

**Петріна Р.О.**

Національний університет «Львівська політехніка»

**Загородня Д.С.**

Національний університет «Львівська політехніка»

**Хом'як С.В.**

Національний університет «Львівська політехніка»

**Новіков В.П.**

Національний університет «Львівська політехніка»

## ВТОРИННІ МЕТАБОЛІТИ ЕКСТРАКТІВ КАЛУСНОЇ БІОМАСИ *DELPHINIUM ELATUM*

У статті досліджуються екстракти калусної біомаси *Delphinium elatum* на вміст вторинних метаболітів. Проведено якісні реакції етанольних екстрактів калусної біомаси *D. elatum* на наявність алкалоїдів та отримано позитивні осадкові та кольорові реакції, які підтверджують наявність алкалоїдів у калусній біомасі рослини. Одержано екстракти з п'ятьма різними за полярністю екстрагентами: вода, етанол, етилацетат, ацетон, петролейних етер. Визначено вихід екстракту, отриманого з 10 г сухої калусної біомаси. Найвищий вихід отримано з використанням води та етанолу в якості екстракційних розчинників.

За допомогою спектрофотометричного методу кількісно визначено в екстрактах наявність фенольних сполук і флавоноїдів. Фенольні сполуки в досліджуваних екстрактах калусної біомаси *D. elatum* визначали з використанням реагенту Фоліна-Чекольтеу та виражали у вигляді еквіваленту галової кислоти (мгГК/г екстракту). Найвищий вихід фенольних сполук одержано в полярних розчинниках: етанольних, ацетонових і водних – 25,61; 23,54; 22,94 мгГК/г екстракту. Вміст флавоноїдів в досліджуваних екстрактах визначали за допомогою спектрофотометричного методу з хлоридом алюмінію та виражали в еквіваленті рутину (мгРВ/г екстракту). Найвищий вихід флавоноїдів одержано в етанольних, ацетонових і етилацетатних екстрактах (28,45; 28,14; 26,42 мгРВ/г екстракту).

Також визначено антиоксидантну активність одержаних екстрактів за допомогою методу з використанням етанольного розчину стійкого вільного радикалу DPPH (1,1-дифеніл-2-пікрилгідразилу). Антиоксидантна активність виражається у відсотках інгібування (%) та значеннях IC50 (мкг/мл). Отримані значення були в межах від 21,15% до 86,28%. Найвищі значення антиоксидантної активності одержано в етанольному екстракті, який нейтралізував 50% вільних радикалів при концентрації 175,84 мкг/мл. Для ацетонових, водних та етилацетатних екстрактів виявлено помірну активність. Найменша здатність до інгібування радикалів DPPH була визначена для екстракту петролейного етеру. Виявлено значну лінійну кореляцію між значеннями концентрації фенольних сполук і флавоноїдів та антиоксидантною активністю екстрактів *D. elatum*. Антиоксидантна активність збільшується при збільшенні вмісту фенольних сполук і флавоноїдів.

Подальші дослідження калусної біомаси *D. elatum* дозволять використовувати цю рослину як перспективне джерело природних біологічно активних сполук для розробки натуральних фармацевтичних продуктів, які мають високу цінність.

**Ключові слова:** *Delphinium elatum*, калусна біомаса, *in vitro*, алкалоїди, фенольні сполуки, флавоноїди, антиоксидантна активність.

**Постановка проблеми.** Лікарські рослини як і препарати на їх основі набувають все більшої популярності. Вторинні метаболіти, які у відповідних кількостях містяться в рослинах, дають їм можливість доповнювати або навіть замінити хімічно-синтезовані речовини.

Рослина *Delphinium elatum* належить до роду *Delphinium* родини Жовтецевих (*Ranunculaceae*). Родина налічує більше 50 родів та близько 1500-2500 видів трав'яних рослин, поширених по всьому світу. Серед них є багато отруйних рослин, які в малих дозах можуть бути терапевтичними,

жодна з рослин не використовується в їжу, більшість представників є багатими на вторинні метаболіти та володіють низкою активностей. На території України зростає 152 види рослин цієї родини, які належать до 25 родів. Рід *Delphinium* представлений у флорі України 8 видами, до Червоного списку МСОП включено 3 види: *D. caseyi*, *D. iris*, *D. munzianum* [1], до Червоної книги України – 5 видів: *D. elatum* L., *D. pallasii* Nevski, *D. rossicum* Litv., *D. sergeii* Wissjul, *D. puniceum* Pall [2].

*D. elatum* – багаторічна рослина, яка росте в Карпатах. Цьому виду мало приділяється уваги, окрім деяких фітохімічних досліджень, зроблених у роботах [3–5], де описано виділення дитерпенових алкалоїдів і флаваноїдів, які мають широкий спектр біологічної дії, що робить *D. elatum* цікавими для використання в фармації, біотехнології, косметології, ветеринарії.

Дитерпенові алкалоїди мають протизапальну, протипухлинну, антимікробну, анальгетичну, кардіологічну, курареподібну та антиаритмічну активність; фенольні сполуки та флавоноїди – антибактеріальну, антигрибкову, імуностимулюючу, анальгетичну, антиоксидантну. Рослину *D. elatum* використовують у народній медицині для лікування порушень кровообігу, кишкових паразитів, виразок та отруєнь від укусів змій. Оскільки *D. elatum* володіє лікарськими властивостями, цікавим є й ідентифікація вторинних метаболітів. Рослина вважається рідкісною і занесена до Червоної книги України, тому доцільним є її культивування в умовах *in vitro* з метою збереження популяції.

У роботі викладено дослідження ідентифікації алкалоїдів, загальних фенолів, флавоноїдів і визначення антиоксидантної активності у водних, етанольних, етилацетатних, ацетонових і петролейнофірних екстрактах калусної біомаси *D. elatum*.

**Аналіз останніх досліджень і публікацій.** З літератури відомо, що рослини роду *Delphinium* містять різноманітні вторинні метаболіти. Так, всі частини рослини містять дитерпенові алкалоїди, третинні аміни. Загальний вміст алкалоїдів у коренях досягає 4%, в насінні – 2,5%, в листі – 1,3%. Головний алкалоїд – елатин, вміст якого становить приблизно третину від загальної кількості інших алкалоїдів рослини [6]. Також в літературі описано виділення з рослини *D. elatum* дитерпенових алкалоїдів (елатин, дельсемін, делартин, кондельфін, камферол) і флаваноїдів (кварцетин, кварцетин 3-О-β-D-глюкопіранозид, кварцетин 3-О-β-D-глюкопіранозид-7-О-α-L-арабінопіранозид) [3–5].

Описано ідентифікацію шести нових С19 нетерпеноїдних алкалоїдів з *Delphinium elatum* сорту *Pacific Giant*: н-форміл-4,19-секопацинін, імідоізодельфелін, імідопацилін, 6-дегідроеладин і елапацидин [4]. Визначено, що декілька дитерпеноїдних алкалоїдів з *Delphinium elatum* сорту *Pacific Giant* і їхні похідні мають цитотоксичні властивості проти ракових клітин легень, простати, носоглотки і вінкрисдин-резистентних ракових клітин носоглотки. Фітохімічні дослідження насіння *D. elatum* сорту *Pacific Giant* призвели до ізолювання чотирьох нових С19-дитерпеноїдних алкалоїдів: мелфелін, 19-оксоізодельфелін, Н-деетил-19-оксоізодельфелін, деетил-19-оксодельфелін [5].

При виділенні алкалоїдів і терпеноїдів використовують хроматографію. Прикладом є робота [6]. Це дослідження було проведене для визначення хімічних складників *D. caeruleum*. Вони були ізолювані та очищені колонною хроматографією на силікагелі, ODS і Sephadex LH-20. Їхню будову було визначено за допомогою інфрачервоної спектроскопії, мас-спектрометрії та ядерного магнітного резонансу. Десять сполук було отримано й ідентифіковано як керудельфінін А, лікоктонін, талітин Б, талітин А, талатин С, татсієнін-В, д-магнофлорин, 2-(триметиламоній)-3-(3-індоліл)пропіонат, вакхматин, делатизин.

Що цікаво, С19-дитерпенові алкалоїди, описані в цій роботі, були раніше виявлені у *D. elatum*, *D. barbeyi* та *D. caeruleum*. Це вказує на фітохімічну подібність цих видів рослин до *D. albocoeeruleum Maxim*. С19-дитерпенові алкалоїди можна вважати хіміко-таксономічним маркером роду *Delphinium*, адже вони присутні в *D. elatum*, *D. barbeyi*, *D. tatsinenense* і *D. giraldii*. Крім цього, їх присутність можна використовувати для ідентифікації *D. albocoeeruleum Maxim*.

Вивчення рослин роду *Delphinium* продовжується, і науковці представляють нові сполуки алкалоїдного і терпеноїдного походження. Більшість опублікованих наукових робіт щодо рослин роду *Delphinium* зроблені в Азії, що пояснюється ареалом поширення. Відсутність досліджень в Україні ймовірно спричинене тим, що *D. elatum* є рідкісним в Україні. Тому одержання біомаси рослини в умовах *in vitro* дозволяє працювати з рослиною, не впливаючи на її різноманіття в природі.

**Постановка завдання.** В основу роботи покладено дослідження екстрактів калусної біомаси *D. elatum* на вміст загальних фенолів, флавоноїдів і дитерпенових алкалоїдів при використанні різних екстрагентів та їх порівняльна характеристика.

**Виклад основного матеріалу дослідження.** Для експерименту використано калусну біомасу *D. elatum*, одержану в умовах *in vitro* на живильному середовищі Мурасиге-Скуга, доповненому регуляторами росту: 1,0 мг/л  $\alpha$ -нафтил-1-оцтової кислоти, 2,0 мг/л індолілоцтової кислоти, 0,5 мг/л 6-фурфуріламінопурина. Культивування проведено з фотоперіодом 16/8 год. (світло / темрява), освітленням 2000 лк, температурою  $26^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ , відносною вологістю 60-70% протягом 50 діб [7].

Екстракти калусної біомаси *D. elatum* отримано методом настоювання протягом 7 діб при кімнатній температурі з використанням як екстрагента 70%-го етанолу, етилацетату, ацетону, петролейного етеру. Водний розчин отримано при кип'ятінні сировини з дистильованою водою протягом 1 год. і перемішуванні. Співвідношення сировини: екстрагент – 1:10 (10 г калусної біомаси: 100 мл екстрагента). Тип екстрагенту впливає не тільки на екстрагування певної групи речовин, але й загальна кількість речовин залежить від гідрофільності екстрагенту.

Ідентифікацію алкалоїдів проведено за допомогою якісних реакцій із використанням етанольних розчинів калусної біомаси *D. elatum*. Є кілька загальних реакцій, які можуть бути використані для перевірки наявності алкалоїдів чи допомогти в їх ідентифікації. Вони включають в себе реакції осадження та реакції забарвлення.

З можливих осадкових реактивів, які найчастіше використовуються для визначення алкалоїдів, автори обрали реактив Майєра (розчин меркурію дихлориду та калію йодиду); реактив Вагнера та Бушарда (калію трійодид); реактив Шейблера (розчин кислоти фосфорновольфрамної) та реактив Хагера (насичений розчин кислоти пікринової). Всі використані реагенти дали з досліджуваними екстрактами позитивні осадкові реакції.

Кольорові реакції є неспецифічними, але вони часто дуже чутливі й зазвичай залежать від дегідратації або окиснення алкалоїдів з утворенням характерного кольору. Для кольорових реакцій використано реактив Фреде (розчин амонію молібдату в кислоті сульфатній) і реактив Маркі (формальдегід, кислота сульфатна). Всі проведені реакції дали з досліджуваними екстрактами позитивні кольорові реакції.

У водних, метанольних, етилацетатних, ацетонових і петролейнофірних екстрактах спочатку визначали вихід екстракту, отриманого з 10 г сухої калусної біомаси, вимірювали для кожного екстракту (Табл. 1). Найвищий вихід твердого

залишку був отриманий із використанням води або етанолу в якості екстракційних розчинників.

Таблиця 1

**Вміст сухого залишку після екстракції і випарювання з 10 г сухої калусної біомаси *D. elatum***

Екстрагент	Вміст <sup>1</sup> , г
Етанол	2,25±0,073
Вода	1,86±0,045
Етилацетат	0,54±0,038
Ацетон	0,28±0,092
Петролейний етер	0,12±0,028

<sup>1</sup>Кожне значення – це середнє значення трьох вимірювань  $\pm$  стандартне відхилення

Отримано результати вмісту фенольних сполук у досліджуваних екстрактах калусної біомаси з використанням реагенту Фоїна-Чекольтеу, виражене у вигляді еквіваленту галової кислоти (ГК) (стандартне рівняння кривої  $y = 7.026x - 0.0191$ ,  $r^2 = 0.999$ ). Значення, отримані для вмісту загальних фенолів, виражаються у мг ГК/г екстракту (Табл. 2). Загальний фенольний вміст у досліджуваних екстрактах становив від 13,42 до 25,61 мг ГК/г.

Найвища концентрація фенолів була в етанольних, ацетонових і водних екстрактах. Екстракти етилацетату та петролейного етеру містять значно меншу концентрацію фенолів. Загальний вміст фенольних сполук в рослинних екстрактах *D. elatum* залежить від полярності розчинника, який використовується при екстракції. Висока розчинність фенолів у полярних розчинниках забезпечує високу концентрацію цих сполук в екстрактах, отриманих із використанням полярних розчинників для екстракції.

Таблиця 2

**Загальний фенольний вміст в екстрактах *D. elatum*, виражений в еквіваленті галової кислоти (мг ГК/г екстракту)**

Екстрагент	мг ГК/г екстракту <sup>1</sup>
Етанол	25,61±0,524
Вода	22,94±0,363
Етилацетат	16,66±0,812
Ацетон	23,54±0,516
Петролейний етер	13,42±0,196

<sup>1</sup>Кожне значення – це середнє значення трьох вимірювань  $\pm$  стандартне відхилення

Отримано результати вмісту флавоноїдів у досліджуваних екстрактах, визначених за допомогою спектрофотометричного методу з хлоридом алюмінію (Табл. 3).

Таблиця 3

**Концентрація флавоноїдів в екстрактах  
*D. elatum*, виражена в еквіваленті рутину  
(мг РУ/г екстракту)**

Екстрагент	мг РУ/г екстракту <sup>1</sup>
Етанол	28,45±0,489
Вода	5,14±0,275
Етилацетат	26,42±0,784
Ацетон	28,14±0,327
Петролейний етер	9,23±0,547

<sup>1</sup>Кожне значення – це середнє значення трьох вимірювань ± стандартне відхилення

Вміст флавоноїдів виражали в еквіваленті рутину (стандартне рівняння кривої  $y = 17.231x - 0.0591$ ,  $r^2 = 0.999$ ), мг РУ/г екстракту (Табл. 3). Вміст флавоноїдів в рослинних екстрактах *D. elatum* становив від 5,14 до 28,45 мг/г. Етанольні, ацетонові та етилацетатні екстракти містять найвищу концентрацію флавоноїдів. Концентрація флавоноїдів в екстракті етанолу становила 28,45 мг РУ/г, що було дуже схоже на значення концентрації екстракту ацетону. Найнижчу концентрацію флавоноїдів вимірювали в петролейному етері та водних екстрактах. Концентрація флавоноїдів у рослинних екстрактах залежить від полярності розчинників, які використовуються для приготування екстрактів.

Антиоксидантну активність (далі – АОА) досліджуваних рослинних екстрактів *D. elatum* визначали за допомогою етанольного розчину реагенту 1,1-дифеніл-2-пікрілгідразу (DPPH), стійкого вільного радикалу. Свіжоприготований розчин DPPH має глибокий фіолетовий колір із максимумом поглинання при 517 нм. Цей фіолетовий колір здебільшого знебарвлюється, коли молекули антиоксидантів гасять вільні радикали DPPH (забезпечуючи атоми воднем або донором електронів, можливо, шляхом вільнорадикальної атаки на молекулу DPPH) і перетворюють їх у безбарвний / вибілений продукт (тобто 2,2-дифеніл-1-гідразин або заміщений аналогічний гідразин), що призводить до зниження абсорбції в діапазоні 517 нм. АОА п'яти досліджуваних екстрактів *D. elatum* виражається у відсотках інгібування (%) та значеннях IC50 (мкг/мл). Паралельно з вивченням АОА екстрактів калусної біомаси *D. elatum* було отримано значення для двох стандартних сполук і порівняно зі значеннями АОА. Стандарт-

ними речовинами використано аскорбінову кислоту та кварцетин, які мають 100% АОА.

Дослідження АОА екстрактів *D. elatum* показало різні значення. Отримані значення були в межах від 21,15% до 86,28%. Найбільша здатність до нейтралізації радикалів DPPH виявлена для етанольного екстракту, який нейтралізував 50% вільних радикалів при концентрації 175,84 мкг/мл. Для ацетонових, водних та етилацетатних екстрактів виявлено помірну активність. Найменша здатність до інгібування радикалів DPPH була визначена для екстракту петролейного етеру. Через низьку активність екстракту петролейного етеру IC50 для нього не розраховується. Порівняно зі значеннями IC50 аскорбінової кислоти та кварцетину етанольний екстракт *D. elatum* виявляв найсильнішу здатність до нейтралізації радикалів DPPH.

Екстрагування антиоксидантних речовин різної хімічної структури було досягнуто за допомогою розчинників різної полярності. Численні дослідження якісного складу рослинних екстрактів виявили наявність високих концентрацій фенолів в отриманих екстрактах із використанням полярних розчинників. Екстракти, які мають найвищу антиоксидантну активність, мають найбільшу концентрацію фенолів і флавоноїдів (Табл. 2, 3). Феноли є дуже важливими вторинними метаболітами рослин завдяки їх здатності до знищення вільних радикалів гідроксильними групами. Тому вміст фенолів і флавоноїдів у рослинах може безпосередньо сприяти їх антиоксидантній дії. Виявлено значну лінійну кореляцію між значеннями концентрації фенольних сполук і флавоноїдів (Табл. 2, 3) та антиоксидантною активністю екстрактів із *D. elatum*.

**Висновки.** Отримано та досліджено водні, етанольні, етилацетатні, ацетонові та петролейноетерні екстракти калусної біомаси *Delphinium elatum*. За допомогою якісних реакцій підтверджено наявність алкалоїдів у *D. elatum*. За допомогою спектрофотометричних досліджень підтверджено наявність фенольних сполук, флавоноїдів і визначено антиоксидантну активність. Проведено кореляцію між наявністю фенольних сполук та флавоноїдів і антиоксидантною активністю.

Подальші дослідження цієї рослини повинні бути спрямовані на проведення *in vivo* досліджень її лікарських активних компонентів з метою підготовки натуральних фармацевтичних продуктів, які мають високу цінність.

#### Список літератури:

1. Червоний список МСОП (IUCN Red List of Threatened Species).
2. Червона книга України. <https://redbook-ua.org/>.

3. Park J.C., Desai H.K., Pelletier S.W. Two new norditerpenoid alkaloids from *Delphinium elatum* var. "black night". *Journal of Natural Products*. 1995. V. 58(2). P. 291–295. doi:10.1021/np50116a024.
4. Wada K., Chiba R., Kanazawa R., Matsuoka K., Suzuki M., Ikuta M., Goto M., Yamashita H., Lee K.H. Six new norditerpenoid alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry Letters*. 2015. V. 12. P. 79–83. doi:10.1016/j.phytol.2015.02.010.
5. Wada K., Asakawa E., Tosho Y., Nakata A., Hasegawa Y., Kaneda K., Goto M., Yamashita H., Lee K.H. Four new diterpenoid alkaloids from *Delphinium elatum*. *Phytochemistry Letters*. 2016. V. 17. P. 190–193. doi:10.1016/j.phytol.2016.06.009.
6. Lin Ch.Z., Liu Z.J., Bairi Z.D., Zhu Ch.Ch. A new diterpenoid alkaloid isolated from *Delphinium caeruleum*. *Chinese journal of natural medicines*. 2017. V. 15(1). P. 45–48. doi: org/10.1016/S1875-5364(17)30007-9.
7. Петріна Р.О., Загородня Д.С., Шаповалов І.Ю., Федорова О.В., Новіков В.П. Одержання калусної біомаси *Delphinium elatum*. *PLANTA+*. *Досягнення та перспективи* : матеріали Міжнародної наук.-практ. конф., присвяченої пам'яті Н.П. Максютіної (Київ, 20-21 лютого 2020 р.). Київ : ПАЛІВОДА А.В., 2020. С. 326–328.

### **Petrina R.O., Zahorodnia D.S., Khomiak S.V., Novikov V.P. SECONDARY METABOLITES OF EXTRACTS OF CALLUS BIOMASS OF DELFINIUM ELATUM**

The article investigates the extracts of callus biomass *Delphinium elatum* for the content of secondary metabolites. Qualitative reactions of ethanolic extracts of callus biomass of *D. elatum* were carried out for the presence of alkaloids, and positive precipitation and color reactions were confirmed, which confirmed the presence of alkaloids in the callus biomass of the plant. Extracts were obtained with five different polarity extractants – water, ethanol, ethyl acetate, acetone, petroleum ethers. The yield of the extract obtained from 10 g of dry callus biomass was determined.

The highest yield was obtained using water and ethanol as extraction solvents. The presence of phenolic compounds and flavonoids was quantitatively determined in the extracts by the spectrophotometric method. The phenolic compounds in the studied callus biomass of *D. elatum* extracts were determined using a Folin-Cecolteu reagent and expressed as gallic acid equivalent (mgGA / g extract). The highest yield of phenolic compounds was obtained in polar solvents: ethanol, acetone and aqueous – 25.61; 23.54; 22.94 mgGA/g of the extract, respectively.

The content of flavonoids in the test extracts was determined by spectrophotometric method with aluminum chloride and expressed in the equivalent of rutin (mgRU/g of extract). The highest yield of flavonoids was obtained in ethanol, acetone and ethyl acetate extracts, 28.45; 28.14; 26.42 mgRU/g of the extract, respectively. The antioxidant activity of the obtained extracts was also determined by a method using an ethanolic solution of persistent free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Antioxidant activity is expressed in percent inhibition (%) and IC<sub>50</sub> values (mg/ml).

The resultants obtained were in the range from 21.15% to 86.28%. The resultants of antioxidant activity were obtained in ethanol extract, which neutralized 50% of free radicals at a concentration of 175.84 µg/ml. Moderate activity was found for acetone, aqueous and ethyl acetate extracts. The least ability to inhibit DPPH radicals was determined for the petroleum ether extract. A significant linear correlation was found between the concentration values of phenolic compounds and flavonoids and the antioxidant activity of *D. elatum* extracts.

Antioxidant activity is increased by increasing the content of phenolic compounds and flavonoids. Further studies on the callus biomass of *D. elatum* will allow the use of this plant as a promising source of naturally occurring biologically active compounds for the development of high value pharmaceutical natural products.

**Key words:** *Delphinium elatum*, callus biomass, in vitro, alkaloids, phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activities.