

О.Ю. Лещенко, О.В. Горяча, Т.В. Ільїна, А.М. Ковальова

ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ХЛОРОФОРМНОЇ ФРАКЦІЇ ТРАВИ ПІДМАРЕННИКА НЕСПРАВЖНЬОМ'ЯКОГО

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: підмаренник несправжньом'який, хлороформна фракція, терпеноїди, вуглеводні, жирні кислоти.

Ключевые слова: подмаренник ложномягкий, хлороформная фракция, терпеноиды, углеводороды, жирные кислоты.

Key words: *Galium pseudomollugo*, chloroformic fraction, terpenoids, hydrocarbons, fatty acids.

Методом хромато-мас-спектрометрії вивчено компоненти ліпофільної фракції трави підмаренника несправжньом'якого – *Galium pseudomollugo* Klok. У результаті дослідження виявлено і встановлено вміст 33 сполук, серед яких 24 ідентифіковано. Жирнокислотний склад представлено 14 насиченими і 7 ненасиченими жирними кислотами. Домінуючою є пальмітинова кислота.

Методом хромато-мас-спектрометрії изучены компоненты липофильной фракции травы подмаренника ложномягкого – *Galium pseudomollugo* Klok. В результате исследования выявлено и установлено содержание 33 соединений, из которых 24 идентифицированы. Жирнокислотный состав представлен 14 насыщенными и 7 ненасыщенными жирными кислотами. Доминирующей является пальмитиновая кислота.

By the method of chromat-mass-spectrometry the study of the components of *Galium pseudomollugo* Klok. herb's lipophilic fraction was carried out. 33 compounds were found, of which 24 were identified. Fatty acid composition is represented by 14 saturated and 7 unsaturated fatty acids. Palmitic acid is a dominant compound.

Серед рослин флори України науковий інтерес становлять рослини роду підмаренник *Galium* L. родини маренові *Rubiaceae* Juss. Підмаренник несправжньом'який – *G. pseudomollugo* Klok. – характерний лише для флори України (секція *Eugaliium* DC., ряд *Erecta* Pobed.), трапляється майже по всій території України і широко використовується в народній медицині як сечогінний, жовчогінний, седативний і болетамуючий засіб [2,4].

Встановлено, що в підземній частині рослини містяться алізаринові антраценпохідні, у надземній – фенолкарбонові кислоти, флавоноїди, дубильні речовини [1,2]. Ліпофільні сполуки майже не досліджено.

МЕТА РОБОТИ

Встановлення компонентного складу хлороформної фракції трави *Galium pseudomollugo* Klok.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом дослідження стала хлороформна фракція, отримана шляхом вичерпного екстрагування хлороформом в апараті Сокслета повітряно-сухої трави підмаренника несправжньом'якого, заготовленої у фазі цвітіння у липні 2011 року в Ново-Водолажському районі Харківської області. Екстракт концентрували до сухого залишку.

Визначення вмісту хлорофілів проводили спектрофотометричним методом [3]. Для цього 0,01 г (точна наважка) фракції поміщали у мірну колбу на 25 мл, розчиняли у 96% спирті етиловому та доводили розчинником до мітки. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на спектрофотометрі СФ-42 при довжині хвилі 649 та 665 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували 96% спирт етиловий. Концентрацію хлорофілів розраховували за формулами [3]:

$$C_{\text{хл.а}} = 13,70 \cdot A_{665} - 5,76 \cdot A_{649}$$

$$C_{\text{хл.б}} = 25,80 \cdot A_{649} - 7,60 \cdot A_{665}$$

де A_{649} – оптична густина розчину при довжині хвилі 649 нм,

A_{665} – оптична густина розчину при довжині хвилі 665 нм.
Вміст хлорофілу a (мг/100г) у досліджуваній фракції розраховували за формулою:

$$X = \frac{C_{\text{Хла}} \cdot V \cdot 100}{m \cdot 1000}$$

де V – об'єм розчину, мл;

m – маса наважки, г;

$C_{\text{Хла}}$ – концентрація хлорофілу a .

Вміст хлорофілу b розраховували аналогічно.

Для відгонки летких сполук використовували віали «Agilent» на 22 мл (part number 5183-4536) з відкритими кришками і силіконовим ущільнювачем. У віалу на 20 мл поміщали наважку хлороформного екстракту, додавали розчин тридекану (50 мкг на наважку) в гексані як внутрішній стандарт, заливали до половини об'єму віали, прикручували кришку з холодильником і поміщали на піщаний нагрівник з підігрівом. Після кипіння протягом 2 годин трубку з кришкою знімали і 3 мл особливо чистого пентану промивали зворотній холодильником, на внутрішній поверхні якого адсорбувались леткі сполуки. Змив збирали в суху віалу на 10 мл з подальшим його концентруванням шляхом продування особливо чистим азотом (100 мл/хв) до об'єму 10 мкл, який повністю збирали хроматографічним шприцом. Подальше концентрування проби проводили у самому шприці до об'єму 2 мкл. Введення проби у хроматографічну колонку проводили в режимі splitless. Швидкість введення проби – 1,2 мл/хв протягом 0,2 хв [5,7].

Для детального аналізу жирних кислот проводили



Таблиця 1

Ідентифіковані леткі сполуки хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього'якого

Час утрим., хв	Сполука	Вміст, мг/1000 г
3,53	2,4-Пентандіон	82,5
7,38	Транс-2-гептеналь	149,0
9,15	Транс-2,4-гептадіеналь	61,1
12,27	Не ідентифіковано	63,9
23,15	Не ідентифіковано	113,4
25,57	Дигідроактинідіолід	100,3
25,8	Цис-неофітадієн	928,6
26,17	Міристинова кислота	143,7
26,23	Цис-, транс-неофітадієн	118,4
26,47	Транс-неофітадієн	272,6
26,77	Гексагідрофарнезиллацетон	357,7
27,75	Ейкозен-3	370,0
28,7	Етилпальмітат	306,7
28,86	Пальмітинова кислота	2784,7
29,32	Фталат	84,1
30,21	Фітол	357,9
30,96	Не ідентифіковано	175,6
31,08	Стеаринова кислота	412,9
31,33	Лінолева кислота	867,6
31,64	Ліноленова кислота	523,1
33,02	Не ідентифіковано	119,6
33,15	Ейкозанова кислота	120,6
33,69	Не ідентифіковано	96,3
34,92	Гептакозан	209,5
36,71	Нонакозан	1076,2
37,53	Не ідентифіковано	125,2
37,85	Не ідентифіковано	194,3
38,36	Не ідентифіковано	782,6
40,51	Стігмастерол	240,5
41,09	Не ідентифіковано	241,0
42,35	Кемпестерол	324,2
42,56	Не ідентифіковано	361,5
43,02	γ-Ситостерол	1266,9

попередню підготовку зразка екстракту, що полягає у метилуванні жирних кислот 14% розчином BCl_3 в абсолютному метанолі з метою отримання летких похідних з низькою температурою кипіння. Суміш витримували в герметично закупореній віалі протягом 8 годин при 65°C . Метиллові ефіри жирних кислот екстрагували хлористим метилом [6].

Склад хлороформної фракції досліджували на хроматографі Agilent Technology 6890N з мас-спектрометричним детектором 5973N. Умови аналізу: хроматографічна колонка капілярна DB-5 (для визначення компонентів до метилування) та INNOWAX (для визначення компонентів після

Таблиця 2

Жирні кислоти хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього'якого

Час утримування, хв	Кислота	Загальна формула	Вміст у фракції, мг/кг	Вміст у сумі жирних кислот, %
4,76	Капронова	$\text{C}_{6:0}$	305	0,40
6,7	2-Гексенова	$\text{C}_{6:1}$	122	0,16
11,11	Нонанова	$\text{C}_{9:0}$	184	0,24
13,41	Капринова	$\text{C}_{10:0}$	100	0,13
17,82	Лауринова	$\text{C}_{12:0}$	254	0,34
21,92	Міристинова	$\text{C}_{14:0}$	2496	3,31
25,83	Пальмітинова	$\text{C}_{16:0}$	27827	36,88
26,07	7-Октадеценава	$\text{C}_{18:1n7}$	548	0,73
26,68	Пальмітолеїнова	$\text{C}_{16:1n9}$	906	1,20
27,54	Гептадеканова	$\text{C}_{17:0}$	994	1,32
29,31	Стеаринова	$\text{C}_{18:0}$	3993	5,29
29,6	Олеїнова	$\text{C}_{18:1n9}$	5347	7,09
29,71	10-Октадеценава	$\text{C}_{18:1n10}$	549	0,73
30,39	Лінолева	$\text{C}_{18:2n9,12}$	13826	18,32
31,44	Ліноленова	$\text{C}_{18:3n9,12,15}$	9958	13,20
32,59	Арахінова (ейкозанова)	$\text{C}_{20:0}$	3127	4,14
34,14	Хенейкозанова	$\text{C}_{21:0}$	597	0,79
35,65	Бегенова (докозанова)	$\text{C}_{22:0}$	2185	2,90
37,1	Трикозанова	$\text{C}_{23:0}$	425	0,56
38,52	Лігноцерінова (тетракозанова)	$\text{C}_{24:0}$	899	1,19
41,21	Церотінова (гексакозанова)	$\text{C}_{26:0}$	811	1,07
Загалом			75453	100,00

метилування) 30 м завдовжки й внутрішнім діаметром 0,25 мм. Газ-носій – гелій. Температура термостату – 50°C з програмуванням $4^\circ/\text{хв}$ до 320°C .

Отримані спектри розглядали як на основі загальних закономірностей фрагментації молекул органічних сполук під дією електронного удару, так і порівнянням результатів з даними мас-спектральної бібліотеки NIST05 та WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів понад 470000 у поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST. Вміст сполук розраховували відносно до внутрішнього стандарту.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вихід хлороформної фракції склав 4,03%. Вміст хлорофілу *a* у фракції становить 1,60%, хлорофілу *b* – 0,91%.

У результаті дослідження виявлено і встановлено вміст 33 летких сполук, серед яких ідентифіковано 24 (рис. 1, табл. 1). Сумарний вміст летких компонентів у хлороформній фракції складає 1,3%.

Серед них терпеноїди (19,71% суміші): дигідроактинідіолід, гексагідрофарнезиллацетон, фітол, стігмастерол, кемпе-

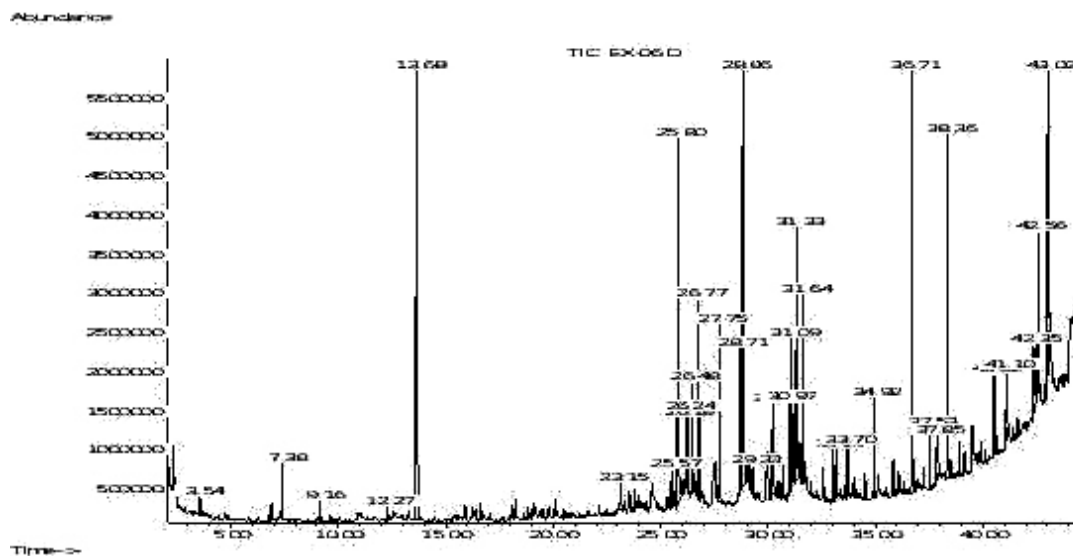


Рис. 1. Схема хроматограми летких сполук хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього'якого.

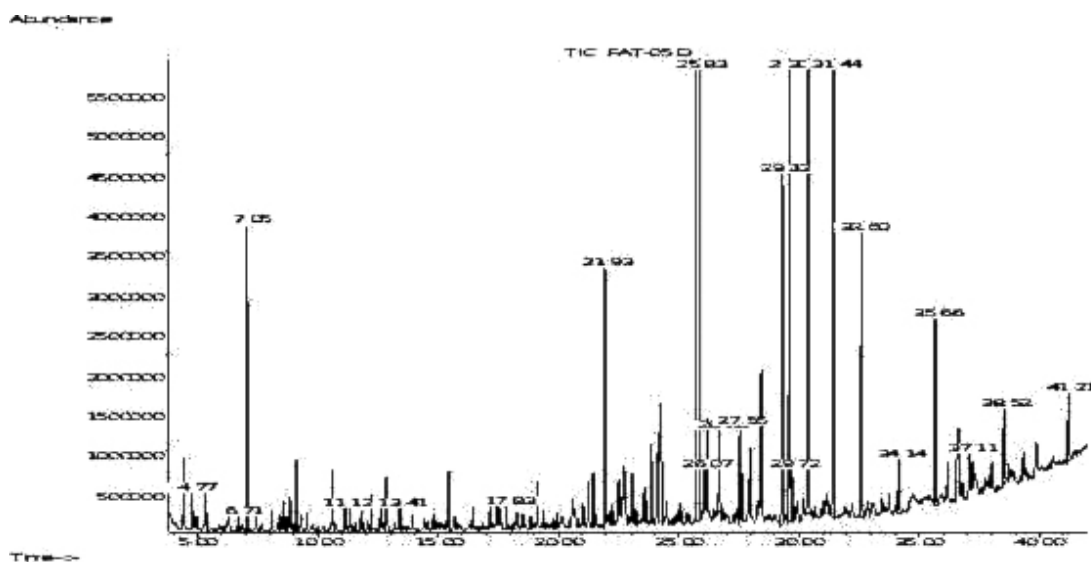


Рис. 2. Схема хроматограми метилових ефірів жирних кислот хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього'якого.

стерол, γ -ситостерол; вищі вуглеводні (22,15%): цис-неофітадієн, цис-,транс-неофітадієн, транс-неофітадієн, ейкозен-3, гептакозан, нонакозан; вищі жирні кислоти та їх ефіри (38,41%): міристинова, пальмітинова, стеаринова, лінолева, ліноленова, ейкозанова, етилпальмітат; альдегіди (2,00%): транс-2-гептеналь, транс-2,4-гептадієналь.

При аналізі метилових ефірів жирних кислот (рис. 2, табл. 2) у досліджуваному зразку встановлено, що загальний вміст жирних кислот у хлороформній фракції складає 7,55%.

Ідентифіковано 21 жирну кислоту, серед них 14 насичених і 7 ненасичених. Вміст насичених кислот складає 58,73% від суми жирних кислот. Вміст ненасичених жирних кислот – 41,27%. Домінуючим компонентом є пальмітинова кислота, вміст якої становить 36,88% від суми жирних кислот.

ВИСНОВКИ

Шляхом вичерпної екстракції хлороформом в апараті Сокслета отримано ліпофільну фракцію трави підмаренника несправжнього'якого. Вихід фракції становить 4,03%.

Вміст хлорофілу *a* у фракції становить 1,60%, хлорофілу *b* – 0,91%.

Методом хромато-мас-спектрометрії вперше визначено компонентний склад летких сполук хлороформної фракції трави підмаренника несправжнього'якого. Виявлено 33 сполуки, серед них ідентифіковано 24, зокрема терпеноїди (19,71% від суми летких сполук), вуглеводні (22,15%), вищі жирні кислоти та їх ефіри (38,41%), альдегіди (2,00%).

У результаті дослідження метилових ефірів жирних кислот виявлено, що до складу ліпофільної фракції входить 21 жирна кислота, серед них 14 насичених і 7 ненасичених. Вміст насичених кислот складає 58,73% від суми жирних кислот. Вміст ненасичених жирних кислот – 41,27%. Домінуючим компонентом є пальмітинова кислота, вміст якої становить 36,88% від суми жирних кислот.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ільїна Т.В. Дослідження елементного складу коренів та надземної частини підмаренника несправжнього'якого / Ільїна



- Т.В.* // IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес «Ліки та життя». Зб. наук. стат. – Київ, 2007. – С. 96–97.
2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Scrophulariaceae-Plantaginaceae. – Л.: Наука, 1990. – 326 с.
 3. *Туманов В.Н.* Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза / *Туманов В.Н., Чурук С.Л.* – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.
 4. Флора УССР. – Київ: АН УРСР, 1961, т.10
 5. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea L.*, содер­жащие
фрагранол / *Черногород Л.Б., Виноградов Б.А.* // Растительные ресурсы. – СПб., 2006. – Т. 42. – Вып. 2. – С. 61–68.
 6. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification / *Carrapiso A. I, Garcia C.* // *Lipids*. – 2000. – №35 (11). – P. 1167–1177.
 7. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities / *Bicchi C., Brunelli C., Cordero C., Rubiolo P. and others* // *J. Chromatogr. A*. – 2004. – V. 1024, №1–2. – P. 195–207.

Відомості про авторів:

Лещенко О.Ю., студентка 4 курсу, відділення ССО НФаУ.

Горяча О.В., аспірант каф. фармакогнозії НФаУ.

Ільїна Т.В., доцент каф. фармакогнозії НФаУ.

Ковальова А.М., д. фарм. н., професор каф. фармакогнозії НФаУ.

Адреса для листування:

Горяча Ольга Володимирівна, м. Харків, пр. Фрунзе, 11, кв. 27

Тел.: (0572) 67 92 08.

E-mail: helga_gnosy@mail.ru

Поступила в редакцію 27.03.2012 г.