

ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА МІКРОБІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ ХЛОРОФОРМНОГО ЕКСТРАКТУ БРУНЬОК ТОПОЛІ ІТАЛІЙСЬКОЇ

Наведено результати дослідження хімічного складу та мікробіологічної активності хлороформного екстракту, отриманого з вегетативних бруньок тополі італійської (*Populus nigra* var. *italica* Du Roi). Вміст ліпофільних речовин, що екстрагуються хлороформом, у бруньках становив $(28,74 \pm 1,22)$ %. Методом хромато-мас-спектрометрії встановлено вміст 66 сполук $(48\,711$ мг/кг), ідентифіковано 43 сполуки $(42\,197$ мг/кг). Домінуючими за вмістом є 1,8-цинеол $(1283$ мг/кг), гвайол $(1782$ мг/кг), β -каріофілен $(1151$ мг/кг), оксикорична кислота $(1670$ мг/кг), *p*-метоксикорична кислота $(4988$ мг/кг), 3-окси-*p*-метоксикорична кислота $(7506$ мг/кг), піностробін халкон $(5651$ мг/кг), дигідрохризин $(1069$ мг/кг), тектохризин $(1267$ мг/кг), хризин $(958$ мг/кг). Ідентифіковано 20 жирних кислот загальним вмістом $26\,963$ мг/кг, серед яких домінують ліолева $(10\,240$ мг/кг), α -ліноленова $(3952$ мг/кг), пальмітинова $(4946$ мг/кг). Вміст фенолпропаноїдів у перерахунку на піностробін становив $(33,94 \pm 1,04)$ %. Вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β -каротин – $226,81$ мг%, хлорофілів у перерахунку на хлорофіл В – $87,25$ мг%. Екстракт проявляє виражену антимікробну активність щодо *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis* і не активний відносно грамнегативної флори та грибів роду *Candida*.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: родина Вербові, тополя італійська, бруньки, хлороформний екстракт, терпеноїди, жирні кислоти, хлорофіл, каротиноїди, флавоноїди, мікробіологічна активність.

ВСТУП. Рослини роду Тополя (*Populus* L.) родини Вербові (*Salicaceae*) є цінним джерелом біологічно активних речовин і дедалі більше привертають увагу фітохіміків усього світу як перспективні джерела лікарської рослинної сировини.

За літературними даними, бруньки тополь містять фенолкарбоніві й ароматичні кислоти, флавоноїди, дубильні речовини, ефірну олію, завдяки чому екстракти проявляють широкий спектр фармакологічної активності й застосовуються, головним чином, як антимікробний та протизапальний засіб. У народній офіційній медицині часто зустрічаються рецепти, в яких рекомендують використовувати саме олійні екстракти, мазі на основі тваринного жиру з бруньок або відвари на молоці [1, 2, 7].

Тополя італійська (*Populus nigra* var. *italica* Du Roi) є декоративною формою тополі чорної або осокоу. Рослина широко культивується в Україні, й завдяки швидкому росту, стійкості до хвороб, морозостійкості її можна вирощувати для потреб фармацевтичної промисловості.

© А. М. Рудник, 2016.

Метою роботи було вивчити склад і вміст біологічно активних речовин хлороформного екстракту бруньок тополі італійської і дослідити його мікробіологічну активність для оцінки можливості створення на його основі нових лікарських засобів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Бруньки для досліджень заготовляли у квітні 2014 р. з дерев, що ростуть на території ботанічного саду Харківського національного університету ім. В. Н. Каразіна. Сировину сушили повітряно-тіньовим способом протягом тижня. Для аналізу використовували виключно вегетативні бруньки.

Ліпофільний екстракт одержували шляхом вичерпної екстракції сировини хлороформом в апараті Сокслета. Отримані хлороформні екстракти випарювали до видалення екстрагенту, і гравіметрично визначали відсотковий вміст ліпофільних речовин у бруньках.

Вміст суми каротиноїдів та суми хлорофілів у ліпофільному екстракті визначали спектрофотометрично за методикою [4].

За літературними даними [3, 5], в УФ-спектрах спиртових витяжок із бруньок різних видів тополь спостерігають максимум поглинання при довжині хвилі близько 290 нм, що відповідає присутності у зразках піностробіну. Однак у тій же ділянці УФ-спектра перебуває один із максимумів поглинання гідроксикоричних кислот, зокрема ферулової (291, 323 нм) і кофейної (299, 326 нм), які наявні у бруньках тополі чорної. Саме тому ми вважали за доцільне для оцінки вмісту флавоноїдів використати методику, розроблену для визначення вмісту суми флавоноїдів і гідроксикоричних кислот у прополісі, яка наведена [6].

Компонентний склад летких сполук та жирних кислот досліджували на хроматографі Agilent Technologies 6890N із мас-спектрометричним детектором 5973N за методиками [8, 11]. Сполуки ідентифікували шляхом порівняння отриманих мас-спектрів з даними бібліотеки мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 із використанням програм для ідентифікації AMDIS та NIST.

Мікробіологічну активність ліпофільного екстракту досліджували на базі лабораторії біохімії мікроорганізмів і поживних середовищ Інституту мікробіології і імунології ім. І. І. Мечникова за методикою [9]. Для оцінки активності препаратів використовували тест-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 26923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885/653.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. У результаті аналізу вихід хлороформного екстракту з бруньок тополі італійської становив $(28,74 \pm 1,22)$ %.

Отриманий ліпофільний екстракт являє собою густу, мазеподібну масу за кімнатної температури, яка на холоді твердне. При відгонці екстрагенту з екстракту почали викристалізовуватись жовті сфероподібні друзи кристалів (на нашу думку, флавоноїди). Одержаний екстракт жовто-коричневого кольору зі специфічним характерним бальзамічним запахом. Екстракт не розчиняється у воді, добре розчиняється в 96 % етанолі, хлороформі, гексані, ДМСО, рослинних оліях.

Після отримання спектрів поглинання хлороформних розчинів досліджуваної фракції розраховано вміст суми хлорофілів та суми каротиноїдів, який становив 87,25 і 226,81 мг% відповідно.

При хромато-мас-спектрометричному аналізі в хлороформному екстракті було ідентифіковано 43 сполуки загальним вмістом 42197 мг/кг, або 4,22 %, у перерахунку на суху сировину. Не вдалось ідентифікувати 23 сполуки, вміст яких

становив 6514 мг/кг. Склад і вміст ідентифікованих сполук наведено в таблиці 1.

В екстракті було ідентифіковано 13 сполук терпенової природи: 5 моно- і 6 сесквітерпенів. Вміст монотерпеноїдів становив 3,8 % серед усіх компонентів, а 2,63 % припало на частку 1,8-цинеолу. В бруньках він склав 0,016 %, в екстракті – 0,13 %. За даними попередніх досліджень [8], у бруньках домінуючими леткими компонентами є булнезол, гвайол та ізомери евдесмолу – 0,31, 0,26 і 0,13 % у перерахунку на суху сировину. Щодо екстракту, то булнезол не був у ньому ідентифікований, вміст гвайолу становив 0,18 %. Із трьох ізомерів евдесмолу до ліпофільного екстракту потрапив лише β-евдесмол у кількості 0,094 %.

Основну кількість серед ідентифікованих сполук склали фенольні сполуки – 14. В екстракті було ідентифіковано 5 похідних коричної кислоти, загальний вміст яких становив 14 778 мг/кг, або 1,4 %, у перерахунку на екстракт. У найбільшій кількості в екстракті містилися *n*-метоксикорична (11,60 %) і 3-окси-*n*-метоксикорична (15,41 %) кислоти. Усі вони є основними компонентами природних бальзамів.

Значну частину серед ідентифікованих компонентів становили і флавоноїди. Їх ідентифіковано 4 загальним вмістом 8945 мг/кг, або 0,89 %, у перерахунку на екстракт. У найбільшій кількості, значно переважаючи, містився халкон піностробіну – 11,60 % відносно всіх ідентифікованих компонентів і 0,57 % у перерахунку на екстракт. Вміст флавонів хризину і тектохризину становив, відповідно, 0,09 та 0,13 % у перерахунку на екстракт, флаванону піноцембрину – 0,11 %.

Отримані дані корелюють з даними російських учених, які досліджували етилацетатні фракції бруньок тополі бальзамічної. Вони встановили, що в одержаному етилацетатному екстракті містяться: 2',6'-дигідрокси-4'-метоксихалкон (піносібін халкон) – 0,74 %, 3,4-дигідро-2',6'-дигідрокси-4'-метоксихалкон – 0,65 %, пінобаксин – 0,53 %, хризин – 0,21 %, піностробін – 0,17 %, піноцембрин – 0,15 % і галангин – 0,05 % від а.с.с. Також виявлено коричневі кислоти та їх похідні (0,56 % від а.с.с.). [6, 11].

Вміст фенілпропаноїдів у перерахунку на піностробін у хлороформному екстракті становив $(33,94 \pm 1,04)$ %.

Отримані дані корелюють з даними [10], за якими вміст фенілпропаноїдів у бруньках тополі чорної, що росте на території Куйбишевського ботанічного саду, становив 24,41 %.

У хлороформному екстракті було ідентифіковано 20 жирних кислот загальним вмістом 26 963 мг/кг (табл. 2). На 62 % вони представлені

Таблиця 1 – Склад та вміст ідентифікованих летких сполук хлороформного екстракту бруньок тополі італійської

№ з/п	Час утримання	Назва сполуки	Вміст, мг/кг	Вміст, %
<i>Монотерпеноїди: ациклічні</i>				
1	9,3	мірцен	57	0,12
2	13,22	ліналоол	115	0,24
<i>Монотерпеноїди: моноциклічні</i>				
3	10,88	1,8-цинеол	1283	2,63
4	16,19	терпінен-4-ол	168	0,34
5	16,73	α-терпінеол	254	0,52
<i>Сесквітерпеноїди: моноциклічні</i>				
6	23,86	α-куркумен	225	0,46
<i>Сесквітерпеноїди: біциклічні</i>				
7	22,78	β-каріофілен	1151	2,36
8	23,01	α-гвайєн	195	0,40
9	25,98	гвайол	1782	3,66
10	24,47	δ-кадінен	171	0,35
11	24,12	β-селінен	142	0,29
12	24,23	α-селінен	248	0,51
13	26,98	β-евдесмол	935	1,91
<i>Ароматичні сполуки</i>				
14	11,07	бензиловий спирт	116	0,34
15	13,85	β-фенілетилловий спирт	558	1,15
16	15,17	4-метоксиетилбензол	104	0,21
17	17,62	4-вінілфенол	383	0,79
18	20,66	2-метокси-4-вінілфенол	134	0,28
19	21,47	оксикорична кислота	1670	3,42
20	27,15	метил <i>n</i> -метоксициннамат	194	0,40
21	28,26	<i>n</i> -метоксиорична кислота	4988	10,23
22	30,95	3-окси- <i>n</i> -метоксиорична кислота	7506	15,41
23	33,02	<i>n</i> -оксикорична кислота	420	0,86
<i>Флавоноїди</i>				
24	36,35	піностробін халкон (3,4-дигідро-2',6'-дигідрокси-4'-метоксихалкон)	5651	11,60
25	37,24	дигідрохризин (піноцембрин)	1069	2,19
26	38,26	тектохризин (7-метокси-5-оксифлавонол)	1267	2,60
27	39,22	хризин (5,7-діоксифлавонол)	958	1,97
<i>Вуглеводні</i>				
28	31,11	пальмітинова кислота	519	1,07
29	33,11	лінолева кислота	124	0,25
30	31,47	гептадеканон-2	164	0,34
31	32,69	нонадеканон-2	505	1,04
32	33,86	ейкозанон-2	155	0,32
33	34,88	трикозан	1079	2,22
34	34,98	хенейкозанон-2	180	0,37
35	36,97	пентакозан	1908	3,92
36	37,93	гексакозан	399	0,82
37	38,92	гептакозан	3391	6,96
38	39,79	октакозан	117	0,24
39	40,68	нонакозан	601	1,23
40	41,62	триаконтан	226	0,46
41	42,33	унтріаконтан	121	0,25
<i>Інші сполуки</i>				
42	3,14	3-ізоаміленовий спирт	221	0,45
43	6,17	ізовалеріанова кислота	743	1,52
Усього			48711	100

ненасиченими кислотами (олеїнова, лінолева, ліноленова). Таким чином, можна констатувати, що в екстракті міститься 19 % ненасичених жирних кислот. Більшість ідентифікованих кислот є насиченими, проте вони містяться в мінорній кількості.

Таблиця 2 – Жирні кислоти хлороформного екстракту бруньок тополі італійської

№ з/п	Час утримання	Назва сполуки	Вміст, мг/кг	Вміст, %
<i>Насичені кислоти</i>				
1	21,93	міристинова (тетрадеканова)	210	0,71
2	23,88	пентадеканова	116	0,39
3	24,87	14-метилпентадеканова	179	0,60
4	25,85	пальмітинова (гексадеканова)	4946	16,66
5	26,99	15-метилпальмітинова	301	1,01
6	27,57	маргарінова (гептадеканова)	248	0,84
7	28,50	16-метилгептадеканова	369	1,24
8	29,37	стеаринова (октадеканова)	706	2,38
9	34,19	хенейкозанова	537	1,81
10	34,96	20-метилхенейкозанова	225	0,76
11	35,73	бегенова	1241	4,18
12	37,15	трикозанова	211	0,71
13	38,59	тетракозанова	1744	5,87
14	41,26	гексакозанова	326	1,10
Вміст насичених кислот			11 360	38,26
<i>Ненасичені кислоти</i>				
15	29,67	олеїнова	2868	9,66
16	30,54	лінолева	10 240	34,49
17	31,53	α-ліноленова	3952	13,31
18	32,62	арахінова	794	2,67
19	32,91	1-ейкозенова	429	1,44
20	33,66	11,14-ейкозадієнова	51	0,17
Вміст ненасичених кислот			18 332	61,74
Усього			29 693	100

Аналіз даних визначення мікробіологічної активності екстракту (табл. 3) свідчить про те, що хлороформний екстракт бруньок тополі італійської проявляє виражену антимікробну активність відносно грам-позитивних мікроорганізмів: золотистого стафілокока та синьогнійної палички. Щодо грамнегативної флори та грибів роду *Candida*, то діаметр зони затримки росту був в інтервалі 13–15 мм, що вказує на чутливість мікроорганізмів до екстракту.

ВИСНОВКИ. 1. Досліджено хімічний склад та мікробіологічну активність хлороформного екстракту вегетативних бруньок тополі італійської. Вихід ліпофільного екстракту становить (28,74±1,22) %.

2. Методом хромато-мас-спектрометрії виявлено 66 сполук (48 711 мг/кг), ідентифіковано 43 сполуки (42 197 мг/кг). Основну кількість серед ідентифікованих сполук складають фенольні

сполуки: похідні коричної кислоти (оксикорична кислота (1670 мг/кг), *n*-метоксикорична кислота (4988 мг/кг), 3-окси-*n*-метоксикорична кислота (7506 мг/кг)), 4 флавоноїди (піностроїн халкон (5651 мг/кг)), дигідрохризин (1069 мг/кг), тектохризин (1267 мг/кг), хризин (958 мг/кг)). Домінуючими за вмістом серед 13 терпеноїдів є 1,8-цинеол (1283 мг/кг), гвайол (1782 мг/кг), β-каріофілен (1151 мг/кг).

3. Ідентифіковано 20 жирних кислот загальним вмістом 2663 мг/кг, серед яких домінують лінолева (10 240 мг/кг), α-ліноленова (3952 мг/кг), пальмітинова (4946 мг/кг).

4. Спектрофотометрично в перерахунку на піностроїн визначено вміст суми фенолпропаноїдів в екстракті – (33,94±1,04) %.

5. Вміст суми каротиноїдів у перерахунку на β-каротин становить 226,81 мг%, суми хлорофілів у перерахунку на хлорофіл В – 87,25 мг%.

Таблиця 3 – Результати визначення мікробіологічної активності хлороформного екстракту бруньок тополі італійської

Штам мікроорганізмів	Діаметр зони затримки росту, мм		
	дослід 1	дослід 2	дослід 3
<i>Staphylococcus aureus</i> (Gr +)	25	25	23
<i>Bacillus subtilis</i> (Gr +)	24	24	23
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gr -)	12	13	13
<i>Proteus vulgaris</i> (Gr -)	12	13	12
<i>Escherichia coli</i> (Gr -)	14	15	15
<i>Candida albicans</i>	14	14	15

6. Экстракт проявляє виражену антимікробну активність щодо *Staphylococcus aureus* та *Bacillus subtilis* і не активний відносно грамнегативної флори та грибів роду *Candida*.

7. Отримані дані свідчать про перспективність використання хлороформного екстракту бруньок тополі італійської для створення нових препаратів антибактеріальної, репаративної, протизапальної дії.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Бородіна Н. В. Фармакогносичне дослідження рослин роду тополя : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. фармац. наук / Н. В. Бородіна. – К., 2007. – 20 с.
2. Браславский В. Б. Исследование химического состава некоторых видов тополя (*Populus L.*) : автореф. дис. на соискание учен. степени канд. фармац. наук / В. Б. Браславский. – М., 1994. – 23 с.
3. Браславский В. Б. Исследование электронных спектров флавоноидов тополя и прополиса / В. Б. Браславский, В. А. Куркин // Мед. альм. – 2011. – № 2 (15). – С. 140–144.
4. Дослідження ліпофільних сполук тополі китайської (*Populus Simonii Carr.*) / А. М. Рудник, В. М. Ковальов, Н. В. Бородіна, І. Л. Дикий // Фармаком. – 2008. – № 3. – С. 21–28.
5. Количественное определение суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в почках некоторых видов *Populus L.* / В. Б. Браславский, В. А. Куркин, Г. Г. Запесочная, Н. А. Безрукова // Растительные ресурсы. – 1991. – 27. – С. 130–134.
6. Корулькин Д. Ю. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин. – М. : Гео, 2008. – 232 с.

7. Никитина Н. В. Изучение фармакологического действия мази с экстрактом почек тополя черного / Н. В. Никитина, С. А. Кулешова // Фундаментал. исследование. – 2011. – № 11, ч. 3. – С. 554–558.
8. Рудник А. М. Хромато-масс-спектрометричне дослідження ефірної олії бруньок тополі італійської / А. М. Рудник // Фармац. часоп. – 2015. – № 3. – С. 10–13.
9. Рудник А. М. Дослідження хімічного складу і антибактеріальної активності ефірної олії бруньок *Populus Simonii Carr.* / А. М. Рудник, В. М. Ковальов, Н. В. Бородіна // Фармац. часоп. – 2009. – № 3. – С. 12–16.
10. Флавоноиды почек тополя бальзамического (*populus balsamifera L.*), произрастающего в Красноярске. 1. Флавоноиды этилацетатного экстракта почек тополя бальзамического / Е. В. Исаева, Г. А. Ложкина, Т. В. Рязанова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2008. – № 2. – С. 47–53.
11. Юрченко Н. С. Дослідження складу хлороформної фракції трави маренки запашної / Н. С. Юрченко, Т. В. Ільїна, А. М. Ковальова // Укр. біофармац. журн. – 2012. – № 3 (20). – С. 72–76.

А. М. Рудник

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ, ХАРЬКОВ

ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХЛОРОФОРМНОГО ЭКСТРАКТА ПОЧЕК ТОПОЛЯ ИТАЛЬЯНСКОГО

Резюме

Приведены результаты исследования химического состава и микробиологической активности хлороформного экстракта, полученного из вегетативных почек тополя итальянского (*Populus nigra var. italica Du Roi*). Содержание липофильных веществ, экстрагируемых хлороформом, в почках составило $(28,74 \pm 1,22)$ %. Методом хромато-масс-спектрометрии установлено содержание 66 соединений (48 711 мг/кг), идентифицировано 43 соединения (42 197 мг/кг). Доминирующими по содержанию являются 1,8-цинеол (1283 мг/кг), гвайол (1782 мг/кг), β -кардиофиллен (1151 мг/кг), оксикоричная кислота (1670 мг/кг), *p*-метоксикоричная кислота (4988 мг/кг), 3-окси-*p*-метоксикоричная кислота (7506 мг/кг), пиностробин халкон (5651 мг/кг), дигидрохризин (1069 мг/кг), тектохризин (1267 мг/кг), хризин (958 мг/кг). Идентифицировано 20 жирных кислот общим содержанием 26 963 мг/кг, среди которых доминируют линолевая (10 240 мг/кг), α -линоленовая (3952 мг/кг), пальмитиновая (4946 мг/кг). Содержание фенолпропаноидов в пересчете на пиностробин составило $(33,94 \pm 1,04)$ %. Содержание суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин – 226,81 мг%, хлорофиллов в пересчете на хлорофилл В – 87,25 мг%. Экстракт проявляет

выраженную антимикробную активность по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Bacillus subtilis*, но не активен относительно грамотрицательной флоры и грибов рода *Candida*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: семейство Ивовые, тополь итальянский, почки, хлороформный экстракт, терпеноиды, жирные кислоты, хлорофилл, каротиноиды, флавоноиды, микробиологическая активность.

A. M. Rudnyk
NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

CHEMICAL COMPOSITION AND MICROBIOLOGICAL ACTIVITY OF ITALIAN POPLAR BUDS CHLOROFORM EXTRACT

Summary

The study presents the results of chemical composition and microbiological activity of chloroform extract obtained from vegetative buds of Italian poplar (*Populus nigra* var. *italica* Du Roi). The content of lipophilic substances are extracted by chloroform, in the buds was (28.74±1.22) %. By the method of GC/MS there were found 66 compounds (48.711 mg/kg), identified 43 compounds (42197 mg/kg). Dominating the contents are: 1.8-cineole (1283 mg/kg) gvaol (1782 mg/kg), β-kariofilen (1151 mg/kg), oxycinnamic acid (1670 mg/kg), n-metoxycinnamic acid (4988 mg/kg), 3-hydroxy-n-metoxycinnamic acid (7506 mg/kg), pinostrobin halkan (5651 mg/kg), dyhydrogrizin (1069 mg/kg), tektogrizin (1267 mg/kg), grizin (958 mg/kg). Ther were identified 20 fatty acid (26963 mg/kg) major of them were: linoleic (10240 mg/kg), α-linolenic (3952 mg/kg), palmitic (4946 mg/kg). Content of fenilpropanoids in terms pinostrobin was (33.94±1.04) %. The content of the amount of carotenoids in terms of β-carotene – 226.81 mg%, in terms of chlorophyll chlorophyll B – 87.25 mg%. The extract shows a strong antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*, and not active against the gram-negative flora and fungi of the genus *Candida*.

KEY WORDS: family willow, Italian poplar, buds, chloroform extract, terpenoids, fatty acids, chlorophyll, carotenoids, flavonoids, microbiological activity.

Отримано 19.04.16

Адреса для листування: А. М. Рудник, Національний фармацевтичний університет, вул. Олександра Невського, 18, Харків, 61140, Україна.