квітки цих рослин, а їх хімічний склад добре відомий [5,6]. Однак залишається достатня сировинна база надземної частини цих рослин, що вивчена недостатньо. Тому для розширення сировинних джерел виготовлення нових фітозасобів актуальним є фітохімічне дослідження трави календули та ромашки. Аналіз джерел наукової літератури [2,11] свідчить про першочергову актуальність вивчення саме ліпофільних фракцій із зазначеної сировини. Оскільки відомо, що ліпофільні екстракти рослин містять комплекс біологічно активних сполук, зокрема хлорофіли, жирні кислоти, жиророзчинні вітаміни,

фітостероли, фенольні сполуки та інші речовини, що виявляють різноманітну біологічну активність.

Мета роботи

Вивчення якісного складу та кількісного вмісту ліпофільних речовин, зокрема жирних кислот, каротиноїдів і хлорофілу у траві календули лікарської та ромашки лікарської.

Для ліпофільних речовин характерний досить широкий спектр фармакологічної активності. Так, жирні кислоти (насичені й поліненасичені) входять до складу тканин організму людини, характеризуються енергетичною та структурною функцією [9]. Хлорофіл покращує стан кровоносних судин, виявляє антимікробну та антиоксидантну дію, а каротиноїди беруть участь в окислювально-відновлювальному процесі та є носіями активного кисню [1]. Ці рослинні пігменти використовують у медицині та косметології у якості протизапальних, ранозагоюючих та антибактеріальних засобів [1,7,9].

Матеріали і методи дослідження

Об'єкт дослідження – трава календули лікарської та ромашки лікарської, заготовлена в 2009–2010 рр. на території Луганської області; збирали під час цвітіння рослини в червні-серпні та сушили у затінку на відкритому повітрі. Сировину подрібнювали до розміру часток 1–3 мм й використовували для отримання хлороформних фракцій за загально відомою методикою [4]. Потім визначали відсотковий вміст отриманих сумарних комплексів і їх органолептичні показники.

Якісний склад ліпофільних фракцій вивчали методом двовимірної хроматографії у тонкому шарі сорбенту в системах розчинників: гексан-ацетон 3:2 (перший напрям) і гексан-ацетон 3:1 (другий напрям). Ідентифікацію речовин проводили за характерним забарвленням у видимому, УФ-світлі та після обробки відповідними хромогенними реагентами. Локалізацію хлорофілів на хроматограмі визначали за характерним темно-зеленим забарвленням у видимому світлі й за яскраво-червоною флуоресценцією в УФ-світлі. Плями кумаринів мали блакитну флуоресценцію в УФ-світлі та набували жовтогарячого забарвлення після обробки діазореактивом. Визначення каротиноїдів проводили за жовтогарячим забарвленням, а в УФ-світлі – за коричневою флуоресценцією плям. Для підтвердження наявності каротиноїдів хроматограми обробляли 2% розчином *p*-диметиламінобензальдегіду у суміші етанолу та кислоти хлоридної з наступним нагріванням при 80–90°C протягом 5–7 хв. Плями каротиноїдів забарвлювались у рожево-фіолетовий колір. Флавоноїдні аглікони ідентифікували за жовтою флуоресценцією плям в УФ-світлі й за коричневим забарвленням після обробки 2% спиртовим розчином алюмінію хлориду.

Метод визначення жирнокислотного складу заснований на перетворенні тригліцеридів жирних кислот у метилові етери та газохроматографічному аналізі останніх на газовому хроматографі «Селміхром-1» з полум'яно-іонізаційним детектором. Речовини розділяли на газохроматографічній колонці з нержавіючої сталі довжиною 2,5 м та внутрішнім діаметром 4 мм. Колонку заповнювали нерухомою фазою – інертоном, обробленим 10% діетилглікольсукцинатом (DEGS). На хроматографі встановлювали такі параметри: температура термостату колонок – 180°C; температура випарника – 230°C; температура детектора – 220°C; швидкість потоку газу-носія (азоту) – 30 см³/хв; об'єм проби – 2 мм³ розчину метилових ефірів кислот у гексані.

Ідентифікацію метилових етерів жирних кислот здійснювали за часом утримання піків у порівнянні зі стандартною сумішшю. Розрахунок складу метилових етерів проводили методом внутрішньої нормалізації. Як стандарти використовували зразки насичених і ненасичених метилових етерів жирних кислот фірми «Sigma».

Метилові етери жирних кислот отримували за модифікованою методикою Пейскера, що забезпечує повне метилювання. Для метилювання використовували суміш хлороформу з метанолом і кислотою сульфатною у співвідношенні 100:100:1 [12].

Визначення кількісного вмісту суми каротиноїдів і суми хлорофілів проводили спектрофотометричним методом на приладі Hitachi U3210.

Для детальнішого вивчення ліпофільних сполук досліджуваних рослин отримано тривимірні спектри флуоресценції методом тривимірної скануючої спектрофлуориметрії (3 DF-спектроскопії), який є багатифакторним методом для якісного аналізу сумішей, що

вміщують флуоресціюючі компоненти. 3 DF-спектри, що мають вигляд поверхні, яка характеризується функцією $I=f(\lambda_{\text{exc}}, \lambda_{\text{em}})$, реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах спектру за допомогою спектрофлуориметра Hitachi F4010. Вимірювання проводили в інтервалі довжин хвиль збудження (λ_{exc}) – 220–750 нм і довжин хвиль флуоресценції (λ_{em}) 220–800 нм (крок сканування – 10 нм; щілини – збудження/флуоресценції – 5/5 нм; розчинник – хлороформ). Подальшу обробку записів з побудовою тривимірних графіків виконували за допомогою програмованого пакета Spektra Data Lab, розробленого в НДІ хімії ХНУ ім. М. Каразіна [3].

Результати та їх обговорення

Вихід ліпофільних комплексів склав 8,1 та 7,5% трави ромашки та трави календули відповідно. Ліпофільні фракції являють собою мазеподібні маси темно-зеленого кольору, з приємним запахом, легко розчинні у хлороформі, гексані, ефірі й мало розчинні в спирті. В результаті хроматографічного аналізу в ліпофільних фракціях об'єктів дослідження ідентифіковано хлорофіли, каротиноїди, флавоноїдні аглікони та кумарини.

У результаті газохроматографічного аналізу встановлено наявність 16 жирних кислот у траві ромашки та 17 жирних кислот у траві календули, з яких ідентифіковано 11 (сума ідентифікованих жирних кислот складає 86,84 і 82,8% відповідно). Результати досліджень наведено у таблиці 1.

Як видно з таблиці 1, серед ідентифікованих сполук у траві календули кількісно переважає пальмітинова кислота (26,12%), а в траві ромашки – ліноленова кислота (21,72%), що є незамінною. До того ж, для трави календули характерний значний вміст міристинової кислоти (22%), а для трави ромашки – олеїнової та лінолевої кислот (12,7 та 15,41%). Трава ромашки відрізняється більшим відсотковим вмістом ненасичених жирних кислот (57,81%), що дуже важливо у фармакологічному аспекті.

Аналіз тривимірних спектрів флуоресценції досліджуваних ліпофільних екстрактів, а також проекції цих спектрів на площину дозволяє зробити додаткові висновки про якісний склад досліджуваних об'єктів. Результати експерименту наведено на рис. 1 і 2.

Для ліпофільної фракції з трави календули в області збудження (λ_{exc}) 260–280 нм, 310–340 нм та емісії (λ_{em}) 330–420 нм спостерігали серію піків, притаманну простим поліфенолам. В області λ_{exc} 300–380 нм та λ_{em} 460–520 нм відзначали піки, характерні для флавононих агліконів. Пік низької інтенсивності в області λ_{exc} 500–550 нм та λ_{em} 540–580 нм характерний жовтогарячому пігменту, що має червону флуоресценцію, а серія піків в області λ_{exc} 340–460, 480–560, 590–700 нм та λ_{em} 660–750 нм – діапазон флуоресценції суміші хлорофілів а і b.

Вміст жирних кислот у траві календули та траві ромашки

Жирні кислоти	Вміст жирних кислот, % до суми	
	Об'єкти дослідження	
	Трава календули	Трава ромашки
C 10:0 капринова (деканова)	-	3,47
C 12:0 лауринова (додеканова)	3,56	0,26
*	4,17	2,49
C 14:0 міристинова (тетрадеканова)	22,02	1,83
C 14:1 міристолеїнова	-	0,37
*	1,68	-
C 16:0 пальмітинова (гексадеканова)	26,12	16,56
C 16:1 пальмітинолеїнова (гексадеценова)	0,98	-
*	-	1,59
*	2,18	1,07
C 18:0 стеаринова (октадеканова)	3,77	4,41
C 18:1 олеїнова (октадеценова)	2,89	12,70
C 18:2 лінолева (октадекадієнова)	7,29	15,41
C 18:3 ліноленова (октадекатрієнова)	8,23	21,72
C 20:0 арахінова (ейкозанова)	0,94	-
*	1,59	-
*	3,70	7,04
C 22:0 бегенова (докозанова)	1,38	2,71
*	3,88	0,97
C 24:0 лігноцерінова (тетракозанова)	5,62	7,40
Вміст суми насичених жирних кислот серед ідентифікованих	76,58	42,19
Вміст суми ненасичених жирних кислот серед ідентифікованих	23,42	57,81

Примітка: * – не ідентифіковані компоненти.

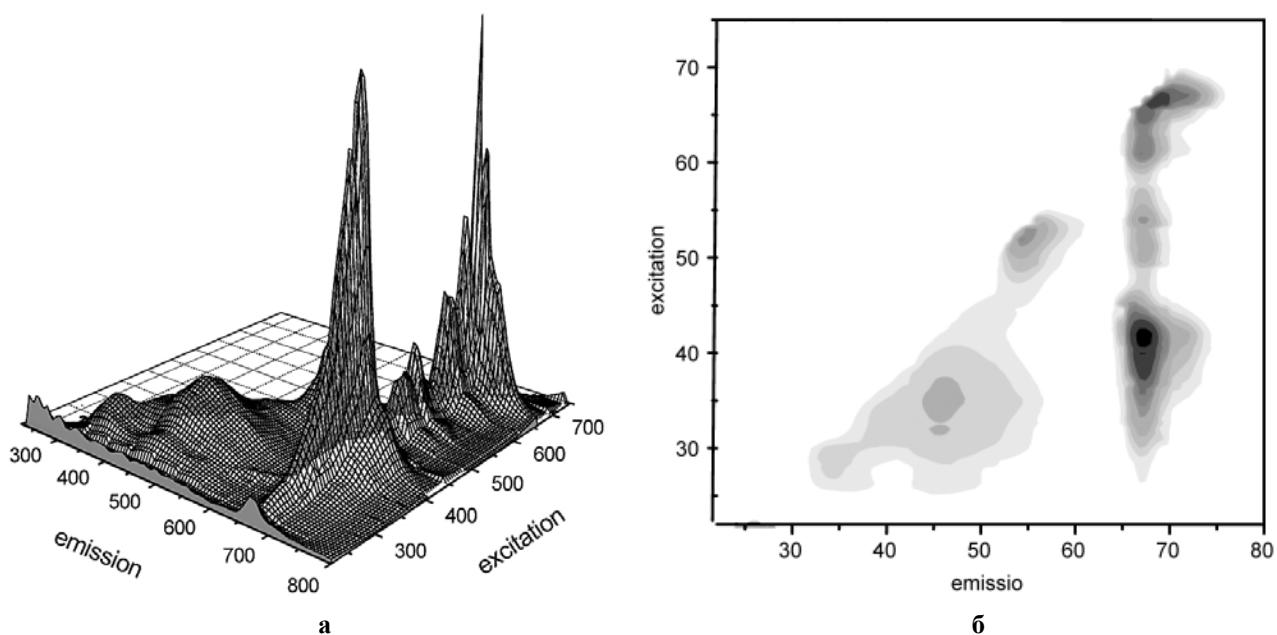


Рис. 1. Тривимірний спектр флуоресценції (а) та його логарифмічна проекція на площину (б) ліпофільної фракції з трави календули лікарської.

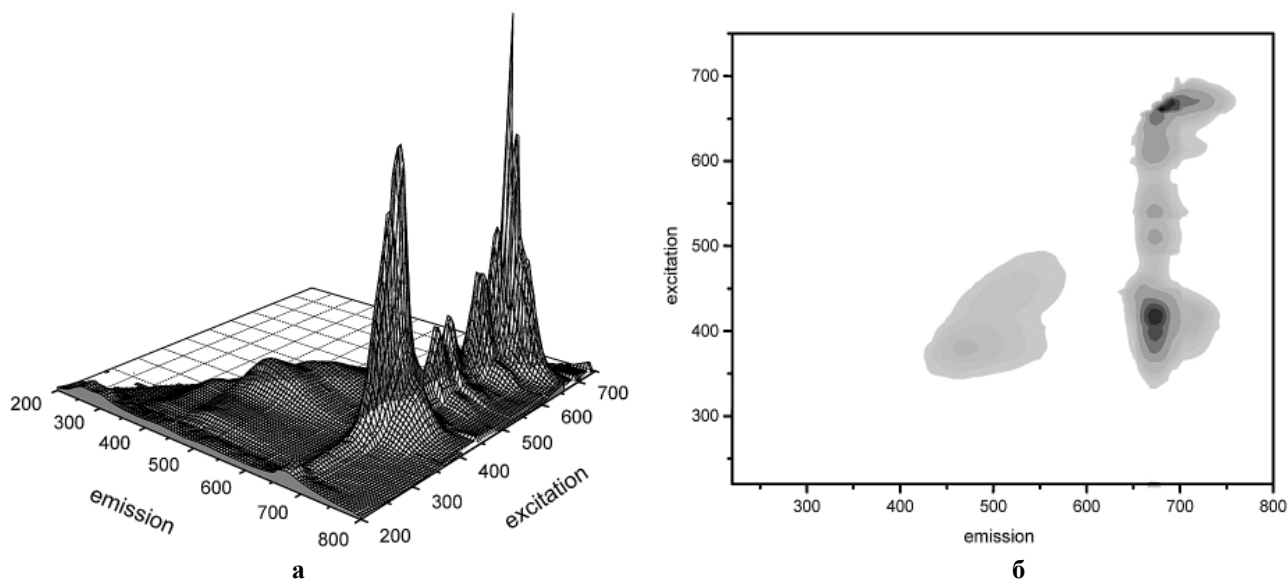


Рис. 2. Тривимірний спектр флуоресценції (а) та його логарифмічна проекція на площину (б) ліпофільної фракції з трави ромашки лікарської.

У спектрі ліпофільного екстракту з трави ромашки серія піків в області збудження λ_{exc} 360–410 нм та випромінювання λ_{em} 430–500 нм відповідає агліконам флавонолів. В області λ_{exc} 440–480 нм та λ_{em} 470–550 нм відзначали пік, характерний для жовтогарячого пігменту, що має червону флуоресценцію. Також у ділянці λ_{exc} 340–460 нм, 480–560, 590–700 нм та λ_{em} 660–750 нм спостерігали піки, що відповідають суміші хлорофілу.

Також результати проведених досліджень свідчать про достатній вміст рослинних пігментів. Так, вміст каротиноїдів у траві календули та ромашки складає 22,45 і 40,39 мг/г відповідно, а вміст хлорофілу – 31,76 і 48,05 мг/г. Загальний вміст пігментів (у %) складає: 5,4% у траві календули та 8,8% у траві ромашки.

Висновки

Отримано ліпофільні фракції з трави календули та ромашки. Методом газової хроматографії вивчено жирнокислотний склад досліджуваних рослин. У траві календули серед ідентифікованих компонентів переважають насичені (76,58%), а в траві ромашки ненасичені (57,81%) кислоти. Методом тривимірної флуоресцентної спектроскопії вивчено якісний склад ліпофільних екстрактів досліджуваних рослин. Встановлено наявність простих фенолів, агліконів флавонолів і флавонолів, хлорофілу та жовтогарячого пігменту, що має червону флуоресценцію. Методом УФ-спектрофотометрії визначено вміст рослинних пігментів – каротиноїдів і хлорофілу.

Проведені дослідження можуть бути використані при розробці методів контролю якості на досліджувану сировину та при створенні нових фітозасобів.

Література

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / Г. Бриттон. – М.: Мир, 1986. – 422 с.
2. Бурда Н.С. Вивчення ліпофільних екстрактів трави та підземних органів *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim / Н.С. Бурда [та ін.] // Український медичний альманах. – 2010. – Т. 13, №6. – С. 37–39.
3. Визначення видового походження рослинних олій / В.А. Параніч [та ін.] // Фармац. журнал. – 2000. – №5. – С. 86–90.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е видання. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
5. Державна Фармакопея України. – Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е видання. – Доповнення 2. – Х.: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
6. Державна Фармакопея України. – Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е видання. – Доповнення 3. – Х.: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2009. – 280 с.
7. Кретович В.Л. Биохимия растений / В.Л. Кретович. – М.: Высшая школа, 1986. – 503 с.
8. Кьосев П.А. Полный справочник лекарственных растений / П.А. Кьосев. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2000. – 992 с.
9. Ластухін Ю.О. Хімія природних органічних сполук: навч. посібник / Ю.О. Ластухін. – Львів: Інтеллект-Захід, 2005. – 560 с.
10. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзинський. – К.: «Українська Енциклопедія» ім. М.П.Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. – 544 с.
11. Липиды и липофильные компоненты некоторых растений / В.С. Кисличенко [и др.] // Химия природных соединений. – 2006 – №2 – С. 182–183.
12. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований / М.И. Прохорова. – Л.: Химия, 1982. – 272 с.

Відомості про авторів:

Тернинко І.І., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ».

Кисличенко В.С., д. фарм. н., зав. каф. хімії природних сполук НФаУ.

Адреса для листування:

Тернинко Інна Іванівна. 91021, м. Луганськ, вул. Оборони Луганська, 1, каф. фармацевтичної хімії та фармакогнозії ДЗ «ЛугДМУ».

Тел.: (0642) 63 02 95. E-mail: inatern@gmail.com