Chemistry, Technology and Application of Substances

Vol. 6, No. 2, 2023

В. Р. Карпюк[1], І. Я. Гнатів[2], І. І. Губицька[1], Л. Д. Болібрух[1], Ізабелла Ясіцька-Місяк[3], Р. Т. Конечна[1]

[1] Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології,
[2] АТ "Галичфарм",
[3] Опольський університет, Ополе, Польща
roksolana.t.konechna@lpnu.ua

ДОСЛІДЖЕННЯ СКЛАДУ ТА АНТИОКСИДАНТНОЇ ДІЇ ХЛОРОФОРМНОГО ЕКСТРАКТУ ТРАВИ *RANUNCULUS ACRIS L.*

https://doi.org/10.23939/ctas2023.02.087

Викладено результати дослідження хлороформного екстракту трави *Ranunculus acris* L., зокрема вміст біологічно активних речовин та антиоксидантну активність. Ідентифіковано 33 леткі сполуки: естери жирних кислот, вищі жирні кислоти, насичені вуглеводні (алкани), моноциклічні та біциклічні монотерпеноїди тощо. Встановлено, що хлороформний екстракт проявляє антиоксидантну дію. Значний вміст біологічно активних речовин у ліпофільній леткій фракції *Ranunculus acris L.* свідчить про перспективи подальших досліджень.

Ключові слова: хлороформний екстракт; біологічно активні речовини; *Ranunculus acris* L.; антиоксидантна дія.

Вступ

Актуальним завданням фармацевтичної науки, зважаючи на збільшення попиту на фітозасоби, є пошук нових видів рослин, які могли б стати джерелом біологічно активних сполук. Згідно із даними ВООЗ, 25 % зареєстрованих лікувально-профілактичних засобів, використовуваних в умовах сьогодення, створено на основі рослинної сировини. Зауважимо, що попит на препарати рослинного походження різної спрямованості дії постійно зростає. Фітопрепарати застосовують у: Бельгії – 38 %, Австралії – 48 %, Канаді – 70 %, Франції – 75 % населення [1]. Також у США близько 55 % лікувально-профілактичних засобів отримують із природної рослинної сировини [2].

Представники родини Жовтецеві (*Ranunculaceae*) особливо цікавлять науковців, оскільки є перспективними об'єктами для досліджень та містять біологічно активні сполуки (алкалоїди, сапоніни, кардіостероїди, фенольні сполуки тощо), які давно використовують у традиційній медицині як лікарські засоби із різноманітною фармакологічною дією [3, 7]. До родини *Ranunculaceae* належать такі відомі роди лікарських рослин, як *Aconitum*, *Actaea*, *Adonis*, *Delphinium*, *Helleborus*, *Nigella*, *Ranunculus* тощо [3]. Неабиякий інтерес у науковців викликають види роду Жовтець (*Ranunculus*), рослинна сировина яких виявляє протизапальну, антибактеріальну, антигрибкову, протиракову, болетамувальну дію [3, 6].

Перспективною рослиною для детального фармакогностичного та фармакологічного дослідження є жовтець їдкий (*Ranunculus acris* L.).

Ranunculus acris L. – багаторічна трав'яниста рослина родини *Ranunculaceae*, поширена в Україні у дикорослому стані. Рослина неофіцинальна; використовується в народній медицині різних країн, оскільки виявляє антимікробні, антивірусні, протизапальні, антитоксичні, епітелізувальні та протитуберкульозні властивості. До основних біологічно активних речовин рослини належать алкалоїди (до 0,1 %), дубильні речовини (більше ніж 2 %), сапоніни, γ-лактони (ранункулін, анемонін, протоанемонін), флавоноїди (кемпферол, кверцетин) та серцеві глікозиди [4, 5]. Незважаючи на значний період застосування *Ranunculus acris L.* в народній медицині і широкий спектр лікувальних властивостей [3–5], рослина все ж за-

лишається недостатньо вивченою. Тому доцільно вивчити її з фітохімічного та фармакологічного погляду та встановити можливість застосування сировини *Ranunculus acris L*. як джерела біологічно активних сполук.

Метою дослідження є визначення компонентного складу і вмісту біологічно активних речовин одержаного хлороформного екстракту трави *Ranunculus acris* L., вивчення антиоксидантної активності та встановлення можливості розроблення на його основі нових лікувально-профілактичних засобів.

Матеріали та методи досліджень

Сировину (траву *Ranunculus acris* L.) для досліджень заготовляли із природних місць зростання (екологічно чистий регіон Волинської області, Україна) у період цвітіння в 2021 р. Сушили повітряно-тіньовим способом та подрібнювали [8].

Ліпофільний екстракт трави *Ranunculus acris* L. одержували за допомогою методу вичерпного екстрагування в апараті Сокслета, екстрагент – хлороформ. Одержані хлороформні екстракти випаровували до повного видалення екстрагенту та зважували. Масу ліпофільної фракції визначали, віднімаючи значення маси приймача, заповненого субстанцією, від попередньо визначеної маси порожнього приймача [8, 9]. Розраховували вихід ліпофільної фракції (X, %) трави *Ranunculus acris* L. в перерахунку на абсолютно суху сировину за формулою:

$$X = \frac{m_{\text{л.ф}} \cdot 100 \cdot 100}{m_{\text{н}} \cdot (100 - w)}$$

де $m_{л.ф.}$ – маса ліпофільної фракції, г; $m_н$ – маса наважки сировини, г; w – втрата в масі під час висушування, % [9,10].

Компонентний аналіз вмісту біологічно активних речовин одержаного ліпофільного екстракту виконували із використанням хроматографа Agilent Technology 6890 GC System із масспектрометричним детектором HP 5973 Mass Selective Detector. Компоненти розділяли на колоні з плавленим кремнеземом Restek Rtx-5MS довжиною 30 м і внутрішнім діаметром 0,32 мм. Стаціонарна рідка фаза завтовшки 0,25 мкм складалася з 95 % поліметилсилоксану і 5 % фенілполісилоксану. Газом-носієм був гелій. Швидкість газу-носія становила 2,0 мл/хв. Термостат колони нагрівали за такою програмою: початкову температуру 60 °С підтримували протягом 10 хв, а потім температуру підвищували – по 20 °С/хв до 280 °С. Ця температура залишалася постійною упродовж 30 хв, температура детектора та випарника становила 280 °С. Біологічно активні речовини ідентифікували за часом утримування, порівнюючи його зі стандартами та з бібліотекою мас-спектрів NIST 05 та WILEY 2007, загальна кількість спектрів понад 470000.

Антиоксидантну активність визначали з використанням радикала ДФПГ (2,2-дифеніл-1-пікрилгідразил) та катіон-радикала АБТС (2,2'-азино-біс-(3-етилбензтіазолін-6-сульфокислоти), що є стабільним вільним радикалом.

Дослідження антиоксидантної дії здійснено за допомогою модифікованого методу. На першому етапі дослідження готували розчин 0,1 мМ ДФПГ. На наступному етапі дослідження до 500 мкл досліджуваного екстракту додавали 4,5 мл розчину ДФПГ та інкубували протягом 30 хв у темному місці за кімнатної температури. Далі дослідження продовжували на спектрофотометрі Hitachi U-2810 за довжини хвилі 517 нм. Як контрольний зразок використовували хлороформ.

Розрахунок антиоксидантної активності виконували за формулою:

$$\% \text{ інгібування} = (A_{control} - A_{sample}) / A_{control} \times 100\ \%.$$

де $A_{control}$ – оптична густина вихідного розчину ДФПГ; A_{sample} – оптична густина зразка з розчином ДФПГ. Вимірювання виконували тричі [11, 12].

Ефект поглинання вільних радикалів екстракту визначали за допомогою аналізу знебарвлення катіон-радикала АБТС. На першому етапі цього дослідження готували основний розчин катіон-радикала АБТС (АБТС *), додаючи 10 мл 0,014 мМ розчину АБТС до розчину персульфату калію (приготованого розчиненням 0,0135 г $K_2S_2O_8$ у 10 мл води). Одержану суміш перемішували і залишали в темному місці за кімнатної температури на 20 год. На наступному етапі готували розведений розчин АБТС * ($A_{control}$) – 1 мл розчину розводили до 100 мл водою, її використовували для подальшого дослідження. Досліджуваний екстракт змішували з розведеним розчином АБТС * (A_{sample}) та вимірювали коефіцієнт поглинання. Дослідження здійснювали на спектрофотометрі Hitachi U-2810 за довжини хвилі 734 нм. Всі вимірювання виконували тричі. Відсоток інгібування розраховували, використовуючи наведене вище рівняння [13–15].

Радикалпоглинальний ефект обчислювали у відсотках для досліджуваного екстракту.

Одержані результати статистично оброблено із використанням програми STATISTICA 8 та пакета статистичних функцій програми Microsoft Excel. Визначено середнє арифметичне відхилення *m*, середнє арифметичне значення M, *t*-критерій Стьюдента, кількість повторень *n*.

Результати досліджень та їх обговорення

Перший етап досліджень полягав у аналізі одержаної хроматограми експериментального зразка екстракту (рис. 1). У результаті дослідження виявлено і встановлено кількісний вміст 33 летких сполук (рис. 1 та табл. 1).

У таблиці наведено вміст ідентифікованих сполук у хлороформному екстракті трави *Ranunculus acris L.*

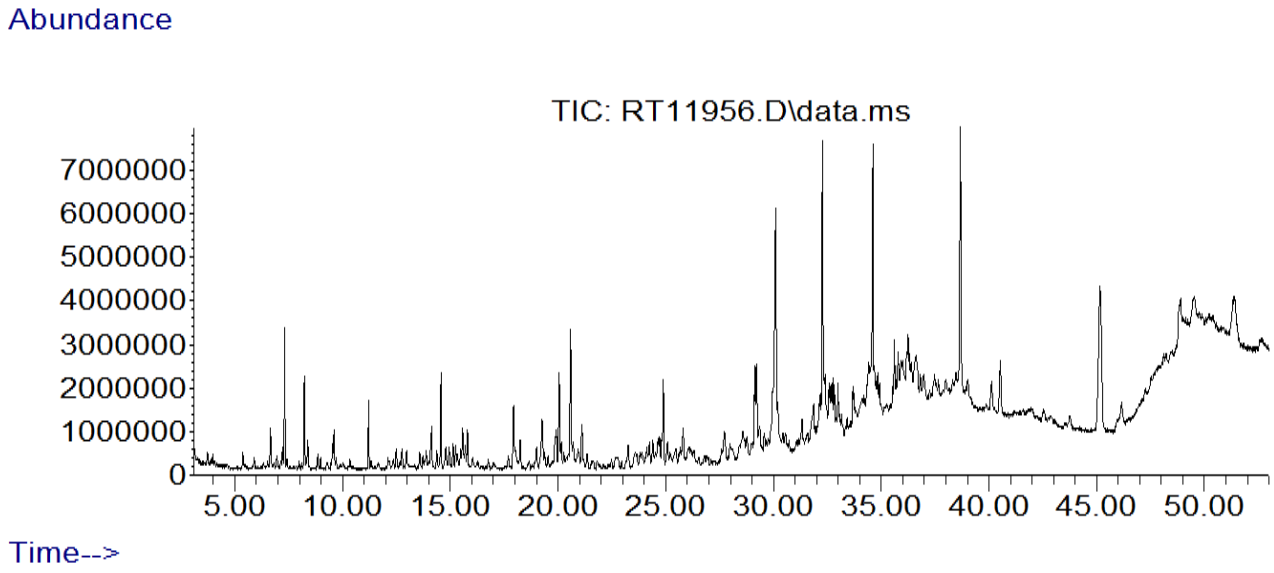

Рис. 1. Хроматограма летких речовин хлороформного екстракту трави Ranunculus acris L.

Таблиця 1

Склад та вміст ідентифікованих сполук хлороформного екстракту трави *Ranunculus acris L.*

№ з/п	Час утримання	Назва речовини	Вміст, %
1	2	3	4
1	7,317	D-лімонен	0,62
2	17,935	Міристальдегід $C_{14}H_{28}O$	0,59
3	19,264	3-етилтридекан $C_{15}H_{32}$	0,50
4	19,921	Генейкозан $C_{21}H_{44}$	0,40
5	20,050	Гептадекан	0,55
6	24,894	Генейкозан $C_{21}H_{44}$	0,63
8	25,809	Нонадекан	0,30
10	28,595	3-метилнонадекан	0,53
11	29,210	Октакозан $C_{28}H_{58}$	0,70
12	29,367	Генейкозан $C_{21}H_{44}$	0,45
13	30,110	Пальмітинова кислота $C_{16}H_{32}O_2$	2,86
14	30,196	Пальмітинова кислота $C_{16}H_{32}O_2$	0,57
15	31,339	Докозан $C_{22}H_{46}$	0,39
16	31,868	Генейкозан $C_{21}H_{44}$	0,82
18	32,182	Октакозан $C_{28}H_{58}$	0,62
19	32,282	2-(феніл-піперидиніл) метил)циклогексанол $C_{18}H_{27}NO$	1,92
20	32,397	Тетракозан $C_{24}H_{50}$	0,78
21	32,597	9-метилнонадекан $C_{20}H_{42}$	0,54

Продовження табл. 1

1	2	3	4
22	32,668	Октакозан $C_{28}H_{58}$	0,44
23	32,754	Пентакозан $C_{25}H_{52}$	0,41
24	32,825	Лаурил амід $C_{12}H_{25}NO$	0,40
25	33,011	Гексадекан (цетан) $C_{16}H_{34}$	0,50
26	33,168	Ейкозан $C_{20}H_{42}$	0,39
27	33,426	3-метилгептадекан $C_{18}H_{38}$	0,51
28.	33,797	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	0,51
29	34,054	9-метилнонадекан $C_{20}H_{42}$	0,57
30	34,126	Тетракозан $C_{24}H_{50}$	0,45
31	34,426	Пентакозан $C_{25}H_{52}$	1,09
32.	34,612	Олеамід $C_{18}H_{35}NO$	2,65
33	34,855	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	0,56
34	34,926	Трикозан $C_{23}H_{48}$	0,85
35.	35,269	Трикозан $C_{23}H_{48}$	0,64
36	35,541	3,6-диметилдекан $C_{12}H_{26}$	0,50
37	35,626	Гептадекан $C_{17}H_{36}$	0,77
38	35,784	Бехеніл хлорид 1-хлородокозан $C_{22}H_{45}Cl$	0,82
39	35,941	Трикозан $C_{23}H_{48}$	0,82
40	36,012	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	1,15
41	36,198	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	0,63
42	36,255	2-метил-гептадекан $C_{18}H_{38}$	0,70
43	36,398	Трикозан $C_{23}H_{48}$	0,68
44	36,627	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	2,19
45	36,984	2-метилгексадекан C 17 H 36	1,59
46	37,484	Ейкозан $C_{20}H_{42}$	1,38
47	37,870	1,2-бензізотіазол,3-(гексагідро-1H-азепін-1-іл)-,1,1-діоксид $C_{13}H_{16}N_2O_2S$	0,78
48	37,999	Докозан $C_{22}H_{46}$	0,96
49	38,327	3-метил-октадекан	0,95
	38,470	Трикозан	0,83
50	38,685	Еруциламід (13-докозамід) $C_{22}H_{43}NO$	3,36
51	39,027	Тетракозан	1,13
52	40,128	1-гептадецен $C_{17}H_{34}$	0,94
53	40,528	Трикозан $C_{23}H_{48}$	1,13
54	41,971	Тетракозан	1,05
55	45,158	Трикозан $C_{23}H_{48}$	2,21
56	47,530	Бехеніл хлорид	0,70
57	48,502	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	1,09
58	48,902	Пентатріаконтан	2,26
59	49,245	3-метил-генейкозан	0,94
60	49,517	Нонадекан $C_{19}H_{40}$	2,36
61	49,903	Ейкозан $C_{20}H_{42}$	1,00
62	50,203	Ейкозан $C_{20}H_{42}$	0,71
63	50,246	Ейкозан $C_{20}H_{42}$	0,74
64	50,560	Бехеніл хлорид 1-хлородокозан $C_{22}H_{45}Cl$	0,65
65	51,332	Гексадецил пропілестер щавелевої кислоти	0,85
66	51,389	1-ейкозен (цетил етилен) $C_{20}H_{40}$	1,27

Аналізуючи дані, наведені в таблиці, можна зробити висновок, що в досліджуваному екстракті ідентифіковано та встановлено кількісний вміст 33 летких сполук, серед яких: вищі жирні кислоти, естери жирних кислот і аміди, монотерпеноїди, насичені вуглеводні (алкани) тощо. Результати дослідження свідчать, що компонентний склад всіх досліджуваних об'єктів представлений здебільшого парафіновими вуглеводнями, альдегідами та естерами жирних кислот та деяким вмістом терпенів. Так, вміст гексадекану становить 0,5 %, нонадекану – 8,79 %, ейкозану – 4,22 %, докозану – 1,35 %, трикозану – 7,16 %, тетракозану – 2,28 %, гептадекану – 1,32 %, пентатріаконтану – 2,26 %, октакозану – 1,76 % та ін. Вміст пальмітинової кислоти становить 3,43 %. Відзначимо наявність у досліджуваному зразку слідів монотерпену D-лімонену (0,62 %).

Результати дослідження антиоксидантної активності хлороформного екстракту ***Ranunculus acris*** L. методом визначення радикалпоглинальної активності радикала ДФПГ та ефекту поглинання вільних радикалів екстракту методом аналізу знебарвлення катіон-радикала АБТС подано на діаграмі (рис. 2).

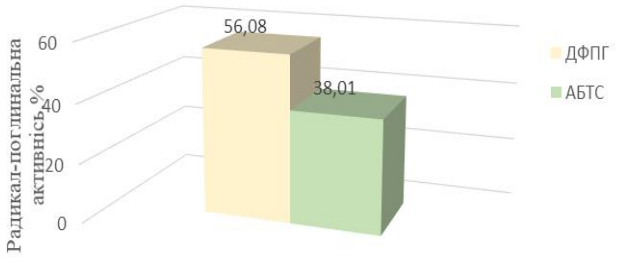

Рис. 2. Активність екстрактів ***Ranunculus acris L.*** *щодо поглинання радикалів ДФПГ та АБТС*

Аналіз одержаних результатів дослідження свідчить про достатньо високий рівень антиоксидантної дії досліджуваного екстракту. Ступінь інактивації радикала ДФПГ становить 56,08 %, а відсоток поглинання катіон-радикала $АБТС^{+}$ – 38,01 %, що свідчить про здатність екстракту призупиняти окиснювальний процес, що зумовлює його антиоксидантну активність.

У результаті здійснених досліджень встановлено, що екстракт ***Ranunculus acris*** L. проявляє антиоксидантну активність, що уможливлює використання екстрактів ***Ranunculus acris*** L. у перспективі для розроблення та створення засобів із антиоксидантною дією.

Висновки

Дослідження спрямоване на аналіз складу хлороформного екстракту трави ***Ranunculus acris L.*** Ліпофільну фракцію ***Ranunculus acris L.*** отримували методом вичерпної екстракції хлороформом в екстракторі Сокслета. Вихід становив 7,26 %. За допомогою хромато-мас-спектрометрії вперше визначено компонентний склад летких речовин фракції хлороформу ***Ranunculus acris L.*** Виявлено та ідентифіковано 33 леткі речовини.

Визначено антиоксидантну активність екстракту з використанням радикала ДФПГ та катіон-радикала АБТС. Встановлено, що екстракт проявляє антиоксидантну активність та потенційно може використовуватись для розроблення нових антиоксидантних засобів, проте потребує подальших глибших досліджень.

Результати досліджень підтверджують можливість використання сировини ***Ranunculus acris L.*** як потенційного джерела біологічно активних сполук для створення нових фітопрепаратів комплексної дії.

References

1. Sambukova T. V., Ovchynnykov B. V., Hanapol′s′kyy V. P. y dr. (2017). Perspektyvy yspol′zovanyya fytopreparatov v sovremennoy farmakolohyy. *Farmakolohyya*. No. 2. S. 56–63 (in Ukrainian).

2. Borysyuk, I. Yu., Zamkova, A. V., Andronaki-Tsurkan, O. V., Boyko, K. V., Kachanova, O. M., Morozova, N. M., & Fayer, R. S. (2022). *Aktual'nist' rozrobky novykh likars'kykh preparativ pryrodn'oho ta syntetychnoho pokhodzhennya*.

3. Liakh V. R., Konechna R. T. (January 2020). *Prykladni aspekty zastosuvannya likars'kykh roslyn rodyny Ranunculaceae v etnomedytsyni ta farmatsiyi*. Challenges and achievements of medical science and education, pp. 202–217. Publishing House "Baltija Publishing" (in Ukrainian).

4. Karpiuk, V. R., Yuzkiv, S. L., Zhurakhivska, L. R., Konechnyi, Y. T., & Konechna, R. T. (2021). Zhovtets′ yidkyy (*Ranunculus acris* L.): analitychnyy ohlyad poshyrennya, khimichnoho skladu, biolohichnoyi aktyvnosti ta medychnoho zastosuvannya. *Farmatsevtychnyy chasopys*, (3), 74–82 (in Ukrainian).

5. Bhattarai, B., Richter, A., Metze, D., Sigurdsson, B. D., Sigurdsson, P., Leblans, N., ... & Ostonen, I. (2023). *Non-structural carbohydrates in fine roots and rhizomes in warmed subarctic grasslands* (No. EGU23-12951). Copernicus Meetings.

6. Byambaa, T., Bold, U., Ragchaasuren, N., Gendaram, O., & Bud, K. (2022). In vitro Study Results of the Ranunculus Repens L.'s Effect on Some Cancer Cells. *In vitro*, *29*(11).

7. Goo, Y. K. (2022). Therapeutic Potential of Ranunculus Species (Ranunculaceae): A Literature Review on Traditional Medicinal Herbs. *Plants*, *11*(12), 1599.

8. Solodovnychenko N. M., Zhuravl′ov M. S., Koval′ov V. N. (2001). *Likars'ka roslynna syrovyna ta fitopreparaty: Posib. z farmakohnoziyi z osnovamy biokhimiyi likar. roslyn* . Kharkiv: Vyd-vo NFAU. Zoloti storinky (in Ukrainian).

9. Shao. S., Wang M.-X., Fan L. (2020). Antifatigue Activiti of Glycoprotein from Schisandra chinensis Functions by Reducing Oxidative Stress. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, pp. 1–8. https://doi. org/10.1155/2020/4231340

10. Yurchenko N. S., Il′yina T. V., Koval′ova A. M. (2012). Doslidzhennya skladu khloroformnoyi fraktsiyi travy marenky zapashnoyi. *Ukrayins'kyy biofarmatsevtychnyy zhurnal*, No. 3(20), 72–76 (in Ukrainian).

11. Karpiuk V., Konechna R. (2021). Total phenolic and flavonoid content, antioxidant activity of Ficarea verna. *Scientific journal of Polonia university*, pp. 229–234.

12.Quy Diem Do, Artik Elisa Angkawijaya, Phuong Lan Tran-Nguyen, Lien Huong Huynh, Felycia Edi Soetaredjo , Suryadi Ismadji , Yi-Hsu Ju. (2013). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 22, pp. 296–302. DOI: 10.1016/j.jfda.2013.11.001.

13.Katalinic V., Milos M., Kulisic T., Jukic M. (March 2006). Screening of 70 medicinal plant extracts for antioxidant capacity and total phenols. *Food Chemistry*, Vol. 94, Iss. 4, pp. 550–557.

14. Konechna R., Khropot O., Petrina R., Gubriy Z., Novikov V. (2017). Research of antioxidant properties of extracts of the plants and the callus biomass. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 10(7), pp. 182–185.

15. Skira A. R., Yaremkevych O. S., Zayarnyuk N. L., Kurka M. S. (2020). Research of antioxidant properties of grape marc extracts as perspective pharmaceutical and cosmetic products. *Chemistry, technology and application of substances*;Vol. 3, Number 2: 79–84. DOI: https://doi.org/10.23939/ctas2020.02.079

V. R. Karpiuk[1], I. Ya. Hnativ[2], I. I. Hubytska[1], L. D. Bolibrukh[1], Izabela Jasicka-Misiak[3], R. T. Konechna[1]

[1] Lviv Polytechnic National University, Department of Technology of Biologically Active Substances, Pharmacy and Biotechnology,

[2] JSC "Halychpharm",

[3] University of Opole, Opole, Poland

THE STUDY OF THE COMPOSITION OF CHLOROFORM FRACTION OF *RANUNCULUS ACRIS L.*

The results of the study of the chloroform extract of the herb *Ranunculus acris L.* are presented, in particular the content of biologically active substances and antioxidant activity. 33 volatile compounds were identified: fatty acid esters, higher fatty acids, saturated hydrocarbons (alkanes), monocyclic and bicyclic monoterpenoids, etc. It was established that the chloroform extract has an antioxidant effect. In addition, the significant content of biologically active substances in the lipophilic volatile fraction of *Ranunculus acris L.* indicates the prospects for further research.

Key words: chloroform extract; biologically active substances; *Ranunculus acris L.*; antioxidant effect.