

Н.С. Стадницька¹, І.В. Павлюк¹, М.О. Платонов^{1,2}, Н.Г. Оверко¹, І.І. Губицька¹, В.П. Новіков¹¹ Національний університет "Львівська політехніка",

кафедра технології біологічно активних сполук,

фармації та біотехнології

² Академія сухопутних військ імені гетьмана Петра Сагайдачного,

кафедра хімії

ВИВЧЕННЯ ФІТОХІМІЧНОГО СКЛАДУ СКОРЗОНЕРИ ПУРПУРОВОЇ ТА АНТИМІКРОБНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ЇЇ НАСТОЯНКИ

© Стадницька Н.С., Павлюк І.В., Платонов М.О., Оверко Н.Г., Губицька І.І., Новіков В.П., 2013

З метою вивчення спектра фармакологічної дії *S.purpurea* було проведено аналіз даних літературних джерел, визначено компонентний склад методом ВЕРХ, досліджено чутливість мікроорганізмів до дії водно-спиртової настоянки *S.purpurea* та проведено комп'ютерний скринінг біологічної активності діючих речовин за програмою PASS. У досліджуваному екстракті ідентифіковано хлорогенову, кофеїнову, ферулову, розмаринову кислоти, лютеолін, кверцетин, апігенін, апігенін-7-глікозид, рутин. Виявлено антимікробну активність досліджуваної настоянки до різних штамів *Staphylococcus aureus*. Одержані результати свідчать про доцільність подальшого дослідження скорзонери пурпурової як сировини для одержання фітопрепаратів з антиоксидантною та антимікробною дією.

Ключові слова: настоянка скорзонери пурпурової, метод ВЕРХ, антибактеріальна активність, комп'ютерний скринінг.

To study the action spectrum of *S.purpurea*, the analysis of the literary sources was made, the component structure was determined by the HPLS method, the sensitivity of the microorganisms against aqueous-alcohol tincture of *S.purpurea* was studied, and the computer screening of the biological activity of the substances using PASS was undertaken. There were identified chlorogenic, caffeine, ferulaic, rosemary acids, luteolin, quercetin, apigenin, apigenin-7-glucoside, and rutin. The antimicrobial activity of the tincture under investigation against different *Staphylococcus aureus* isolates was identified. The results of the investigation confirm the feasibility of the further research of *Scorzonera purpurea* as raw material for herbal remedies with antioxidant and antimicrobial properties.

Key words: tincture of *S. purpurea*, the HPLS method, antibacterial activity, computer screening.

Вступ. Підвищений попит на лікарські засоби природного походження спричиняє пошук нових рослин із певним спектром фармакологічної дії. Малодослідженою у фармакологічному та фармакогностичному сенсі є представник родини складноцвітих скорзонера пурпурова (*Scorzonera purpurea* L.). Рослини цієї родини є джерелами різних флавоноїдів, які, своєю чергою, виявляють антиоксидантні та антимікробні властивості. Відомо, що антиоксиданти мають важливе значення в процесі вільно-радикальних перетворень в організмі, тому дослідження та пошук джерел їх одержання є актуальним. Найбільш перспективними

джерелами антиоксидантів вважаються рослинні об'єкти, які одночасно містять біологічно-активні речовини (БАР) із широким спектром протимікробної дії.

Аналіз останніх досліджень. Грунтовний огляд літературних джерел щодо хімічного складу та застосування надземної та підземної частин рослин представників роду *Scorzonera*, показав, що інформація стосовно *Scorzonera purpurea* обмежується даними про застосування її надземної частини в народній медицині, як ранозагоювального засобу. Є дані про високу антимікробну активність до мультирезистентних штамів мікроорганізмів та хімічного складу етанольного екстракту з надземної частини *Scorzonera sandrasica* [1]. Трапляється інформація щодо проведених досліджень компонентного складу метанол-водного екстракту надземної частини *Scorzonera cinerea*, *Scorzonera incisa*, *Scorzonera latifolia*, *Scorzonera mollis* ssp. *szowitsii*, *Scorzonera parviflora*, and *Scorzonera tomentosa*, де методом ВЕРХ з використанням таких стандартних зразків: хлорогенова кислота, кавава кислота, ферулова кислота, кумарова кислота, рутин, гіперозид, лютеолін-7-глюкозид, гесперидин, розмаринова кислота, кверцетин, лютеолін, апігенін, виявлено хлорогенову кислоту, гіперозид та лютеолін-7-глюкозид. Також подано результати щодо високої протизапальної та ранозагоювальної активності *Scorzonera latifolia* та *Scorzonera mollis* sp. *szowitsii* порівняно з екстрактами інших представників цього класу [2].

Метою дослідження було встановлення складу та дослідження антимікробної активності настоянки скорзонери пурпурової.

Експериментальні дослідження. Вихідною сировиною для досліджень було використано висушену за нормальних умов (в темному місці, температурі 20–25°C, відносній волозі 30–60 %). Трава скорзонери пурпурової зібрана в період цвітіння в місяці липні в Карпатському регіоні: Львівській області селі Славську. Досліджувану сировину використовували для одержання настоянки.

Склад одержаної настоянки ідентифікували методом високоефективної рідинної хроматографії на приладі Agilent 1200 з діодно-матричним детектором. Хроматографування проводилось на колонці, заповненій октадецилсилільним сорбентом C₁₈ з розміром частинок 5 мкм [3]. Рухома фаза: ацетонітрил - буфер фосфатно кислий рН 2,8 із градієнтом ацетонітрилу від 10% до 50% об. Випробовуваний зразок розчиняли у різних розчинниках:

1. Випробовуваний зразок- 2,0 мл розбавляли буферним розчином до 10,0 мл, об'єм інжекції 50 мкл. (рис 2).
2. Випробовуваний зразок- 2,0 мл розбавляли метанолом Р до 10,0 мл (рис. 3).
3. Випробовуваний зразок- 5,0 мл розбавляли рухомою фазою до 10,0 мл (рис. 4).

У настоянці виявлено велику кількість БАР, серед яких ідентифіковано хлорогенову, кофейнову, ферулову, розмаринову кислоти, лютеолін, кверцетин, апігенін, апігенін-7-глікозид, рутин (рис. 2, 3, 4). Для їх ідентифікації використовували розчини стандартних зразків (рис. 1). Найбільшу кількість у настоянці становлять хлорогенова кислота, лютеолін і апігенін.

Хлорогенова кислота є важливою біологічно активною речовиною з антимікробною, противірусною дією та високою антиоксидантною активністю. Кверцетин, лютеолін, апігенін – це флавоноїди, які мають високий антиоксидантний потенціал.

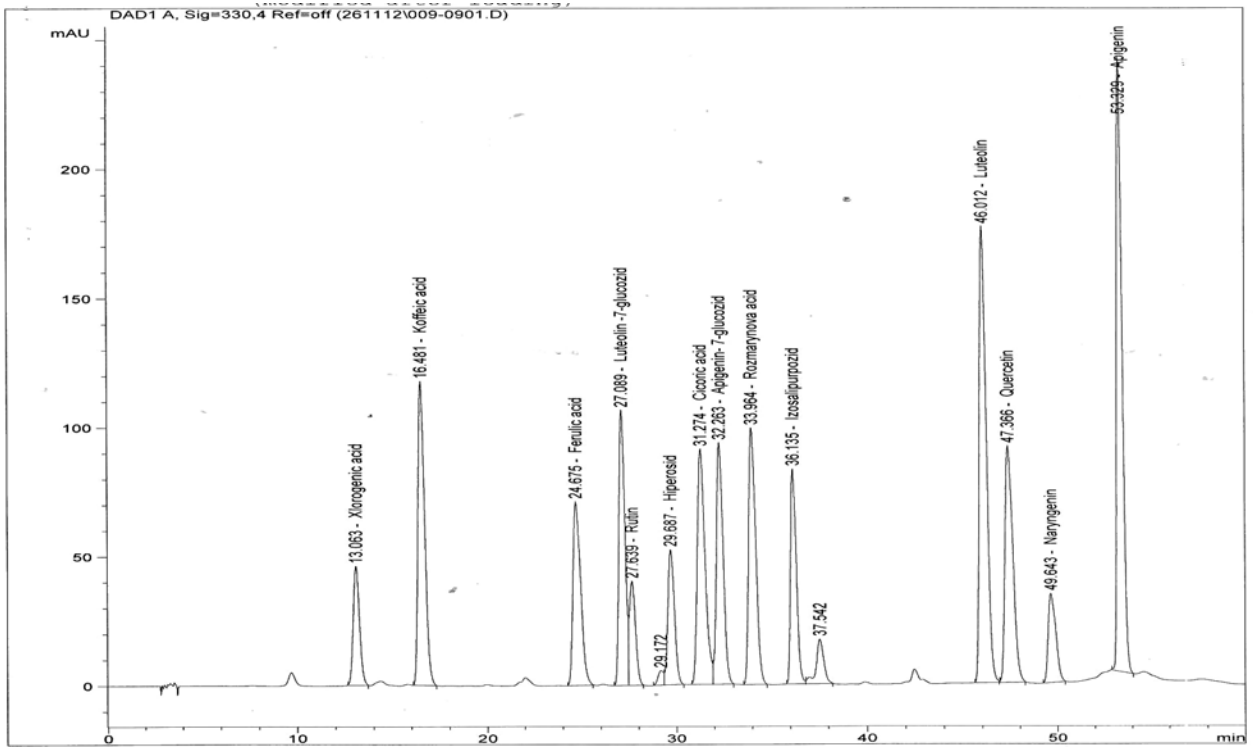


Рис. 1. Хроматограма розчинів стандартних зразків

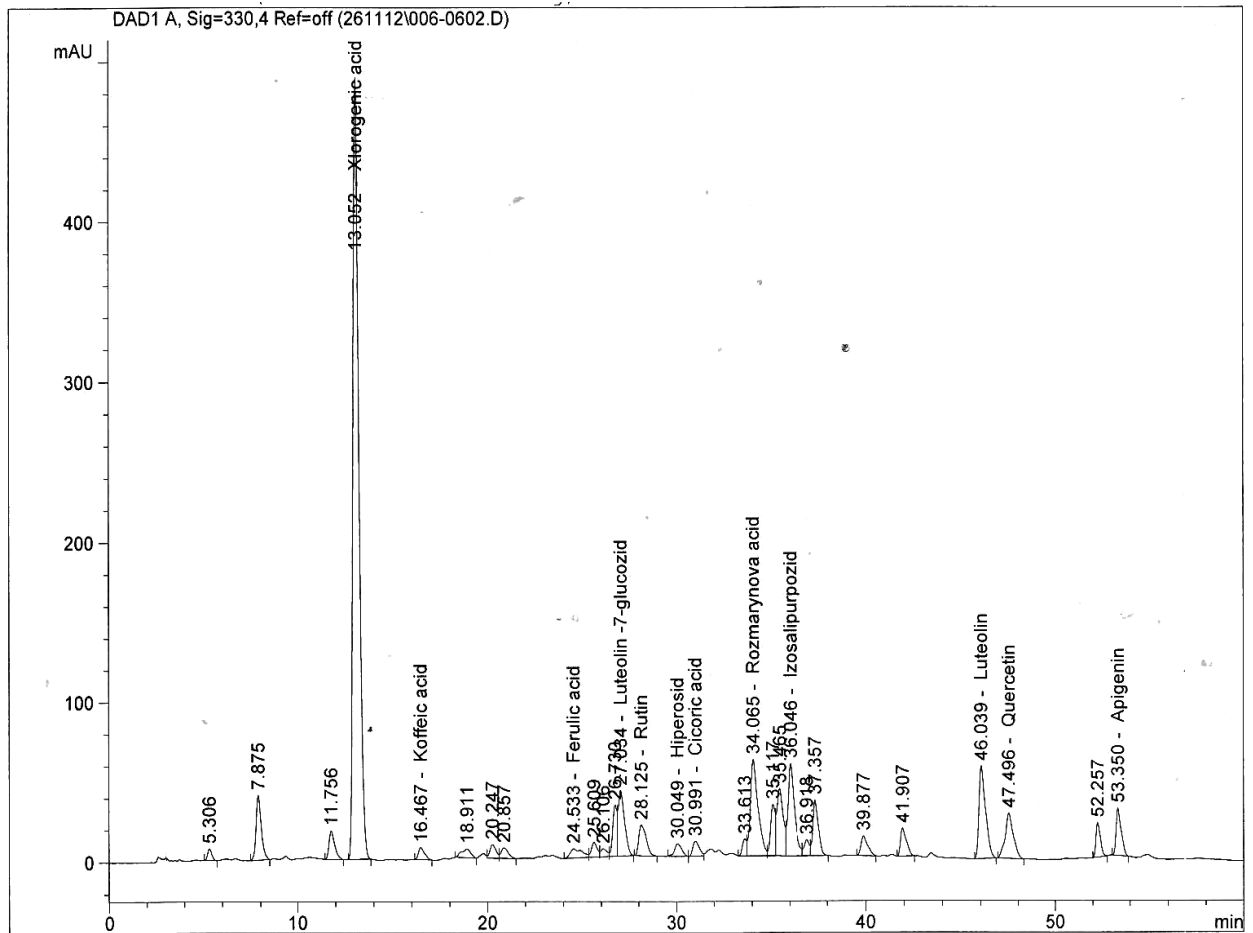


Рис. 2. Хроматограма випробуваного розчину у буфері

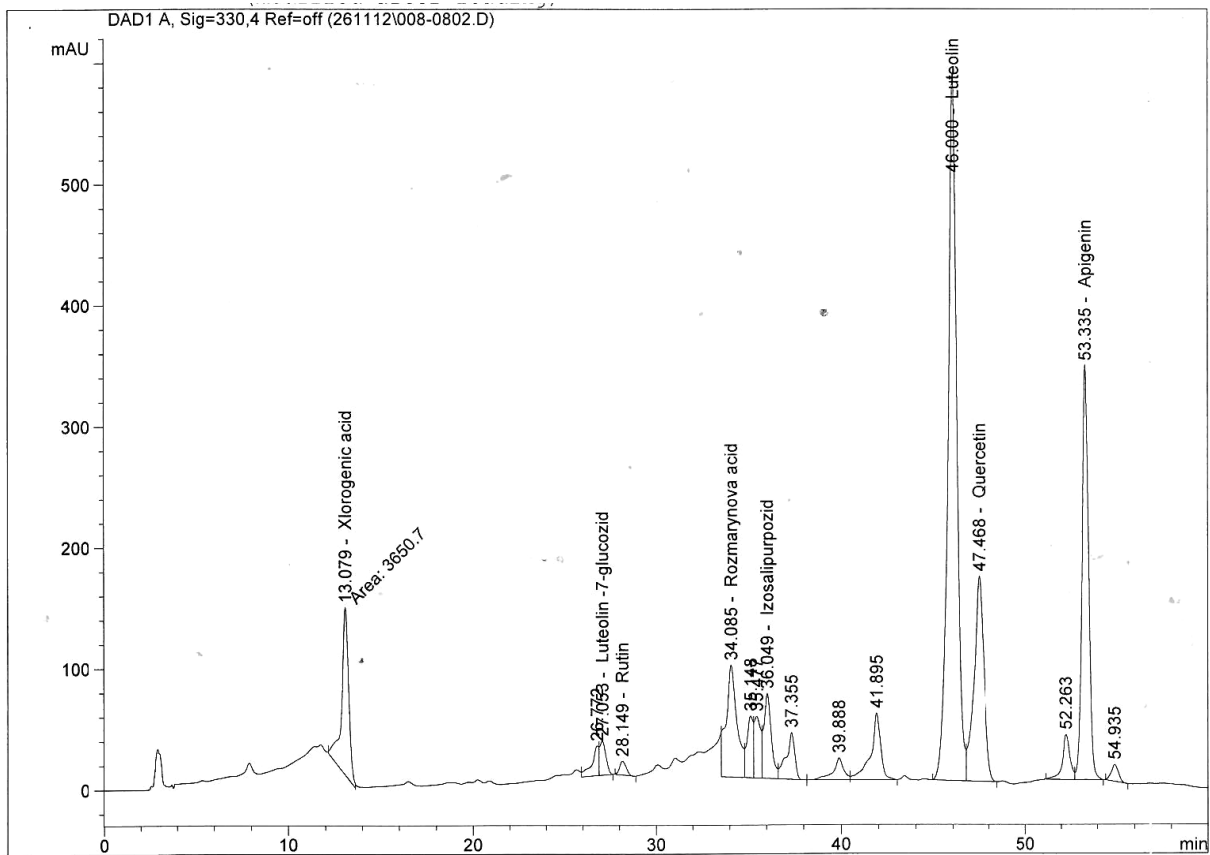


Рис. 3. Хроматограма випробуваного розчину у метанолі

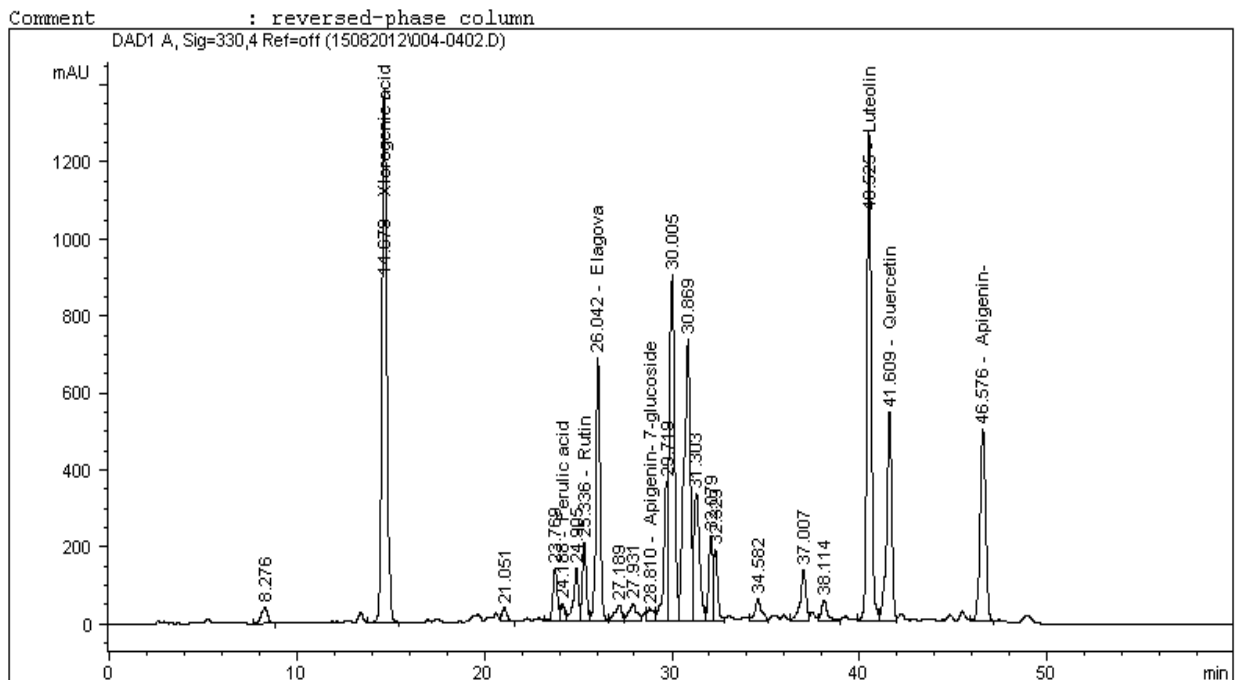


Рис. 4. Хроматограма випробуваного розчину в рухомій фазі

Для дослідження антимікробної активності настоянки використовували тест культури таких мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Candida albicans* ATCC 10231. Дослідження проводили методом дифузії в

агар відповідно до вимог ДФУ 1.4 пункт 2.7. (табл. 2) [3]. У лунку вносили 0,09 мл зразка, інкубували протягом 24 год при 35°C для бактерій та протягом 48 год при 25°C. Найбільш чутливими стосовно досліджуваної настоянки виявилися штами *S. aureus* (діаметри зон затримки росту 17–18 мм), та *B. subtilis* (діаметр зони затримки росту 16 мм). Також чутливою виявилась культура *P. aeruginosa* (діаметр зони затримки росту 11 мм). Для штаму *C. Albicans* зона затримки росту була незначною.

Таблиця 2

Результати дослідження антимікробної дії настоянки методом дифузії в агар

№	Тест-мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту тест-мікроорганізмів, мм	
		Настоянка	Водний розчин етанолу 70 %
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	17,0	-
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	18,0	-
3	<i>Staphylococcus aureus</i> клінічний ізолят Н	17,5	-
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	16,0	-
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	11,0	-
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10,0	-

“-” зона затримки росту відсутня

Для точнішого визначення характеру дії настоянки використовували метод серійних розбавлень в соєво-казеїновому бульйоні, мікробіологічне навантаження становило 5000 клітин тест-мікроорганізму на 1 мл. Інкубували протягом 24 год при 35°C для бактерій та протягом 48 год при 25°C. З'ясувалося, що досліджувана настоянка виявляє антибактеріальну дію, а саме бактерицидну щодо грам-позитивних та до грам-негативних бактерій, а також до грибів роду *Candida*. (табл. 3) [7].

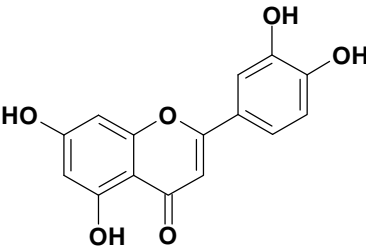
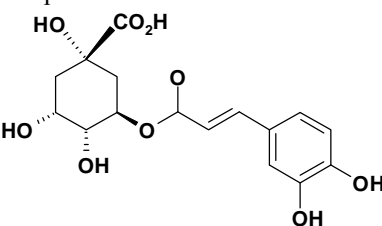
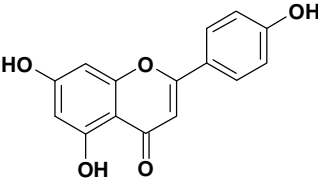
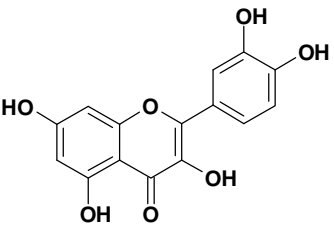
Таблиця 3

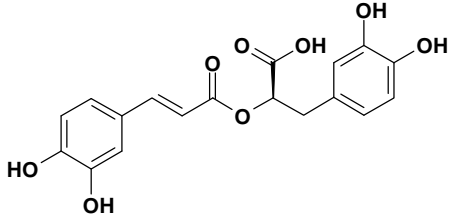
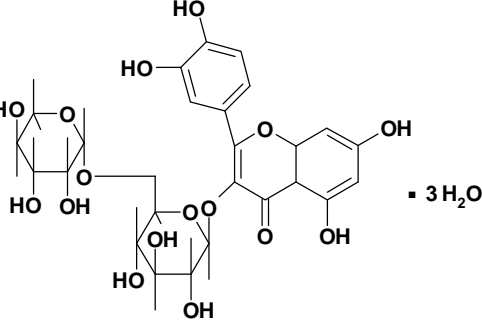
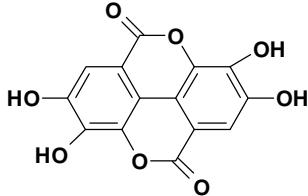
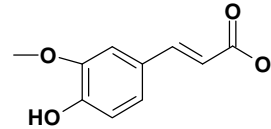
Результати дослідження антимікробної дії настоянки методом розбавлень в соєво-казеїновому бульйоні

№	Тест-мікроорганізм	Розбавлення, при якому спостерігався бактерицидний ефект
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	1:80
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538-P	1:80
3	<i>Staphylococcus aureus</i> клінічний ізолят Н	1:80
4	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	1:40
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	1:40
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1:40

Для встановлення повного спектра біологічної активності використано комп'ютерний скринінг біологічної активності виділених речовин за програмою PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [4,5]. Проведено скринінг 8 сполук, виявлених в настоянці. Для оцінки відібрано активності, актуальні при зовнішньому застосуванні з показником P_a більше 0,3 (табл. 4).

Результати прогнозу величини активності досліджуваних сполук *Scorzonera purpurea*

№ з/п	Досліджувана сполука	P_a	Активність
1	Лютеолін 	0,704	Антисептична
		0,666	Протизапальна
		0,580	Лікування проліферативних хвороб
		0,519	Протигрибкова
		0,472	Противірусна (Герпес)
		0,459	Протитуберкульозна
		0,458	Противірусна (Грип)
		0,423	Лікування судинних хвороб
		0,413	Протиалергічна
		0,402	Антипротозойна
		0,385	Антибактеріальна
		0,378	Протипухлинна (рак язика)
2	Хлорогенова кислота 	0,576	Анестезуюча
		0,564	Антипротозойна
		0,414	Противірусна (Герпес)
		0,403	Противірусна (Грип)
		0,392	Протитуберкульозна
		0,357	Протизапальна
		0,351	Антисептична
		0,359	Протигрибкова
		0,345	Імуностимулююча
		3	Апігенін 
0,697	Антисептична		
0,555	Лікування проліферативних захворювань		
0,522	Протигрибкова		
0,508	Антимікобактеріальна		
0,472	Проти <i>Helicobacter pylori</i>		
0,470	Противірусна (Герпес)		
0,459	Протитуберкульозна		
0,454	Противірусна (Грип)		
0,403	Протипухлинна (рак дрібних клітин язика)		
0,414	Протиалергічна		
0,386	Антибактеріальна		
0,340	Антипротозойна		
4	Кверцетин 	0,886	Антиоксидантна
		0,709	Протизапальна
		0,620	Лікування проліферативних захворювань
		0,533	Антисептична
		0,487	Противірусна (Герпес)
		0,493	Протигрибкова
		0,477	Антиалергічна
		0,433	Мутагенна на <i>Salmonella</i>
		0,424	Протитуберкульозна
		0,429	Протимікобактеріальна
		0,398	Противірусна (Грип)

№ з/п	Досліджувана сполука	P_a	Активність
5	Розмаринова кислота 	0,406	Противірусна (Грип)
		0,300	Антисептична
6	Рутин 	0,674	Інгібітор пероксидаз
		0,655	Протипухлинна
		0,591	Протигрибкова
		0,562	Антиоксидантна
		0,560	Антикарценогенна
		0,504	Лікування проліферативних захворювань
		0,442	Противірусна (Герпес)
		0,380	Антибактеріальна
		0,350	Антипротозойна
		0,375	Противірусна (Риновірус)
7	Елагова кислота 	0,901	Антимутагенна
		0,861	Інгібітор пероксидаз
		0,748	Протизапальна
		0,739	Антиоксидантна
		0,629	Протипухлинна
		0,540	Антисептична
		0,431	Противірусна (Герпес)
		0,410	Антипротозойна
		0,361	Протипухлинна (рак дрібних клітин язика)
		0,379	Антибактеріальна
		0,390	Протигрибкова
		0,301	Протимікобактеріальна
		8	Ферулова кислота 
0,775	Антисептична		
0,708	Інгібітор пероксидаз		
0,661	Протизапальна		
0,607	Знеболююча		
0,566	Радіопротекторна		
0,547	Антиоксидантна		
0,501	Протитуберкульозна		
0,511	Протиалергічна		
0,501	Противірусна (Грип)		
0,496	Протимікобактеріальна		
0,433	Анти -Helicobacter pylori		
0,430	Протигрибкова		
0,333	Антибактеріальна		
0,303	Протипухлинна (рак дрібних клітин язика)		

Як видно з наведених даних, настоянка, згідно з прогнозом PASS, може виявляти необхідні властивості для створення засобу догляду за ротовою порожниною, а саме: протизапальні, знеболювальні, протипухлинні (рак дрібних клітин язика), антисептичні, антибактеріальні.

Висновки. Вивчено якісний склад настоянки скорзонери пурпурової методом ВЕРХ. Ідентифіковано хлорогенову, кофеїнову, ферулову, розмаринову кислоти, лютеолін, кверцетин, апігенін, апігенін-7-глікозид, рутин. З огляду на високу антимікробну активність щодо різних штамів *Staphylococcus aureus* та результати комп'ютерного скринінгу біологічної активності хімічних речовин за програмою PASS, доцільно розглянути можливість введення *Scorzonera purpurea* до складу фітозасобу для зовнішнього застосування.

Також одержані результати свідчать про доцільність подальшого дослідження скорзонери пурпурової як сировини для одержання фітопрепаратів з антиоксидантною та антимікробною дією.

1. *Chemical composition of endemic Scorzonera sandrasica and studies on the antimicrobial activity against multiresistant bacteria.* Aysel Ugur Department of Biology, Faculty of Science and Arts, Mugla University, Mugla, Turkey *J Med Food* 13:635-9. 2010. 2. *Enhancement of wound healing by topical application of Scorzonera species: Determination of the constituents by HPLC with new validated reverse phase method* Gazi University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, Etiler, 06330 Ankara, Turkey, Ankara University, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacognosy, 06100 Ankara, Turkey, Afyon Kocatepe University, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Pathology, 03200 Afyonkarahisar, Turkey. 3. *Державна фармакопея України 1.4. "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів" на підставі Європейської фармакопеї.* Харків 2011. 4. *PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products* Rajesh Kumar Goel, Damanpreet Singh, Alexey Lagunin, Vladimir Poroikov Received: 15 March 2010 / Accepted: 22 July 2010_ Springer Science+Business Media, LLC 2010. 5. *Rollinger JM, Stuppner H, Langer T (2008) Virtual screening for the discovery of bioactive natural products. Prog Drug Res* 65:211–249. 6. *М.С.Вишневська, Н.М. Косяченко, Л.І. Вишневська Прогноз спектра біологічної активності сполук як основа для пошуку нових ліків. Національний фармацевтичний університет, м.Харків. Запорожський медичинський журнал* 2011, том 13, №2. 7. *N 167, 05.04.2007, Наказ, Вказівки, Міністерство охорони здоров'я України Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів".*