

ДОСЛІДЖЕННЯ КОМПОНЕНТНОГО СКЛАДУ ЕКСТРАКТУ КОЗЛЯТНИКА ЛІКАРСЬКОГО

М. Хохла, Г. Клевета, М. Лупак, О. Канюка, Я. Чайка, М. Скибіцька, Н. Сибірна

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: khmarija@gmail.com*

Методом хромато-маспектрометрії досліджено вміст окремих компонентів хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського (*Galega officinalis* L.). У результаті дослідження виявлено 31 сполуку, з них ідентифіковано 26 сполук. Серед них вищі жирні кислоти і їхні ефіри, дитерпени, тритерпени, фітостероли та флавоноїди. Встановлено, що домінуючими компонентами є жирні кислоти, основну частину з яких становлять етиловий естер пальмітинової кислоти і метиловий ефір ліноленової кислоти. Ідентифіковані біологічно активні речовини, виділені з екстракту, дають підстави припустити, що його цукрознижувальна дія зумовлена присутністю фітолу, етилового естеру пальмітинової кислоти, фітостеролів (кампестеролу і стигмастеролу) й α -амірину.

Ключові слова: козлятник лікарський, хлороформна фракція, цукровий діабет, цукрознижувальна дія.

До основних принципів лікування цукрового діабету належать фізичні навантаження, що зменшують рівень гіперглікемії та підвищують чутливість м'язової тканини до інсуліну, дієтотерапію як засіб обмеження надходження вуглеводів, інсулінотерапію як замісну форму, а також гіпоглікемічні пероральні засоби [4]. Важливе місце у фармакотерапевтичному комплексі лікування цієї патології займає і фітотерапія. Лікарські рослини становлять особливу групу об'єктів дослідження, які мають високу біологічну активність і містять складний комплекс хімічних сполук, що виявляють багатогранний вплив на організм людини.

Galega officinalis (козлятник лікарський, козлятник звичайний, галега лікарська, рутавка лікарська, рутівка) – багаторічна трав'яна рослина з родини бобових (Fabaceae), використовується у нетрадиційній медицині для лікування цукрового діабету. У Болгарії, Великобританії та США є офіційною рослиною, що застосовується при легких формах діабету. З лікувальною метою використовують траву, а також насіння при повному його досягненні. Траву збирають під час цвітіння рослини, зрізуючи верхні трав'яні частини.

Гіпоглікемічний ефект козлятника лікарського встановлено ще у 1927 р., проте літературні дані про цукрознижувальну дію трави і насіння даного виду суперечливі. Раніше вважали, що гіпоглікемічний ефект притаманний власне алкалоїдам [7, 9, 12]. Основний алкалоїд (галегін) за своєю хімічною будовою та фармакологічною активністю є аналогом протидіабетичних препаратів ряду бігуаніду (глібутид, метформін та ін.). Однак ці висновки базувалися на дослідженні екстракту, який містить алкалоїди у високій концентрації, що зумовлює його токсичність. Водночас привертають увагу літературні дані, в яких вказується про те, що цукрознижувальним ефектом володіє безалкалоїдна фракція екстракту даної рослини [2, 3]. Неоднозначний характер даних літератури вказує на необхідність більш детального дослідження біологічно активних речовин козлятника лікарського з потенційними гіпоглікемічними властивостями.

Метою роботи було визначити кількісний і якісний склад біологічно активних речовин козлятника лікарського, для обґрунтування цукрознижувальної дії безалкалоїдної фракції екстракту досліджуваної лікарської рослини.

Матеріали та методи

Для дослідження використовували надземну частину козлятника лікарського з колекції ботанічного саду Львівського національного університету імені Івана Франка, зібрану в період цвітіння.

Екстракт козлятника лікарського отримували шляхом настоювання 30 г подрібненої надземної частини рослини у 96% етиловому спирті (підкисленому 0,1 н хлоридною кислотою до рН 2) упродовж 12 год у співвідношенні 1:5 при кімнатній температурі та упарювали у вакуумі за допомогою роторного випарювача LABOROTA 400 (Heidolph, Німеччина) при температурі +50...+55°C до одержання густого залишку екстракту. До максимального упареного етанольного екстракту масою 14 г додавали 9 мл H₂O (до отримання однорідної маси) та 9 мл хлороформу. Після перемішування (10 хв) зразки центрифугували впродовж 10 хв при 1500 об/хв. Одержані фракції: 1 – водну (темно-коричневого забарвлення) і 2 – хлороформну (темно-зеленого забарвлення) упарювали у вакуумі при температурі +40...+50°C до одержання сухого залишку відповідно масою 3–3,5 г та 1–1,5 г.

Для первинної характеристики водної та хлороформної фракції отриманого екстракту проводили якісні реакції [6].

Органолептичні та фізико-хімічні показники екстракту (опис, розчинність, сухий залишок, втрата в масі при висушуванні) нами було визначено за загальновідомими методиками згідно з Державною Фармакопеєю України [1].

Компонентний склад речовин хлороформної фракції визначали за допомогою хроматографа Agilent Technology 6890N з маспектрометричним детектором 5979B. Умови аналізу: хроматографічна колонка капілярна HP-5MS довжиною 30 м і внутрішнім діаметром 250 мкм, фазою 0,25 мкм. Гелій використовували як газ-носії при постійній швидкості потоку 1,5 мл/хв і об'ємі проби 1 мкл. Інжектор – автоінжектор 7683B, Split 20:1, температура випарювача 250°C. Температуру термостату програмували від 75°C (протягом 2 хв) з нагріванням 15°C/хв до 300°C (протягом 9 хв). Детектор маселективний, температура інтерфейса 280°C, іонізація – електронним ударом, енергія іонізації 70eV, температура іонного джерела 230°C, температура квадруполя 150°C. Загальна тривалість газової хроматографії 24 хв. Відносну кількість процентного вмісту кожного компонента розраховували шляхом порівняння його середньої площі піку до загальної площі. Ідентифікацію здійснювали на основі порівняння маспектрів з даними маспектральних бібліотек NIST05a та WILEY із загальною кількістю спектрів понад 470 000.

Результати і їхнє обговорення

Для первинної характеристики водної та хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського було проведено низку якісних реакцій, за допомогою яких підтверджено наявність алкалоїдів, флавоноїдів, тритерпенових сапонінів і амінокислот у складі водної фракції та флавоноїдів і тритерпенових сапонінів у хлороформній фракції. Слід зазначити, що у хлороформній фракції нами не виявлено алкалоїдів (табл. 1).

Зважаючи на наявність алкалоїдів у складі водної фракції екстракту досліджуваної рослини, які зумовлюють його високу токсичність, детального фітохімічного аналізу її складу не проводили, натомість було досліджено компонентний склад хлороформної фракції, яка не містила алкалоїдів.

Хлороформна фракція екстракту козлятника лікарського є в'язкою мазеподібною масою темно-зеленого кольору з приємним запахом, гіркуватою на смак, добре розчинною

в метиловому й етиловому спирті, нерозчинною в олії, у воді утворює темно-зелену суспензію, яка після струшування зберігає однорідність не менше 60 хв. Сухий залишок становив $26,17 \pm 0,05\%$, а втрата в масі при висушуванні – $5,09 \pm 0,03\%$.

Таблиця 1

Якісний аналіз біологічно активних речовин водної та хлороформної фракцій екстракту козлятника лікарського

Біологічно активні речовини	Якісні реакції	Екстракт козлятника лікарського	
		Водна фракція	Хлороформна фракція
Алкалоїди	Загальноосадові реакції з використанням реактивів: Майєра, Драгендорфа, Бушарда, Зоненштейна	+	–
Флавоноїди	Реакція з плюмбум ацетатом і борно-лимоннокислим реактивом	+	+
Тритерпенові сапоніни	Реакція піноутворення	+	+
Стероїдні сапоніни	Реакція осадження холестеролу	–	–
Амінокислоти	Реакція з нінгідриновим реагентом	+	–

У результаті проведеного газохроматографічного визначення складу досліджуваного екстракту було виявлено 31 компонент. Більша частина виявлених компонентів була ідентифікована і представлена в табл. 2.

У хлороформній фракції екстракту козлятника лікарського було показано присутність ароматичної сполуки – інозитулу (2,08%), естеру ароматичної дикарбонової кислоти, а саме 2-етилгексил ізогексильовий естер фталевої кислоти (8,33%). Було виявлено значну кількість жирних кислот і їхніх ефірів, серед них насичені жирні кислоти: міристинова кислота (0,74%), етиловий естер пальмітинової кислоти (17,59%), стеаринова кислота (1,67%), етиловий естер нонанової кислоти (1,28%) та метиловий ефір ліноленової кислоти (17,82%). Також був ідентифікований спирт 9,12,15-октадекатрієн-1-ол, кількість якого становила 1,52%.

Серед терпенів у екстракті козлятника лікарського наявні дитерпени: неофітадієн (2,54%) і фітол (3,62%) та тритерпени: сквалєн (1,67%) і α -амірин (5,74%). Було показано присутність флавоноїдів: 3-(2,4-диметоксифеніл)-3,4-дигідро-2Н-1-бензопіран-7-ол (1,88%) та 6а,12а-дигідро-6Н-(1,3)діоксол(5,6)бензофу(3,2-с)хромен-3-ол (1,01%). Також встановлено наявність таких фітостеролів, як кампестерол (1,98%), стигмастерол (15,69%) та 4,14,-диметил-, (3 β ,4 α ,5 α .)-9,19-циклоергост-24(28)-єн-3-ол (1,92%). Окрім цього, було ідентифіковано невелику кількість ейкозану (0,62%) та вітаміну Е (0,66%) (рис. 1).

Методом хромато-маспектрометрії визначено компонентний склад сполук хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського та виявлено 31 сполуку, з них ідентифіковано 26. Серед них вищі жирні кислоти і їхні ефіри (39,10% від суми усіх сполук), дитерпени (6,16%), тритерпени (7,41%), фітостероли (19,59%) та флавоноїди (2,89%). Встановлено, що домінуючими компонентами є жирні кислоти, основну частину з яких становлять етиловий естер пальмітинової кислоти і метиловий ефір ліноленової кислоти.

З літературних даних відомо, що фітол здатний знижувати інсулінорезистентність і регулювати метаболічні розлади, що супроводжують діабет шляхом активації RXR (retinoid X receptor), що призводить до посилення експресії гена GLUT2 та мРНК глюкокінази, а також полегшення поглинання глюкози печінкою. Крім цього, фітол здатний впливати на профіль глюкози, знижуючи глюконеогенез і пригнічуючи синтез глюкози в

печінці, а також, мобілізуючи ліпіди м'язів, зумовлює підвищення чутливості м'язів до інсуліну [8]. Показано, що жирні кислоти, а саме пальмітинова кислота, викликає дозозалежне зниження глюкози в плазмі крові у тварин з експериментальним цукровим діабетом [14], а фітостероли, окрім здатності інгібувати адсорбцію холестеролу, здатні знижувати рівень глікозильованого гемоглобіну [11, 15]. Нещодавніми дослідженнями встановлено гіпоглікемічну активність α - та β -аміринів, яку пов'язують з їхнім впливом на систему канабіноїдів. Показано, що деякі ліганди до канабіноїдних рецепторів CB1 можуть прямо зв'язуватись і алостерично регулювати Kir6.2/SUR1 K(ATP)канали, тим самим контролюючи глюкозостимульоване вивільнення інсуліну. Крім цього, α - та β -амірин, завдяки своїм протизапальним і антиоксидантним властивостям, виявляють позитивний вплив на стан тварин зі стрептозотоциновим цукровим діабетом [13].

Таблиця 2

Якісний склад і кількісний вміст біологічно активних речовин
хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського

№ п/п	Час виходу, хв	Сполука	Вміст, %	Ступінь достовірності, %
1.	10,186	Не ідентифікована	5,24	>50
2.	10,222	Інозитол	2,08	58
3.	10,638	Міристинова кислота	0,74	99
4.	11,215	Неофітадієн	0,83	98
5.	11,251	2-Пентадеканон, 6,10,14 -триметил	0,58	64
6.	12,053	Пальмітинова кислота, етиловий естер	15,79	99
7.	12,232	Пальмітинова кислота, етиловий естер	0,85	97
8.	12,642	Не ідентифікована	2,06	>50
9.	12,999	Фітол	3,62	83
10.	13,201	9,12,15-Ліноленова кислота, метиловий ефір	17,82	91
11.	13,290	Стеаринова кислота	1,67	99
12.	13,332	9,12,15-Октадекатрієн-1-ол, (Z,Z,Z)-	1,52	94
13.	15,151	Не ідентифікована	0,66	>50
14.	15,235	Пальмітинова кислота, 2-гідрокси-1-(гідроксиметил) етиловий естер	0,95	83
15.	15,455	Фталєва кислота, 2-етилгексил ізогексильовий естер	8,33	72
16.	16,085	2Н-1-Бензопіран-7-ол, 3-(2,4- диметоксифеніл)-3,4-дигідро-	1,88	93
17.	16,162	Ейкозан	0,83	86
18.	16,198	Нонанова кислота, 9-(3-гексенілденциклопропілідєн),- 2-гідрокси-1-(гідроксиметил)етиловий естер (Z,Z,Z)-	1,28	91
19.	16,287	6а,12а-Дигідро-6Н-(1,3)діоксол(5,6)бензофу(3,2-с)хромен-3-ол	1,01	94
20.	16,691	Не ідентифікована	0,89	>50
21.	16,816	Сквалєн	1,67	96
22.	17,102	Ейкозан	0,62	90
23.	18,499	Вітамін Е	0,66	96
24.	19,278	Кампєстерол	1,98	99
25.	19,522	Стигмастерол	4,06	96
26.	20,015	Стигмастерол	11,63	99
27.	20,390	α -Амірин	3,18	90
28.	20,705	9,19-Циклоєргост-24(28)-єн-3-ол, 4,14,-диметил-, (3.бєта.,4.альфа.,5.альфа.) -	1,92	86
29.	20,824	α -Амірин	2,56	96
30.	21,317	Не ідентифікована	1,38	>50
31.	22,197	Неофітадієн	1,71	91

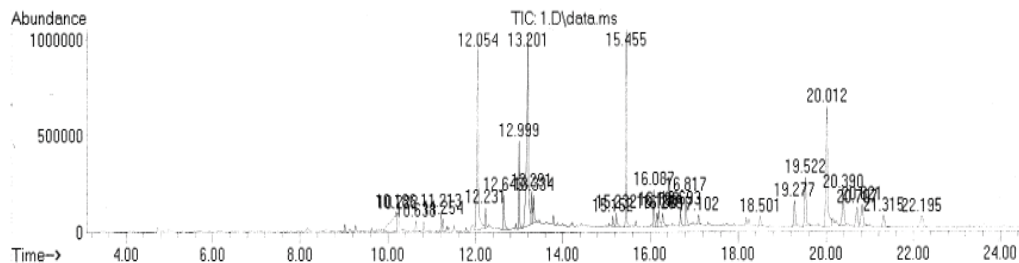


Рис. 1. Хромотограма компонентів хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського.

На основі аналізу якісного та кількісного складу біологічно активних речовин хлороформної фракції екстракту козлятника лікарського можна стверджувати, що її цукрознижувальний ефект, який було показано у наших попередніх дослідженнях [5], зумовлений присутністю фітолу, етилового естеру пальмїтинової кислоти, фітостеролів (кампестеролу та стигмастеролу) й α -амірину, або їхньою синергічною дією.

Робота виконана за підтримки Державного фонду фундаментальних досліджень України (проект № Ф54.4/017).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-ше вид. Х.: РІПЕГ, 2001. 556 с.
2. Липиніна Л. А., Сисоєва Т. Ф. Цукрознижувача властивість козлятника лікарського // Фармацевт. журнал. 1961. № 5. С. 52–56.
3. Липиніна Л. А. Выделение и изучение физиологически активных соединений галеги лекарственной как сырья для получения сахароснижающего препарата: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Х., 1972. 15 с.
4. Мерецький В. М. Фітотерапевтичні аспекти лікування цукрового діабету // Фітотерапія: часопис. 2006. № 1. С. 6–10.
5. Хохла М. Р., Клевета Г. Я., Чайка Я. П. та ін. Цитологічна та біохімічна характеристика периферичної крові щурів за умов експериментального цукрового діабету 1-го типу та введення галеги лікарської // Біологічні студії. 2012. Т. 6. № 1. С. 37–46.
6. Шелудько В. М. Практичний посібник з фармакогнозії: фотохім. аналіз / В.М. Шелудько, Ю.І. Колесниченко. К.: Здоров'я, 1965. 198 с.
7. Baley J. C., Turner R. Metformin // The new England J. Med. 1996. Vol. 334. P. 574–579.
8. Elmazar M., El-Abhar H. S., Schaalaa M. F., Farag N. A. Phytol/phytanic acid and insulin resistance: potential role of phytanic acid proven by docking simulation and modulation of biochemical alterations // PLoS ONE. 2013. Vol. 8(1). P. 1–10.
9. Gresham A. C. J., Booth K. Poisoning of sheep by goat's rue // Vet. Rec. 1991. Vol. 129. P. 197–198.
10. Haden G. Goat's rue – French lilac – Italic Fitch – Spanish scifoin: galega officinalis and metformin // Royal College of Edinburg. 2003. N 35. P. 258–260.
11. Lee Y. M., Haastert B., Scherbaum W., Hauner H. A phytosterol-enriched spread improves the lipid profile of subjects with type 2 diabetes mellitus. A randomized controlled trial under free-living conditions // Eur. J. Nutr. 2003. Vol. 42. P. 111–117.
12. Rasekh H. R., Nazari P., Kamli-Nejad M., Hosseinzadeh L. Acute and subchronic oral toxicity of *Galega officinalis* in rats // J. Ethnopharmacol. 2008. Vol. 116. P. 21–26.

13. Santos F. Al., Frota J. T., Arruda B. R. et al. Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of α , β -amyirin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice // *Lipids in Health and Disease*. 2012. Vol. 11 (98). P. 1–8.
14. Sarkodie J. A., Fleischer T. C., Edoh D. A. et al. Antihyperglycaemic activity of ethanolic extract of the stem of *Adenia lobata* Engl (Passifloraceae) // *Int. J. Pharmaceutical Sciences and Research*. 2013. Vol. 4(4). P. 1370–1377.
15. Tanaka M., Misawa E., Ito Y. et al. Identification of five phytosterols from Aloe vera gel as anti-diabetic compounds // *Biol. Pharm. Bull.* 2006. Vol. 29(7). P. 1418–1422.

Стаття: надійшла до редакції 28.02.13

прийнята до друку 14.05.13

STUDIES OF *GALEGA OFFICINALIS* EXTRACT COMPONENT

**M. Khokhla, G. Kleveta, M. Lupak, O.P. Kaniuka,
Ya. Chajka, M. Skybitska, N. Sybirna**

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiy St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: khmarija@gmail.com*

Study the composition of *Galega officinalis* extract chloroform fraction has been performed by the method of chromatography-mass spectrometry. In the current study was revealed 29 compounds from which were identified fatty acids and their esters, diterpenes, triterpenes, phytosterols and flavanoids. The prevailing content of palmitic acid ethyl ester and linolenic acid methyl ester in the chloroform fraction has been established. Hypoglycemic effect of the test extract may be due to the presence phytol, palmitic acid ethyl ester, phytosterols (campesterol and stigmaterol) and α -amyirin.

Keywords: Galega officinalis, diabetes mellitus, chloroform fraction, hypoglycemic effect.

ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ЭКСТРАКТА ГАЛЕГИ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

**М. Хохла, Г. Клевета, М. Лупак, О.П. Каниука,
Я. Чайка, М. Скибицкая, Н. Сибирная**

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: khmarija@gmail.com*

Методом хромато-масспектрометрии исследовано содержание отдельных компонентов хлороформной фракции экстракта галеги лекарственной. В результате исследования выявлено и установлено содержание 26 соединений. Среди них высшие жирные кислоты, а также их эфиры, дитерпены, тритерпены, фитостеролы и флавоноиды. Установлено, что доминирующими компонентами являются жирные кислоты, основную часть из которых составляют этиловый эфир пальмитиновой кислоты и метиловый эфир линоленовой кислота. Сахароснижающее действие исследуемого экстракта может быть обусловлено присутствием фитола, этилового эфира пальмитиновой кислоты, фитостеролов (кампестерол и стигмастерол) и α -амирина.

Ключевые слова: галега лекарственная, хлороформная фракция, сахарный диабет, сахароснижающее действие.