

ФІЗІОЛОГІЯ РОСЛИН

Науковий часопис Національного педагогічного університету імені М.П. Драгоманова.
Серія 20. Біологія. – 2013. – випуск 5. – С. 75 – 80

УДК: 615.(322+651.16)

Г.М. Клепач, І.В. Карп'як

Дрогобицький державний педагогічний
університет імені Івана Франка
вул. Шевченка, 23, м. Дрогобич, 82100

ДОСЛІДЖЕННЯ СПОСОБІВ ЕКСТРАКЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ІЗ ПИЖМИ ЗВИЧАЙНОЇ (*TANACETUM VULGARE L.*)

Tanacetum vulgare, екстракція, біологічно активні речовини, інсектицидна дія, *Drosophila melanogaster*.

Біологічно активні речовини (БАР) – це сполуки, які завдяки своїм фізико-хімічним властивостям мають певну специфічну активність, і можуть впливати, чи змінювати каталітичну, енергетичну, пластичну, регуляторну або іншу функцію в організмі [1]. БАР є незамінними активаторами, модуляторами чи каталізаторами багатьох біохімічних та фізіологічних процесів в організмі, деякі з них мають хелатуючі властивості, наприклад, антиоксиданти [2]. Серед них є такі, що мають заспокійливу, імуностимулюючу, імуномодулюючу, мікроцидну та ін. дію [3].

Порівняно дешевим та екологічно чистим джерелом БАР є рослинна сировина [4]. Основним процесом, що застосовується для отримання БАР з рослинної сировини, є екстрагування. До традиційних методів екстрагування БАР належить холодне пресування, гаряче пресування, водно-парова, водно-спиртова і масляна екстракція, екстрагування розчинниками [5]. Останніми роками теорія і практика процесу екстрагування поповнилася новими методами, до яких належать мікрохвильове вакуумне зневоднення (сушка), холодна вакуумно-сублімаційна сушка, кріодроблення і надкритична екстракція [6 – 10].

Серед широкого кола рослин вагомою є частка таких, які володіють віруцидними, бактерицидними чи інсектицидними властивостями. До рослин із заявленою інсектицидною дією відносять й *T. vulgare*. Згідно з даними літератури, у науковій медицині використовують кошики пижма – *flores tanacetii*. Препарати з них застосовують при хворобах печінки і кишківника, бронхіальній астмі, ревматизмі як глистогінний засіб тощо. У народній медицині застосовується також як глистогінний, шлунковий, жовчогінний, потогінний, протигарячковий засіб. Зовнішньо квітки пижма використовують для лікування ран, виразок тощо, для миття волосся при себорей.

У ветеринарії використовують як глистогінний засіб, при кривавій сечі у великої рогатої худоби. Є дані, що рослина пригнічує розвиток гнильних бактерій і бактерій, що викликають рак тютюну. Вважається, що фітонцидну і глистогінну дію обумовлює ефірна олія пижма, яка водночас є досить токсичною для людей і тварин [12].

Метою роботи було здійснити екстрагування БАР з *пижми звичайної* (*Tanacetum vulgare L.*) різними способами, порівняти їхню ефективність та оцінити біологічну активність отриманих екстрактів шляхом біотестування за використання *Drosophila melanogaster* як модельного об'єкта.

Матеріал та методика досліджень

Об'єкт досліджень. У роботі використовували сухі суцвіття *пижми звичайної* збору Фармацевтичної фабрики "Віола", а також сирі та сухі суцвіття, зібрані на території Дрогобиччини.

Отримання екстрактів. БАР з *пижми звичайної* отримували, здійснюючи водну та спиртово-водну екстракцію.

Водні екстракти *пижми* отримували наступним чином: до 5 г сухої (або 20 г сирі) подрібненої сировини вносили 100 мл гарячої дист. води (80 °С), витримували 1 год на водяній бані при температурі 60 °С та фільтрували.

Водно-спиртові екстракти *пижми* отримували наступним чином: до 5 г сухої (або 20 г сирі) подрібненої сировини вносили 100 мл 10 % (у другому варіанті досліджу – 20 %) розчину етанолу, витримували 1 год (у інших варіантах досліджу – 1 добу, 5 і 14 діб) у темряві при кімнатній температурі та фільтрували.

Для отримання екстрактів із еквівалентних кількостей сирі і сухої сировини *пижми звичайної*, враховували вміст вологи у суцвіттях, а тому масу сирі рослинної сировини відбирали для екстракції по відношенню до сухої як 5:1.

Фільтрування здійснювали через марлю, складену у 20 шарів, яку попередньо кип'ятили 1 год з трьохразовою зміною води.

Визначення оптичної густини екстрактів. Перебіг екстрагування БАР з *пижми звичайної* аналізували шляхом визначення мутності екстрактів упродовж 1 години (у випадку водної екстракції) або 14 діб (у випадку водно-спиртової екстракції). Мутність екстрактів визначали на фотоелектрокалориметрі КФК-2МП (РФ) при довжині хвилі 540 нм в 1-см кюветах проти контролю (контролем слугував екстрагент + вода, 10 % або 20 % розчин етанолу).

Визначення інсектицидної активності екстрактів. Біологічну (інсектицидну) активність водних екстрактів *T. vulgare* визначали за зниженням життєздатності личинок *Drosophila melanogaster* лабораторної лінії дикого типу *Oregon* згідно методики [11] у нашій модифікації.

Склад та приготування середовища. Культивування *D. melanogaster* здійснювали в агаризованому середовищі, яке готували наступним чином: до 250 мл води додавали 1,5 г дріжджів, 8,75 г цукру, 2 г агару, 1,25 г активованого вугілля та варили, помішуючи 1 год. Після остигання до 40 °С, готове середовище переносили по 15 мл у стерильні чашки Петрі. До ще рідкого середовища вносили дозатором різні об'єми рослинного екстракту (0,25 мл, 0,5 мл, 1,0 мл у трьох повторях), за винятком контролю, перемішували та поміщали у термостат.

Закладання досліду. Через 10 год, коли чашки із середовищем підсохли, у камери для яйцекладки переносили особин *D. melanogaster* у співвідношенні 1: 2 (30 самців і 60 віргінних самок). Камеру для яйцекладки щільно притискали до агаризованого середовища чашки Петрі та витримували у термостаті при 24 °С для відкладання ними яєць. Через кожні 8 – 10 год камери з мухами переносили на свіжі

чашки Петрі та поміщали у термостат (на 24 °С) для розвитку яєць. У кожному досліді було не менше 80 – 100 яєць.

Аналіз дослідю. Через добу у контрольних та дослідних чашках підраховували загальну кількість відкладених яєць за допомогою біокулярної лупи МБС-10 (16х). Через три доби підраховували кількість яєць з ембріональною загибеллю (ранньою (РЕЗ) та пізньою (ПЕЗ)); на п'яту добу – кількість лялечок. Інсектицидну активність водних екстрактів *T. vulgare* виражали у відсотках (%) як загальне зниження життєздатності личинок *Drosophila melanogaster* порівняно з контролем.

Статистичний аналіз експериментальних даних. Досліди проведено у трьох повторях. Для кожної вибірки показників визначали середнє арифметичне значення (М) та стандартну похибку середнього (m). Кількісні дані обрахунку яєць, личинок і лялечок кожної серії дослідю сумували, а також виражали у відсотках порівняно із контрольною величиною та заносили у таблицю. Вказані параметри та статистичні показники заносили у таблиці.

Результати дослідження та їх обговорення

Правильний вибір способу екстрагування БАР з лікарської сировини є запорукою створення висоефективних ліків на їхній основі. Тому нами було проведено аналіз ефективності способів екстракції БАР з пижми звичайної шляхом біотестування, у якому аналізували інсектицидну дію екстрактів на личинки *Drosophila melanogaster* як модельного об'єкта.

Для екстракції БАР із суцвіть пижми звичайної було обрано три способи: настоювання за присутності дистильованої води упродовж 1 год у водяній бані (60 °С) та настоювання за присутності 10% і 20% водно-спиртових розчинів. Оскільки перший спосіб для екстракції БАР із лікарської сировини гарячою водою можна використовувати у випадку їхньої термостабільності, тому нами водночас проводилася спиртово-водна екстракція. Використання останніх двох способів екстракції дає можливість уникнути температурної інактивації більшості БАР, а також глибинної екстракції баластних речовин.

Оскільки час настоювання лікарської сировини є важливою величиною, тому нами було зроблено аналіз динаміки екстрагування БАР пижми звичайної водою та водно-спиртовими розчинами. Для цього визначали оптичну густину (мутність) як описано вище. Як видно наведених даних у таблиці 1 – 3, водна екстракція суцвіть *T. vulgare* протікає швидше та ефективніше порівняно зі спиртовою, і на першу годину настоювання досягає 2,792 (для сирі), 3,834 (для сухої біомаси) одиниць оптичної густини при 540 нм.

Таблиця 1

Оптична густина водних екстрактів *Tanacetum vulgare*

Екстракт	D ₅₄₀
Суцвіть пижма (сирі)	2,792±0,22
Суцвіть пижма (сухі)	3,834±0,31

Як видно із таблиць 2 і 3, у всіх варіантах дослідю швидкість екстрагування БАР незначна: повільно зростає на 5 добу та незначно збільшується на 14 добу.

Таблиця 2

Оптична густина 10 % спиртово-водних екстрактів *Tanacetum vulgare*

Назва екстракту	D ₅₄₀ (1 год)	D ₅₄₀ (1 доба)	D ₅₄₀ (5 діб)	D ₅₄₀ (14 діб)
Суцвіття пижма (сирі)	0,288±0,03 (64,43%)	0,365±0,04 (81,68%)	0,401±0,04 (89,71%)	0,547±0,05 (100%)
Суцвіття пижма (сухі)	0,181±0,02 (39,18%)	0,225±0,02 (48,7%)	0,387 ±0,03 (87,77%)	0,462±0,05 (100%)

Порівнюючи дані ефективності екстрагування БАР із сухих суцвіть пижми (див. табл. 2 і 3) за використання 10 % і 20 % спиртових розчинів, бачимо, що вона протікає однаково повільно і значно поступається водній (див. табл. 1). До того ж, екстракція 20 % порівняно з 10 % етанолом на 5 і 14 добу залишається низькою як для сухих так і для сирих суцвіть та досягає 0,402 - 0,54 одиниць оптичної густини.

Таблиця 3

Оптична густина 20 % спиртово-водних екстрактів *Tanacetum vulgare*

Назва екстракту	D ₅₄₀ (1 год)	D ₅₄₀ (1 доба)	D ₅₄₀ (5 діб)	D ₅₄₀ (14 діб)
Суцвіття пижма (сирі)	0,181±0,01 (41,41 %)	0,264±0,02 (60,41 %)	0,383±0,03 (87,64 %)	0,437±0,04 (100 %)
Суцвіття пижма (сухі)	0,141±0,01 (35,07%)	0,205±0,02 (50,99%)	0,317 ±0,03 (78,86%)	0,402±0,04 (100%)

Отримані водні екстракти *пижми звичайної* було проаналізовано на предмет їхньої біологічної (інсектицидної) дії, що засвідчило б надійність відповідного способу екстракції. Біотестування водних екстрактів пижми проводили на модельному об'єкті, як описано вище. Припускали, що у випадку лярвоцидної дії екстрактів пижми спостерігатиметься низька життєздатність личинок *D. melanogaster*, а тому підраховували кількість відкладених яєць, вилуплених личинок та сформованих лялечок. Як бачимо з наведених даних у таблиці 4, внесення водних екстрактів пижми до середовища спричиняє пригнічувальну дію: загальна кількість личинок і лялечок *D. melanogaster* у дослідах є значно меншою, порівняно з контролем. Зокрема, лярвоцидний ефект екстрактів пижми спостерігався у всіх варіантах досліду: особливо у випадку внесення 1 мл цього екстракту до середовища спостерігається загальне зниження життєздатності личинок *D. melanogaster* до 25 % (для екстракту сухих суцвіть власного збору), 14 % (для екстракту сирих суцвіть власного збору), 17 % (для екстракту сухих суцвіть аптечного збору).

Отже, водна екстракція БАР із суцвіть *T. vulgare* упродовж години при 60 °С є достатньо ефективним та надійним способом: отримані таким чином екстракти володіють біологічною активністю (лярвоцидною дією), а тому можуть використовуватися із лікувальною метою.

Біологічна активність водних екстрактів *Tanacetum vulgare*

Варіант досліду	Загальна кількість відкладених яєць		Кількість личинок		Кількість лялечок	
	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль	Дослід	Контроль
Екстракт суцвіть (сухих) 0,25 мл	524	810 (100 %)	349 (66%)	794 (98,02%)	274 (52,29%)	788 (97,28%)
Екстракт суцвіть (сухих) 0,5 мл	470		224 (47,66%)		181 (38,51%)	
Екстракт суцвіть (сухих) 1,0 мл	402		145 (36,07%)		101 (25,12%)	
Екстракт суцвіть (сирих) 0,25 мл	710		546 (76,90%)		472 (66,48%)	
Екстракт квіток (сирих), 0,5 мл	444		217 (48,87%)		186 (41,89%)	
Екстракт суцвіть (сирих), 1,0 мл	780		184 (23,59%)		112 (14,36%)	
Екстракт квіток* (сухих) 0,25 мл	612		412 (67,32%)		353 (57,68%)	
Екстракт суцвіть* (сухих) 0,5 мл	594		312 (52,53%)		278 (46,80%)	
Екстракт суцвіть* (сухих) 1,0 мл	568		181 (31,87%)		97 (17,08%)	

* аптечного збору.

Висновки

1. Встановлено, що водна екстракція БАР із суцвіть *Tanacetum vulgare* протікає ефективніше порівняно із водно-спиртовою.

2. Методом біотестування за використання модельного об'єкта *Drosophila melanogaster* встановлено високу біологічну активність (інсектицидну дію) водних екстрактів *T. vulgare* (життєздатність личинок знижувались до 25 – 14 %).

3. Показано, що екстрагування БАР водою (із 80 °С) із сухих суцвіть *T. vulgare* з подальшим інкубацією при 60 °С є надійним, швидким та ефективним способом.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баренбойм Г. М. Биологически активные вещества / Г. М. Баренбойм, А. Г. Маленков Новые принципы поиска. – М. : Наука, 1986. – С. 212 – 231.
2. Баїк О.Л. Зміни активності ферментів антиоксидантного захисту у мохів за дії іонів міді та цинку / О.Л. Баїк / Біологічні студії, 2009. – Т. 3, № 3. – С. 83 – 88.
3. Товстуха Є. С. Фітотерапія / Є. С. Товстуха – К. : Здоров'я, 1990. – С. 274 – 281.

4. Кархут В.В. Жива аптека / В.В. Кархут – К. : Здоров'я, 1992. – С. 24 – 26.
5. Чуешов В. І. Технологія ліків / В.І. Чуешов – Харків : Золоті сторінки, 2003. – С. 542 – 557.
6. Семенишин Є.М. Механізм і кінетика екстрагування / Є. М. Семенишин, Й. Й. Ятчишин, В.І. Троцький, Ю.В. Ковальська // Хімічна промисловість України. – Київ, 2008. – Вип. 2. – С. 9 – 12.
7. Домарецький В.А.. Технологія екстрактів, концентратів і напоїв із рослинної сировини / В.А. Домарецький, В.Л. Прибильський, М.Г. Михайлов– Вінниця : Нова Книга, 2005. – С. 153 – 159.
8. Дмитриєвський Д. І. Промислова технологія ліків / Д.І. Дмитриєвський– Вінниця : Нова книга, 2008. – С. 266 – 270.
9. Краснюк І.І. Технологія лікарських форм / І.І. Краснюк – М. : Академия, 2004. – С. 355 – 358.
10. Муравьев І.А. Технологія лікарств / І. А. Муравьев – Т. 1. – М. : Медицина, 1980. – С. 162 – 209.
11. Медведев Н. Н. Практическая генетика / Н. Н. Медведев – М. : Наука, 1968. – С. 22 – 37.
12. Носаль М.А. Лікарські рослини і способи їх застосування в народі / М.А. Носаль, І.М. Носаль – У 2-х кн. – Кн. 1. – Житомир : Полісся, 1991. – С. 76 – 79.

Г. Н. Клепач, І. В. Карпяк

ИССЛЕДОВАНИЕ СПОСОБОВ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ (БАВ) ИЗ ПИЖМА ОБЫКНОВЕННОЙ

Проведено дослідження ефективності способів екстракції біологічно активних речовин (БАВ) із Пижма звичайної (*Tanacetum vulgare* L.). Отримані водні та спирто-водні екстракти із соцветий Пижма звичайної. Показано високою біологічною активністю (лярвоцидне діє) отриманих водних екстрактів Пижма звичайної відносно *Drosophila melanogaster* в якості модельного об'єкта. Установлено, що водна екстракція БАВ із соцветий Пижма с наступною 1-годинною інкубацією при 60 °С є простим і надійним способом.

Н. Klepach, I. Karpyak

RESEARCH METHODS FOR EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM TANACETUM VULGARE

A study of the efficiency of extraction of biologically active substances (BAS) with *Tanacetum vulgare* L. Try water and alcohol-water extracts from the inflorescence of flowers *T. vulgare*. Displaying bioactive water extracts obtained *T. vulgare* about *Drosophila melanogaster* as a model object. Found that the water extraction BAS from inflorescence *T. vulgare* followed by 1-hour incubation at 60 °C is a simple and reliable method.

Надійшла 20.11.2012 р.