

## Дослідження ліпофільних екстрактів кори та листя верби білої

І.І.Тернинко, В.С.Кисличенко

ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедра фармацевтичної хімії та фармакогнозії,  
Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук  
Луганськ, Харків, Україна

У статті наведені результати дослідження ліпофільних фракцій кори та листя верби білої. Вивчено якісний склад та встановлено кількісний вміст жирних кислот. Встановлено, що в корі верби переважають ненасичені (67,22%), а в листі — насичені (66,68%) кислоти. Визначено кількісний вміст суми хлорофілів (у розрахунку на хлорофіл А) та суми каротиноїдів (у розрахунку на в-каротин). Отримані та вивчені тривимірні спектри поглинання і флуоресценції ліпофільних комплексів досліджуваної сировини.

**Ключові слова:** верба біла, ліпофільні фракції, жирні кислоти, тривимірні спектри, каротиноїди, хлорофіли.

### ВСТУП

У зв'язку зі зростанням попиту на рослинні лікарські засоби постає нагальна потреба в розробці нових фітопрепаратів з використанням представників вітчизняної флори. З огляду на це привертають увагу культурні садово-паркові рослини, що мають достатню сировинну базу. До таких можна віднести рослини роду верба (*Salix*).

З понад 300-350 видів верб, що зростають у світі, в Україні поширені близько 30 видів, з яких 27 — дикорослі і 3 — культивовані. З них в науково-практичній медицині застосовується сировина тільки двох деревоподібних видів, зокрема верба біла — *Salix alba* L. та верба го-стролиста — *Salix acutifolia* Will. [4, 9].

Верба біла — *Salix alba* L. — рослина з родини Вербових (*Salicaceae*) — велике дводомне дерево, 30 м заввишки, з товстою корою

темно-сірого кольору [6, 9]. В офіційній та народній медицині застосовується кора верби в якості антипіретичного, протизапального та аналгетичного засобу [4-6, 9]. У фітохімічному аспекті інтенсивне вивчення представників роду верба проводилось в різних наукових центрах світу з 60-х років минулого сторіччя та продовжується до сих пір. Багаторічна робота фітохіміків дозволила встановити наявність глікозидів саліцилової кислоти, флавоноїдів, зокрема апігеніну, нарінгеніну, лютеоліну та ін. дубильних речовин у сировині верби [4, 6, 13]. Ми також раніше повідомляли [10] про вміст органічних, зокрема гідроксикоричних, кислот у листі верби білої.

Але аналіз літературних джерел [7, 12] свідчить про актуальність вивчення ліпофільних фракцій з рослинної сировини. Адже відомо, що ліпофільні екстракти рослин містять цілий комплекс біологічно активних сполук, зокрема хлорофіли, жирні кислоти, жиророзчинні вітаміни, фітостероли, фенольні сполуки та інші речовини, що проявляють різноманітну біологічну активність [1, 11]. Але відомості щодо вивчення ліпофільних комплексів сировини верби в літературі відсутні.

Метою дослідження було вивчити якісний склад та кількісний вміст ліпофільних речовин, зокрема жирних кислот, каротиноїдів та хлорофілу в корі та листі верби білої.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами наших досліджень була кора верби білої, заготовлена в 2010-2011 рр. на території Луганської області, яку збирали пас час сокоруху рослини в березні та сушили в затінку та листя верби, заготовлене в 2010 р. на території Луганської області влітку та висушене в затінку на відкритому повітрі. Сировину подрібнювали до розміру часток 1-3 мм й викорис-

товували для отримання хлороформних фракцій за загальновідомою методикою [3]. Потім визначали відсотковий вміст отриманих сумарних комплексів і їх органолептичні показники.

Якісний склад ліпофільних фракцій вивчали методом двомірної хроматографії в 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 реактивами. Локалізацію хлорофілів на хроматограмі визначали за характерним темно-зеленим забарвленням у видимому і по яскраво-червоній флуоресценції 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 п-диметиламінобензальдегіду в суміші етанолу та кислоти хлоридної з наступним нагріванням при

80-90°C протягом 5-7 хв. Плями каротиноїдів забарвлювалися в рожево-фіолетовий колір. Флавоноїдні аглікони ідентифікували по жовтій флуоресценції плям в УФ-світлі й по коричневому забарвленню 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, який був оброблений 10% діетиленглікольсукцинатом (DEGS). На хроматографі встановлювали такі параметри: температура термостата колонок – 180°C, температура випарника – 230°C, температура детектора – 220°C, швидкість потоку газу-носія (азоту) – 30 см<sup>3</sup>/хв.; об'єм проби – 2 мм<sup>3</sup> розчину метилових ефірів кислот у гексані.

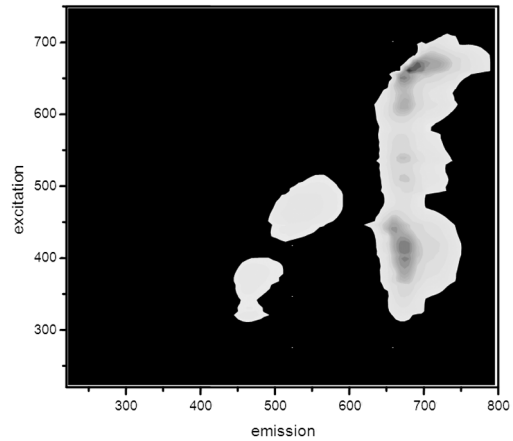
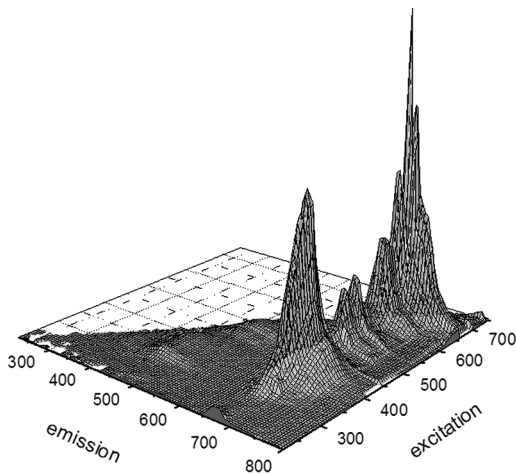
Ідентифікацію метилових етерів жирних кислот здійснювали за часом утримання піків

ТАБЛИЦЯ 1

## Вміст жирних кислот у корі та листі верби білої

Жирні кислоти	Вміст жирних кислот, % до суми	
	Об'єкти дослідження	
	Кора верби	Листя верби
C 12:0 лауринова (додеканова)	0.36	2.42
C 14:0 міристинова (тетрадеканова)	0.81	1.25
C 14:1 міристолеїнова	-	0.83
*	0.47	-
*	-	0.30
C 16:0 пальмітинова (гексадеканова)	19.75	23.08
C 16:1 пальмітинолеїнова (гексадеценава)	1.23	-
*	0.42	1.94
*	0.42	0.03
C18:0 стеаринова (октадеканова)	2.27	1.71
C 18:1 олеїнова (октадеценава)	14.31	4.54
*	-	4.82
C 18:2 лінолева (октадекадиєнова)	30.96	17.87
C 18:3 ліноленова (октадекатриєнова)	0.40	0.16
C 20:0 арахінова (ейкозанова)	7.89	31.10
C 20:1 гондоїнова (ейкозенова)	0.10	0.02
C 20:1 ейкозенова-ізомер	18.04	6.55
C 22:0 бегенова (докозанова)	0.60	0.70
*	1.97	2.68
Вміст суми насичених жирних кислот серед ідентифікованих	32,78	66,68
Вміст суми ненасичених жирних кислот серед ідентифікованих	67,22	33,32

Примітка: \* – неідентифіковані компоненти.



(а) (б)  
Рис. 1. Тривимірний спектр флуоресценції (а) та його логарифмічна проекція на площину (б) ліпофільної фракції з кори верби.  
(а) (б)

у порівнянні зі стандартною сумішшю. Розрахунок складу метилових етерів проводили методом внутрішньої нормалізації. Як стандарти використовували зразки насичених та ненасичених метилових етерів жирних кислот фірми «Sigma».

Метиліві 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 [8].

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

Для більш детального вивчення ліпофільних сполук досліджуваних рослин ми отримали тривимірні спектри флуоресценції

методом тривимірної скануючої спектрофлуориметрії (3DF-спектроскопії), який є багатифакторним методом для якісного аналізу сумішей, що вміщують флуоресціюючі компоненти. 3DF-спектри, що мають вигляд поверхні, яка характеризується функцією  $I=f(\lambda_{exc}, \lambda_{em})$ , реєстрували в ультрафіолетовому та видимому діапазонах спектра за допомогою спектрофлуориметра Hitachi F4010. Вимірювання проводили в інтервалі довшин хвиль збудження (лехс) — 220-750 нм та довжин хвиль флуоресценції (лем) 220-800 нм (крок сканування — 10 нм; щільності — 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 [2].

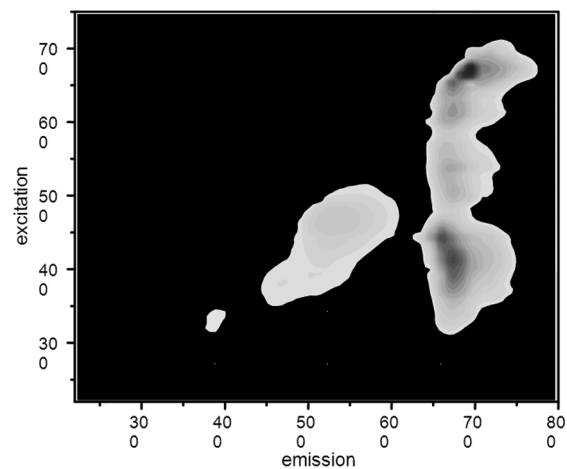
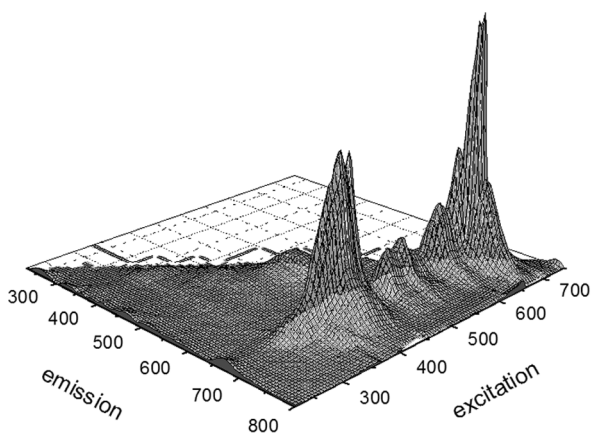


Рис. 2. Тривимірний спектр флуоресценції (а) та його логарифмічна проекція на площину (б) ліпофільної фракції з листя верби.

## РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вихід ліпофільних комплексів склав 5,27% та 7,68% з кори та листя верби відповідно. Ліпофільні фракції являють собою тверді маси темно-зеленого кольору, з приємним запахом, легко розчинні у хлороформі, гексані, ефірі та малорозчинні в спирті і нерозчинні у воді. У результаті хроматографічного аналізу в ліпофільних фракціях об'єктів дослідження було ідентифіковано хлорофіли, каротиноїди, флавоноїдні аглікони та кумарини.

У результаті проведеного газохроматографічного аналізу встановлена наявність 16 жирних кислот у корі та 17 жирних кислот у листі верби, з яких ідентифіковано 13 та 15 кислот відповідно (сума ідентифікованих жирних кислот складає 96,76% та 90,23% відповідно). Результати дослідження наведені в табл. 1.

Як видно з табл. 1, серед ідентифікованих сполук у корі верби кількісно переважає лінолева кислота (30,96%), а в листі — арахінова кислота (31,10%), що є незамінними. До того ж для кори верби характерний значний вміст ізомеру ейкозенової кислоти (18,04%), а для листя — пальмітинової (23,08%). Кора верби відрізняється більшим відсотковим вмістом ненасичених жирних кислот (67,22%), що дуже важливо у фармакологічному аспекті.

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

Для ліпофільної фракції з кори верби в області збудження (лехс) 300-390 нм та емісії (лем) 450-500 нм спостерігалася серія піків, яка притаманна флавоноловим агліконам. В області лехс 440-520 нм та лем 510-580 нм відзначали пік низької інтенсивності, що характерний жовтогарячому пігменту. Численні піки в області лехс 320-450, 460-580, 610-700 нм та лем 650-770 нм — діапазон флуоресценції суміші хлорофілів а і b.

У спектрі ліпофільного екстракту з листя верби пік в області збудження (лехс) 320-340 нм та випромінення (лем) 380-400 нм відповідає простим поліфенолам, а серія піків в області лехс 350-420 нм та лем 450-490 нм — агліконам флавонолів. В області лехс 460-500 нм та лем 510-580 нм відзначали пік, що характерний жовтогарячому пігменту. Також у ділянці лехс 320-450, 460-580, 610-700 нм та лем 650-750 нм спостерігали піки, відповідають суміші хлорофілу.

Також результати проведених досліджень свідчать про значний вміст рослинних пігментів. Так, вміст каротиноїдів у корі та листі верби складає 31,11 мг/г та 187,57 мг/г відповідно, а вміст хлорофілу — 45,65 мг/г та 290,79 мг/г.

## ВИСНОВКИ

1. Отримано ліпофільні фракції із сировини верби білої. Методом тонкошарової хроматографії вивчено їх якісний склад.

2. Методом газової хроматографії вивчено жирнокислотний склад досліджуваної сировини. У корі верби серед ідентифікованих компонентів переважають ненасичені (67,22%), а в листі — насичені (66,68%) кислоти.

3. Методом тривимірної флуоресцентної спектроскопії вивчено якісний склад отриманих ліпофільних екстрактів. Встановлено наявність простих поліфенолів, агліконів флавонолів, хлорофілу та жовтогарячого пігменту.

4. Методом УФ-спектрофотометрії визначено вміст рослинних пігментів — каротиноїдів та хлорофілу та встановлено їх значний вміст у листі верби.

5. Проведені дослідження можуть бути використані при розробці методів контролю якості на кору та листя верби та при створенні нових фітозасобів різної спрямованості дії.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов / Г.Бриттон. — М.: Мир, 1986. — 422 с.
2. Визначення видового походження рослинних олій / В.А.Параніч [та ін.] // Фармац. журнал. — 2000. — №5. — С. 86-90.
3. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
4. Ива белая — *Salix alba* L. Аналитический обзор / Б.М.Зузук [и др.] // Провізор. — 2005. — №6. — С. 27-29.
5. Коптина А.В. Использование коры *Salix acutifolia* для получения салицилатов / А.В.Коптина, А.И.Шургин, А.В.Канарский // Растит. ресурсы. — 2010. — Вып.1. — С. 67-71.
6. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М.Гродзинський. — К.: «Українська Енциклопедія» ім. М.П.Бажана, Український виробничо-комерційний центр «Олімп», 1992. — 544 с.
7. Липиды и липофильные компоненты некоторых растений / В.С.Кисличенко [и др.] // Химия природных соединений. — 2006. — №2 — С. 182-183.
8. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований / М.И.Прохорова. — Л.: Химия, 1982. — 272 с.
9. Скворцов А.К. Ивы СССР / А.К. Скворцов. — М.: Наука, 1968. — 264 с.

10. Тернинко І.І. Кількісне визначення органічних кислот в листі рослин роду *Salix* (L.) / І.І.Тернинко, В.С.Кисличенко, Г.О.Мищук // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупика. — 2010. — Вип.19. — Книга 3. — С. 671-674.
11. Химия жиров / Б.Н.Тютюнников [и др.]. — М.: Колос, 1992. — 448 с.
12. Челін Н.В. Жирнокислотний склад любистку лікарського (*Levisticum officinale*) / Н.В.Челін, С.М.Марчишин // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2011. — Т.6, №1. — С. 33-36.
13. Chromatographic analysis of simple phenols in some species from the genus *Salix* / L.Poblocká-Olech [et al.] // *Phytochemical Analysis*. — 2010. — Vol. 21 (5). — P. 463-469.

**И.И.Тернинко, В.С.Кисличенко. Исследование липофильных экстрактов коры и листьев ивы белой. Луганск, Харьков, Украина.**

**Ключевые слова:** ива белая, липофильные фракции, жирные кислоты, трехмерные спектры, каротиноиды, хлорофиллы.

В статье представлены результаты исследования липофильных фракций коры и листьев ивы белой. Изучен качественный состав и установлено количественное содержание жирных кислот. Установлено, что в коре ивы преобладают ненасыщенные (67,22%), а в листьях — насыщенные (66,68%) кислоты. Определено количественное содержание суммы хлорофиллов (в перерасчете на хлорофилл А) и суммы каротиноидов (в перерасчете на в-каротин). Получены и изучены трехмерные спектры флуоресценции липофильных комплексов исследуемого сырья.

**I.I.Terninko, V.S.Kyslychenko. Research of lipophylic extracts of a bark and leaves of a willow white. Lugansk, Kharkiv, Ukraine.**

**Key words:** the Willow white, lipophylic fractions, fat acids, three-dimensional spectrums, carotinoids, chlorophyll.

At article results of research of lipophylic fractions of a bark and leaves of a willow white are presented. The qualitative structure is studied and the quantitative maintenance of fat acids is established. It is established that in bark of a willow white prevail nonsaturated (67,22%), and in a leaves — sated (66,68%) acids. The quantitative maintenance of the sum of a chlorophyll (in recalculation on a chlorophyll A) and the sums of carotinoids (in recalculation on v-carotin) is defined. Three-dimensional spectrums of fluorescence of lipophylic complexes of investigated raw materials are received and studied.

Надійшла до редакції 23.03.2011 р.