

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ ТА ФАРМАЦІЯ

А. С. Кривавич, Р. О. Петріна, С. А. Суберляк,
О. П. Прохера, О. М. Федоришин

Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук,
фармації та біотехнології

ОДЕРЖАННЯ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ЕКСТРАКТІВ КАЛУСНОЇ БІОМАСИ *CALENDULA OFFICINALIS*

© Кривавич А. С., Петріна Р. О., Суберляк С. А., Прохера О. П., Федоришин О. М., 2018

Одержано калусну біомасу *Calendula officinalis* в умовах *in vitro* біотехнологічним методом. Наведено результати хромато-мас-спектрометричного аналізу хлороформних екстрактів насіння рослини (ідентифіковано 5 сполук) та калусної біомаси (ідентифіковано 11 сполук) на вміст біологічно активних речовин (БАР). Проведено біологічний скринінг БАР калусної біомаси. Одержана калусна біомаса та біологічно активний хлороформний екстракт на її основі є альтернативним джерелом сировини *Calendula officinalis* для фармацевтичної та косметичної промисловості.

Ключові слова: калусна біомаса, хромато-мас-спектрометрія, фітохімічний склад, *Calendula officinalis*, косметичні препарати, біологічний скринінг.

A. S. Krvavych, R. O. Petrina, S. A. Suberlyak, O. P. Prochera, O. M. Fedoryshyn

OBTAINING AND INVESTIGATION EXTRACTS OF CALLUS BIOMASS OF *CALENDULA OFFICINALIS*

© Krvavych A. S., Petrina R. O., Suberlyak S. A., Prochera O. P., Fedoryshyn O. M., 2018

The callus biomass of *Calendula officinalis* was obtained *in vitro* by using the biotechnological method. The results of the chromatography-mass-spectrometry analysis for the content of biologically active substances (BAS), obtained from plant chloroform extracts: from seeds (identified 5 compounds) and callus biomass (identified 11 compounds) are shown. Biological screening of BAS from callus biomass was conducted. The production of callus biomass and biologically active chloroform extract which is obtained on its basis are an alternative sources of *Calendula officinalis* raw materials, which are used for the pharmaceutical and cosmetic industry.

Key words: callus biomass, chromato-mass-spectrometry, phytochemical composition, *Calendula officinalis*, cosmetic products, biological screening.

Постановка проблеми. Зараз у Європі та світі надзвичайно актуальним є використання натуральних джерел для створення лікувальних та косметичних препаратів, враховуючи їх безпечність, нешкідливість, ефективність та низьку токсичність. Рослинна сировина є перспективним об'єктом дослідження, оскільки містить біологічно активні речовини (БАР) з різними фармакологічними властивостями, деякі з яких не можна отримати хімічним синтезом. БАР діють полівалентно та стимулюють різні системи організму. Отримання нових лікарських та косметичних препаратів на основі рослинної сировини сьогодні є актуальним та дає змогу розширити номенклатуру вітчизняних засобів.

Сучасні проблеми використання лікарських рослин пов'язані з обмеженим ресурсним потенціалом багатьох цінних видів, з проростанням на екологічно забруднених територіях, з використанням рослин, які є на межі знищення або занесені у Червону книгу. Тому актуальними є альтернативні біотехнологічні методи одержання біомаси рослин (тканинні культури, гідропонічні системи, генетично модифіковані організми, культури мікроводоростей) [1]. Використовуючи метод одержання біомаси рослин в умовах *in vitro* у контрольованих умовах на штучних живильних середовищах, можна одержувати рослинну біомасу у необмеженій кількості, незважаючи на кліматичні умови, особливості ґрунту та пору року. Одержана калусна біомаса є екологічно чистою, не забрудненою хімічними добривами, пестицидами, гербіцидами, важкими металами, радіоактивними ізотопами тощо. Біотехнологічний метод одержання біомаси рослин використовують у багатьох лабораторіях України та країнах світу, а також у промисловості, враховуючи екологічну чистоту біомаси та її високі споживчі властивості.

Calendula officinalis L. (Календула лікарська) – це рослина родини Айстрових або Складноцвітих (*Asteraceae*). Рід *Calendula* містить близько 20 видів трав і напівчагарників, які ростуть у дикому вигляді в країнах Середземномор'я. Календула лікарська – це декоративна і лікарська рослина, яку використовують в медицині Європи, Китаю, Індії. Екстракти цієї рослини, а також чисті сполуки, виділені з неї, мають стійку фармакологічну активність: протизапальну, антибактеріальну, імуностимулювальну, антиоксидантну, цитотоксичну, гепатопротекторну та інші [2]. Культивування *Calendula officinalis* L. в *in vitro* відкриває перспективу одержання біомаси рослини протягом року, що зручно як для експериментальних досліджень, так і для розроблення фармацевтичного чи косметичного засобу.

Метою роботи було одержання калусної біомаси *Calendula officinalis* біотехнологічним альтернативним методом культури клітин та тканин, дослідження компонентного складу хлороформних екстрактів насіння дикорослого виду та калусної біомаси *Calendula officinalis* та порівняння їх якісного та кількісного складу з метою комплексного використання цієї рослини.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. Аналіз літературних джерел свідчить про наявність рослин родини *Asteraceae* значної кількості біологічно активних речовин: жирних кислот, фосфоліпідів, вітамінів тощо. Ці речовини мають ранозагоювальні, протизапальні, антисептичні та інші властивості [2]. Однією з рослин цієї родини, яка володіє протизапальними та антибактеріальними властивостями, є *Calendula officinalis* L., екстракти якої мають лікувальні властивості для чутливої або запаленої шкіри. Зустрічаються відомості про використання олії з насіння календули при лікуванні виразки шлунка, шкірних ран, лихоманки та раку. Відомо, що нанесення олії насіння календули на поверхню рани прискорює терміни загоєння, епітелізацію, тобто вона володіє репаративною активністю. Також рослину використовують у гомеопатичних препаратах для лікування багатьох захворювань [3]. Екстракт з листя *C. officinalis* був ефективним проти лейкемії, раку кишечника, меланоми, раку нирок, раку молочної залози, раку яєчників та проти лімфоцитів периферичної крові людини – природних кіллерів людини, переважно В-лімфоцитів [4]. Аналіз доступних літературних джерел свідчить про наявність у рослині багатьох класів БАР.

Препарати календули, які доступні в продажу, це рідкий екстракт календули (*Calendula extractum fluidum*) та настоянка календули (*Calendula tinctura*). Препарати квіток календули містять флавоноїди, тритерпенові спирти, тритерпенові сапоніни, каротиноїди, полісахариди та ефірну олію. Європейська медичне агентство (European Medicines Agency) класифікує препарати з квіток календули як традиційну фітотерапію і пропонує використовувати при запальних процесах у ротовій порожнині та горлі, ранах з поганою лікувальною тенденцією, а також при легких запаленнях шкіри та незначних ранах. Олію календули (олійний екстракт з квітів календули) традиційно використовують як препарат легкої дії, який підтримує функцію шкіри. Також на ринку є багато космецевтичних та косметичних препаратів, які містять екстракти календули – креми, шампуні, гелі до миття, помади тощо.

У літературі описано введення *Calendula officinalis* L. в культуру [5,6] з метою дослідження впливу регуляторів росту на калусогенез *in vitro*. Тотипотентність, яка притаманна рослинам, дає змогу з кожної клітини чи тканини отримати повноцінну рослину, а отже отримана *in vitro* біомаса містить усі БАР, незалежно від локації їх в материнській рослині. Підбираючи такі умови культивування, як температура, освітлення, вологість, склад поживних речовин та регуляторів росту в середовищі, можна контролювати вміст та концентрацію БАР калусної біомаси.

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Об'єктом наших досліджень було насіння календули лікарської (*Calendula officinalis* L.) (Рис. 1) з родини айстрових (*Asteraceae*) – однорічної трав'янистої рослини, зібране в Львівській області. Частину насіння було введено в культуру *in vitro*, використовуючи метод культури клітин та тканин. Насіння стратифіковано у розчині 0,01 г/л гіберелової кислоти (Рис. 2 А), простерилізовано 96 % етанолом та 30 % розчином H_2O_2 . Ефективність стратифікації становила 50 %, ефективність стерилізації – 90 %. Усі експерименти проведено в 3-х повторах та результати опрацьовано статистично. Чотири-тижневі саджанці, пророслі в середовищі Мурасиге-Скуга (МС) *in vitro* (рис. 2, б), використано як джерело експлантів (листові, стеблові та кореневі експланти) (рис. 3) для ініціювання культур у середовищі МС із регуляторами росту – 2,4-дихлорфеноксиоцтова кислота і кінетин (2,0 і 0,2 мг/л відповідно). Культури підтримували в ламінарному боксі під люмінесцентними лампами з освітленням 2000 лк, добовим фотоперіодом 16 год при 25 ± 2 °C. Через 50 діб отримано калусну біомасу *Calendula officinalis* у кількості 40 г (рис. 4).



Рис. 1. Насіння *Calendula officinalis* L



а



б

Рис. 2. Стратифікація насіння *Calendula officinalis* L. (а) та проросле насіння на 14 добу (б)



а



б



в

Рис. 3. Експланти *Calendula officinalis* L.: листові (а), стеблові (б) та кореневі (в)

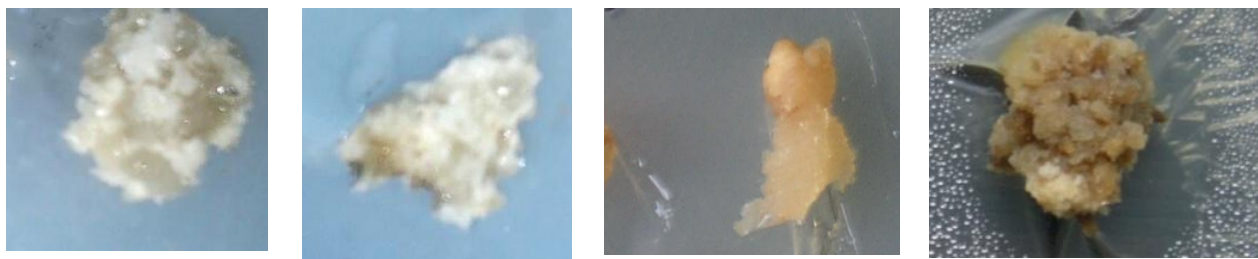


Рис. 4. Калусна біомаса *Calendula officinalis* L. на 50 добу

Екстракти насіння та біомаси калусу *Calendula officinalis* одержували мацерацією протягом двох днів у 90 % хлороформі. Після цього їх фільтрували та досліджували на наявність БАР з метою порівняння якісного та кількісного складу.

Компонентний склад БАР отриманих екстрактів визначали хромато-мас-спектрометричним методом на хроматографі AgilentTechnology HP6890 GC з мас-спектрометричним детектором 5973N. Компоненти розділяли на кварцовій капілярній колонці фірми HP довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,32 мм, товщина шару 0,25 мкм. Газ-носіє – гелій. Швидкість руху газу-носія 2,0 мл/хв. Температура детектора та випарювача 280°C. Ідентифікували речовини порівнянням отриманих мас-спектрів хроматографічного піка з мас-спектром еталонних речовин, з найбільш вірогідно ідентифікованими програмою розпізнання з масиву спектрів бази даних бібліотеки NIST 11.L. Хроматограму екстрактів наведено на рис. 5.

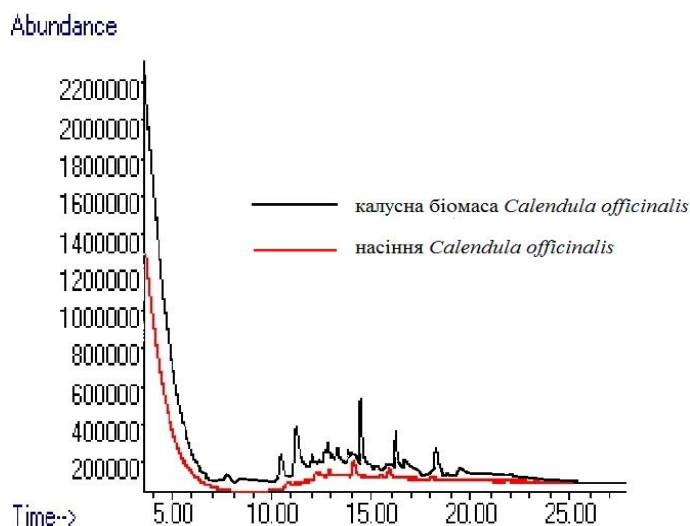


Рис.5. Хроматограми екстрактів насіння та калусної біомаси *Calendula officinalis*

Серед БАР, що містяться в екстракті насіння *Calendula officinalis*, методом газорідинної хроматографії (ГХ/МС) ідентифіковано 5 сполук, які представлені вуглеводами та жирними кислотами (табл. 1).

На хроматограмі хлороформного екстракту калусної біомаси *Calendula officinalis* ідентифіковано 11 сполук, які представлені вуглеводами, жирними кислотами та фітостеролами (табл. 2).

За результатами дослідження виявлено, що хлороформний екстракт калусної біомаси *Calendula officinalis* містить набагато більше БАР як в якісному, так і в кількісному співвідношенні, ніж хлороформний екстракт насіння рослини. Отже, калусна біомаса рослини є перспективним альтернативним джерелом отримання сировини і може бути запропонована як джерело для швидкого одержання сполук, які представляють інтерес для фармацевтичної та косметичної промисловості.

Таблиця 1

**Сполуки, ідентифіковані в екстракті насіння
Calendula officinalis методом ГХ/МС**

№	Час утримання, хв.	Ідентифіковані сполуки	Мол. маса
1	13,285	Ейкозан	282
2	14,513	Пальмітинова кислота	284
3		Гептакозан	414
4		Гексакозан	366
5	16,231	(Z) -7-гексадеценілацетат	282

Таблиця 2

**Сполуки, ідентифіковані в екстракті калусної біомаси
Calendula officinalis методом ГХ/МС**

№	Час утримання, хв.	Ідентифіковані сполуки	Мол. маса
1	10,429	Пальмітинова кислота	284
2	13,209	Арахідова кислота	414
3	14,468	Октакозан	408
4	15,824	Бегеніловий спирт	326
5	16,223	Гентріаконтан	437
6		Ейкозан	282
7	16,645	Октадеканова кислота	491
8	18,250	1,19-ейкозадієн	278
9		Оксиран	268
10	19,471	Трихлороцтова кислота	386
11	21,913	(Z) -7-гексадеценілацетат	282

Визначено біологічну активність отриманих БАР відповідно до класифікації WIPO IPC. У результаті проведеного скринінгу було виявлено, що БАР, які містяться в екстракті калусної біомаси *Calendula officinalis*, проявляють протиастматичну, антисеборейну активність, можуть застосовуватись як бронходилататори, відхаркувальні, протитуберкульозні, анальгетичні, жарознижувальні, протизапальні засоби, а також як препарати для дерматології, для лікування псоріазу, акне, як антиоксиданти у складі препаратів для видалення макіяжу, а також як антибактеріальні, протівірусні препарати.

Висновки. Одержано калусну біомасу *Calendula officinalis* та хлороформний екстракт з неї. Хромато-мас-спектрометричним методом визначено якісний склад компонентів летких сполук насіння *Calendula officinalis*. Основними компонентами досліджуваного екстракту є вуглеводи, насичені жирні кислоти (пальмітинова кислота). Вперше досліджено хлороформну фракцію калусної біомаси *Calendula officinalis*, в якій домінували три насичені жирні кислоти, вуглеводи. Серед ненасичених жирних кислот домінували пальмітинова, арахідова кислота та октадеканова кислоти

Враховуючи результати скринінгу БАР та їх біологічної активності, з'ясовано, що доцільно отримувати та використовувати калусну біомасу *Calendula officinalis*, отриману альтернативним методом, оскільки вона містить більше цінних БАР, ніж насіння рослини.

1. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities / C. Bicchi, C. Brunelli, C. Cordero [etc.] // *J. Chromatogr. A.* – 2004. – Vol. 1024, No. 1–2. – P. 195–207. 7. A consumer's dictionary of cosmetic ingredients / Ryth Winter. – 7th ed. – New York, 2009– P.565. 2. Phytochemical Constituents and Pharmacological Activities of *Calendula officinalis* Linn (Asteraceae): A Review / B. P. Muley, S. S. Khadabadi, N.B. Banarase // *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* – 2009. – Vol. 8 (5) – P. 455–465. 3. Zitterl-Eglseer K., Sosa S., Jurenitsch J., Schubert-Zsilavecz M., Della Loggia R., Tubaro A., Bertoldi M., Franz C. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.) // *Journal Ethnopharmacol.* – Vol. 57(2). – 1997. – P. 139–44. 4. Jiménez-Medina E., García-Lora A., Paco L., Algarra I., Collado A., Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vitro effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation // *BMC Cancer.* – Vol. 5(6). – 2006. – P. 119. 5. S. Gadzovska, V. Pavlova, M. Nasteska, A. Neskoska, M. Spasenoski. Secondary metabolite production in in vitro shoots of marigold (*Calendula officinalis* L.) / *Proceedings of the III Congress of Ecologists of Macedonia.* P. 54–61. 6. Hashim K., Mohammed Al-oubaidi, Aseel Salih Mohammed Ameen / Increasing secondary metabolites of *Calendula officinalis* L. using salicylic acid in vitro / *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, Vol. 3, Issue 5, 2014. P. 1146–1155.