

ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ТРАВІ ХВИЛІВНИКУ ЗВИЧАЙНОГО (*ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.) МЕТОДОМ ВЕРХ ТА ВИЗНАЧЕННЯ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЦІЄЇ СИРОВИНИ

Погодіна Л.І.¹, Бурда Н.С.¹,
Кисличенко В.С.¹, Мартинов А.В.²

¹Кафедра хімії природних сполук і нутриціології
Національного фармацевтичного університету

²ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І.
Мечникова НАМН України»

Вступ. Хвилівник звичайний (*Aristolochia clematidis* L.) – багаторічна трав'яниста рослина, яка відноситься до родини Хвилівникові (*Aristolochiaceae*) [1]. Дана рослина розповсюджена в Україні, часто зустрічається як бур'ян, тому сировинна база є забезпеченою. Крім того, у традиційній медицині багатьох країн світу здавна застосовувалися рослини роду Хвилівник, у тому числі хвилівник звичайний [2]. Однак, наразі з приводу застосування хвилівнику звичайного в медицині є певні труднощі, які насамперед обумовлені побічними ефектами, зокрема нефропатією, які можуть виникати при застосуванні лікарських засобів на основі цієї рослини [3]. Тому на сьогодні вченими з різних країн проводяться поглиблені наукові дослідження щодо дослідження хімічного складу та фармакологічної активності для розуміння безпечного застосування лікарських засобів на основі сировини рослин роду Хвилівник. Слід зауважити, що є роботи, які присвячені пошуку можливостей зменшення нефротоксичності за допомогою одночасного використання антиоксидантів [4].

Часто науковці у своїх експериментах по вивченню рослин означеного роду акцентують свою увагу на дослідженні сильнодіючих речовин, а саме аристоксієвих кислот та алкалоїдів [1]. Нашими власними дослідженнями було визначено, що аристоксієві кислоти більшою мірою накопичуються у підземній частині хвилівнику звичайного [5]. Тому для подальших досліджень нами було обрано траву цієї рослини. Не дивлячись на дещо неоднозначне ставлення до цієї рослини з точки зору її використання в медицині, спостерігається тенденція щодо знаходження можливостей раціоналізувати застосування рослин роду Хвилівник, зокрема хвилівнику звичайного, шляхом всебічного наукового вивчення.

Є позитивні результати з приводу визначення антимікробної та цитотоксичної активності рослин роду Хвилівник [6-9]. Зокрема, в попередніх наших дослідженнях була підтверджена цитотоксична активність екстрактів, одержаних з надземної та підземної частини хвилівнику звичайного [10]. Загалом, аналізуючи наукові джерела літератури, можна зробити висновок, що інформації стосовно хімічного складу та доведеної з наукової точки зору

фармакологічної дії хвилівнику звичайного не достатньо.

Тому метою роботи було визначення біологічно активних речовин у траві хвилівнику звичайного, заготовленої у фазу бутонізації та цвітіння, із використанням методу ВЕРХ. Також проведення скринінгового дослідження антимікробної активності означеної сировини.

Матеріали та методи. Для дослідження використовували траву хвилівнику звичайного, заготовлену у фазі бутонізації та цвітіння в Україні в Харківській та Хмельницькій областях у травні-червні 2019-2020 рр.

Екстракцію біологічно активних речовин із досліджуваної сировини проводили таким чином: 0,500 г подрібненої на порошок сировини вносили в конічну колбу місткістю 100 мл, обладнану зворотним холодильником, додавали 25 мл 70 % етанолу та нагрівали на водяній бані протягом 45 хв. Після цього одержаний розчин охолоджували до кімнатної температури та фільтрували через фільтр «червона стрічка» в мірну колбу місткістю 25,0 мл. Об'єм розчину доводили до об'єму 25,0 мл 70 % етанолом.

Хроматографічне вивчення досліджуваних зразків сировини проводили на рідинному хроматографі, обладнаному діодноматричним детектором Shimadzu HPLC-system, ser.20 в таких умовах:

- колонка Phenomenex Luna C18, розміром 250 мм x 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм;
- температура колонки – 35°C;
- довжина хвилі детектування – 330 нм;
- швидкість потоку рухомої фази – 1 мл/хв;
- об'єм проби, що вводився – 5 мкл;
- рухома фаза:

Час хроматографування (хв)	Елюент А, %	Елюент Б, %
----------------------------------	----------------	----------------

0–25	85 → 35	15 → 65
25–30	35 → 0	65 → 100
30–31	0 → 85	100 → 15

Елюент А: 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти у воді; Елюент Б: 0,1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

Ідентифікацію компонентів проводили за часом утримування та відповідності УФ-спектрів речовини-стандарту [10].

Визначення антимікробної активності проводили у ДУ «Інститут мікробіології та імунології імені І.І. Мечникова НАМН України», під керівництвом к.біол.н., ст.н.сп. Осолодченко Тетяни Павлівни. Для визначення антимікробної активності трави хвилівнику звичайного нами проведено скринінгове дослідження витяжок з даної сировини. Були одержані екстракти у співвідношенні сировина : екстрагент 1:10. Як екстрагенти використовували воду очищену та 50 %, 70 % та 96 % етанол.

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів визначали за відомою методикою методом колодязів із використанням середовища Мюллера-Хінтона [11].

Оцінку антибактеріальної активності проводили за діаметром зон затримки росту:

- 10 мм – мікроорганізм не чутливий до досліджуваного екстракту;
- 10-15 мм – мікроорганізм слабочутливий до досліджуваного екстракту;
- 15-25 мм – мікроорганізм чутливий до досліджуваного екстракту;
- 25 мм та вище – мікроорганізм високочутливий до досліджуваного екстракту.

У дослідженні використовували такі штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Escherichia coli ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 653/885.

При обробці результатів дослідження враховували вплив екстрагентів на антимікробну активність.

Результати та обговорення. Хроматограми виявлення БАР у досліджуваних видах сировини, а також хроматографічні параметри наведені на рис. 1-2 та у табл. 1-2.

Результати виражаються як середні значення трьох вимірювань \pm SD.

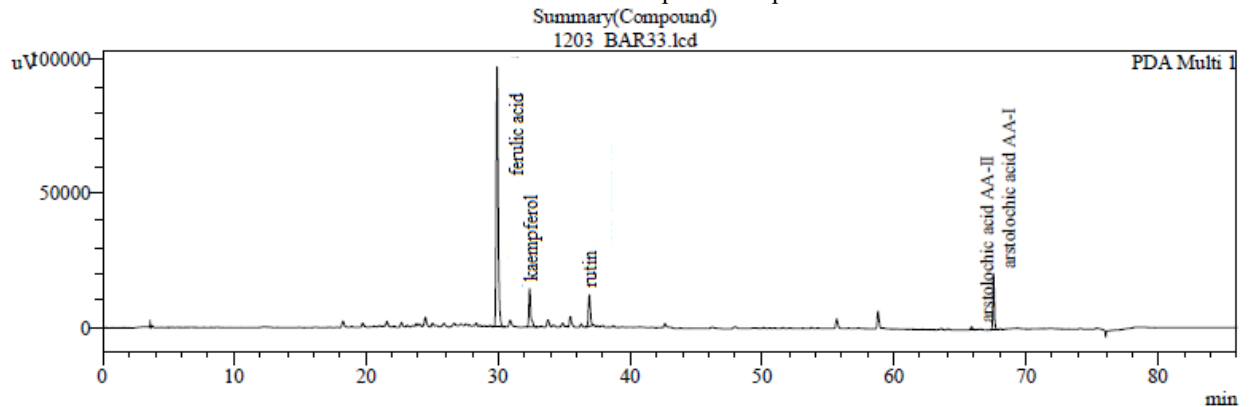


Рис. 1. Хроматограма виявлення БАР у траві хвильнику звичайного, зібраної у фазу бутонізації

Таблиця 1. Хроматографічні параметри для визначення БАР у траві хвильнику звичайного, зібраної у фазу бутонізації

Сполука	Retention time	Area	Tailing factor	Theoretical plate	Resolution
Ферулова кислота	29,930 \pm 0,242	985101 \pm 6895	1,334 \pm 0,013	192495,828 \pm 1924,958	0,000
Кемпферол	32,398 \pm 0,273	138498 \pm 1107	1,772 \pm 0,017	290828,077 \pm 2326,624	9,618 \pm 0,086
Рутин	36,922 \pm 0,302	119508 \pm 836	1,165 \pm 0,010	273179,047 \pm 2731,790	17,306 \pm 0,155
Аристолохієва кислота AA-II	65,888 \pm 0,638	11523 \pm 92	1,146 \pm 0,011	938740,508 \pm 8448,664	104,462 \pm 0,835
Аристолохієва кислота AA-I	67,548 \pm 0,645	153028 \pm 1071	1,286 \pm 0,012	1680951,236 \pm 15128,561	6,911 \pm 0,055

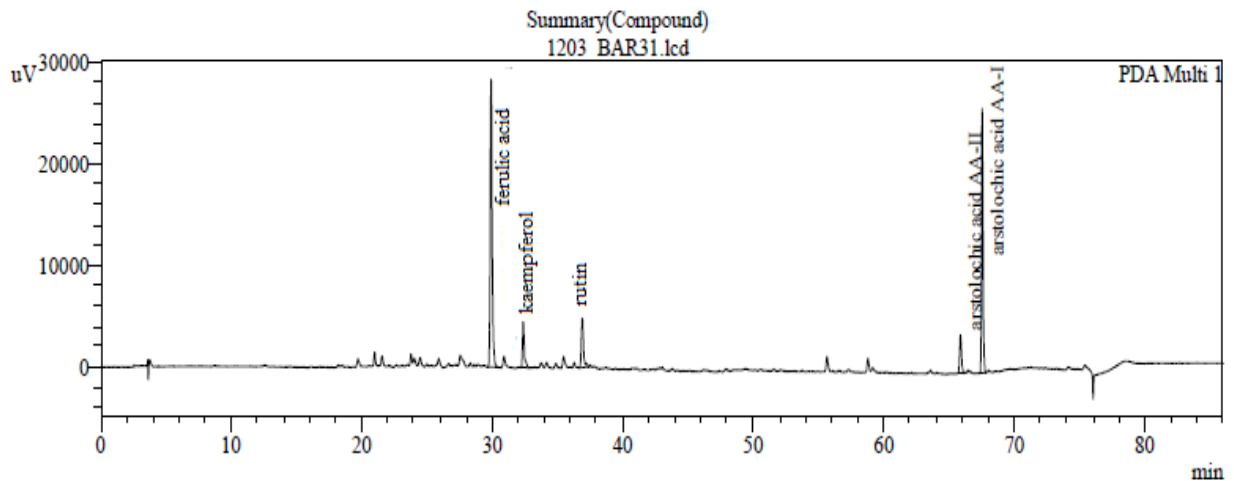


Рис. 2. Хроматограма виявлення БАР у траві хвильнику звичайного, зібраної у фазу цвітіння

Таблиця 2. Хроматографічні параметри для визначення БАР у траві хвилівнику звичайного, зібраної у фазу цвітіння

Сполука	Retention time	Area	Tailing factor	Theoretical plate	Resolution
Ферулова кислота	29,918±0,269	289902±2319	1,346±0,012	191990,393±2495,875	0,000
Кемпферол	32,382±0,291	44564±401	1,661±0,021	294051,786±2793,491	9,628±0,010
Рутин	36,905±0,442	54858±521	1,302±0,011	256541,931±3078,503	17,056±0,204
Аристоклієва кислота АА-II	65,879±0,724	35409±339	1,221±0,113	962743,113±10590,174	103,476±1,241
Аристоклієва кислота АА-I	67,542±0,945	193848±2520	1,281±0,126	1652760,345±23138,64	6,948±0,067

Як видно з наведених вище даних, експериментальне дослідження із використанням даних умов хроматографування дозволило виявити у досліджуваних об'єктах сполуки фенольної природи, а саме ферулову кислоту, кемпферол та рутин. Крім того, одночасно було встановлено наявність аристоклієвих кислот АА-I та АА-II.

Слід відмітити, що за якісним складом виявлених сполук трава хвилівнику звичайного, зібрана у фазу бутонізації, не відрізнялася від трави, заготовленої у фазу цвітіння.

Результати визначення скринінгу антимікробної активності витяжок із трави хвилівнику звичайного наведено на рис. 3-6.

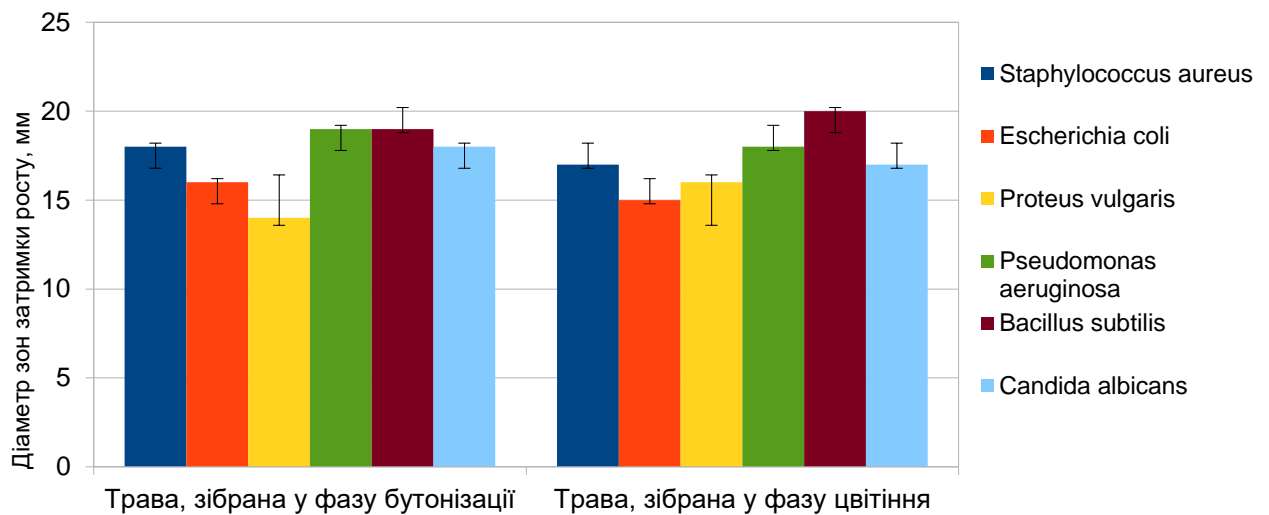


Рис. 3. Діаграма результатів вивчення антимікробних властивостей витяжок з трави хвилівнику звичайного (екстрагент – вода очищена), $p < 0,05$

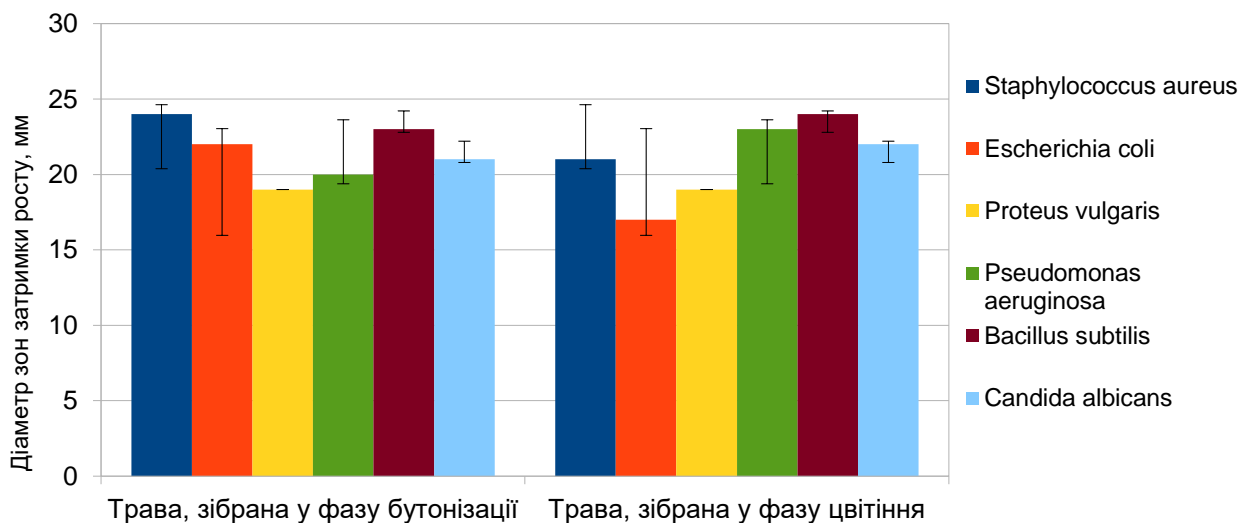


Рис. 4. Діаграма результатів вивчення антимікробних властивостей витяжок з трави хвилівнику звичайного (екстрагент – 50 % етанол), $p < 0,05$

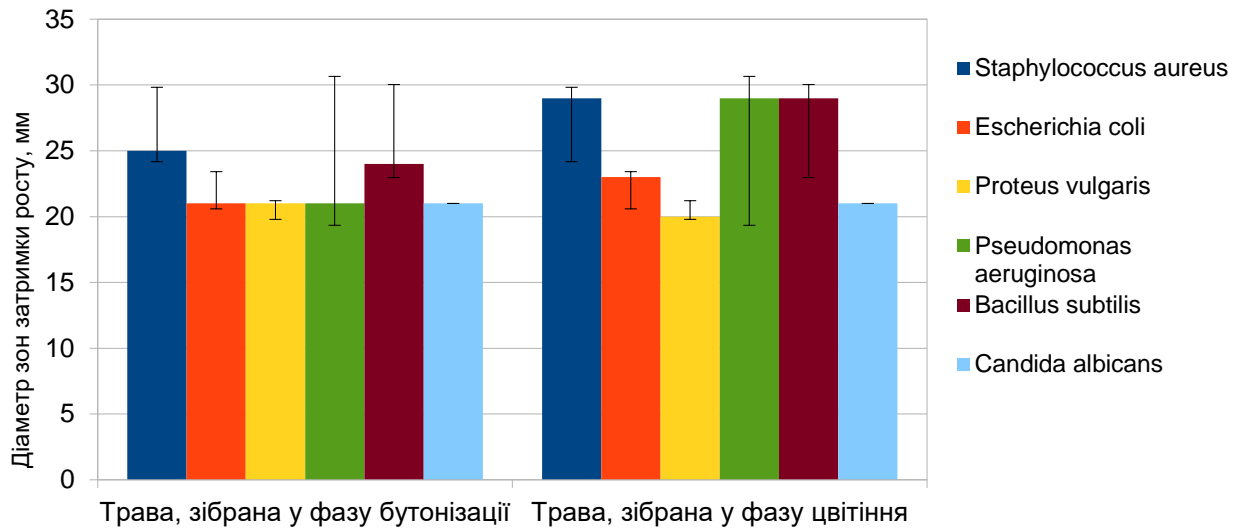


Рис. 5. Діаграма результатів вивчення антимікробних властивостей витяжок з трави хвилівнику звичайного (екстрагент – 70 % етанол), $p < 0,05$

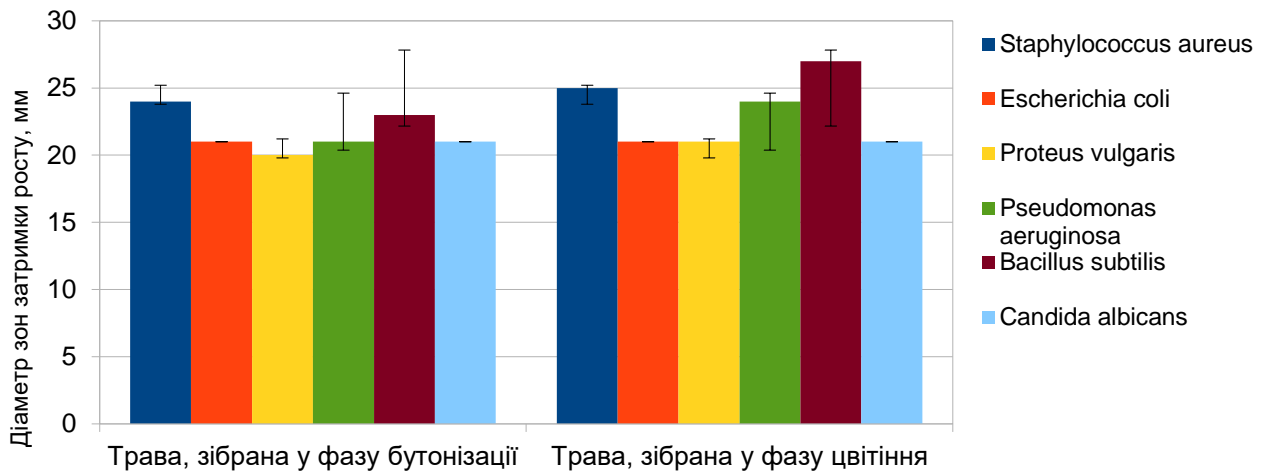


Рис. 6. Діаграма результатів вивчення антимікробних властивостей витяжок з трави хвилівнику звичайного (екстрагент – 96 % етанол), $p < 0,05$

Отже, визначено, що антимікробна активність трави хвилівнику звичайного, зібрана у фазу бутонізації, та трава, зібрана у фазу цвітіння, значно між собою не відрізнялася. Однак, слід зазначити, що все ж таки дещо вищою вона була у трави, заготовленою у фазу цвітіння. Слід відмітити, що найбільш вираженою антимікробна активність була у витяжок, одержаних 70 % етанолом, найнижчою – водою очищеною. Такі мікроорганізми як *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Bacillus subtilis* були високочутливими до дії витяжок з трави хвилівнику звичайного.

Висновки. Таким чином, одержані результати щодо вивчення хімічного складу трави хвилівнику звичайного показують перспективність її подальшого поглибленого дослідження по вивченню сполук фенольної природи, а також визначенню їх кількісного вмісту. Крім того, скринінгове визначення антимікробної активності досліджуваних видів сировини дозволили виявити оптимальний екстрагент, а саме 70 % етанол та сировину – траву хвилівнику

звичайного, зібрану у фазу цвітіння, які доцільно використовувати для подальшого вивчення. Висока антимікробна активність трави хвилівнику звичайного дозволяє припустити можливість використання екстрактів з неї у лікарських засобах для зовнішнього застосування.

Detection of biologically active substances in *Aristolochia clematitis* L. herb by HPLC and determination of antimicrobial activity of this raw material

Pohodina L.I., Burda N.Ye, Kyslychenko V.S., Martynov A.V.

Introduction. *Aristolochia clematitis* L. is a perennial herbaceous plant, family *Aristolochiaceae*. At present, there are some difficulties with the use of *Aristolochia clematitis* in medicine. They are primarily due to side effects, including nephropathy. Therefore, today scientists from different countries are conducting in-depth research to study the chemical composition and pharmacological activity to understand the safe use of drugs based on raw

materials of plants of the genus *Aristolochia* L. There are positive results in determining the antimicrobial and cytotoxic activity of plants of the genus *Aristolochia*. In general, analyzing the scientific literature, we can conclude that information on the chemical composition and scientifically proven pharmacological action of *Aristolochia clematitis* is not enough. The aim of the study was to identify biologically active substances in *Aristolochia clematitis* herb, collected within the budding and blooming phase, by HPLC. Also conducting a screening study of the antimicrobial activity of these raw materials. **Materials and methods.** *Aristolochia clematitis* herb was collected within the budding and blooming phase in Kharkiv and Khmelnytskyi Regions, Ukraine, in May-June 2019/2020. The chromatographic study of tested herb specimens was performed at a Shimadzu HPLC-system, ser.20 liquid chromatograph equipped with a diode matrix detector under the following conditions: Phenomenex Luna C18 column, dimensions: 250 mm x 4,6 mm, particle size 5 µm; column temperature 35°C; detector wavelength 330 nm; mobile phase flow rate 1 ml/min; introduced sample volume 5 µl. The components were identified by their retention time and conformity of their UV spectra to standard substance. To determine the antimicrobial activity of *Aristolochia clematitis* herb, we conducted a screening study of extracts from this raw material. Extracts were obtained in the ratio of raw materials: extractant 1:10. Purified water and 50%, 70% and 96% ethanol were used as extractants. Determination of the sensitivity of strains of microorganisms was determined by a known method by the method of wells using Mueller-Hinton medium. Evaluation of antibacterial activity was performed on the diameter of the growth retardation zones: 10 mm – the microorganism is not sensitive to the test extract, 10-15 mm – the microorganism is insensitive to the test extract; 15-25 mm – microorganism sensitive to the studied extract, 25 mm and above – microorganism highly sensitive to the studied extract. The following strains of microorganisms were used in the study: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* ATCC 653. **Research results.** Experimental study using these chromatographic conditions revealed compounds of phenolic nature, namely ferulic acid, kaempferol and rutin, in the studied objects. In addition, the presence of aristolochic acids AA-I and AA-II was simultaneously detected. It should be noted that the qualitative composition of the detected compounds of *Aristolochia clematitis* herb, collected within the budding phase, did not differ from the herb collected within the blooming phase. The antimicrobial activity of *Aristolochia clematitis* herb, collected within budding phase, and herb collected within the blooming phase, did not differ significantly. However, it should be noted that it was still slightly higher in the herb collected within the blooming phase. It should be noted that the most pronounced antimicrobial activity was in the extracts obtained with 70% ethanol, the lowest – purified water. Microorganisms such as *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* were highly sensitive to the action of extracts *Aristolochia*

DOI: 10.5281/zenodo.5499700

clematitis. **Conclusions.** Thus, the results obtained on the study of the chemical composition of *Aristolochia clematitis* herb show the prospects of its further in-depth study of the compounds of phenolic nature, as well as the determination of their quantitative content. In addition, the screening determination of antimicrobial activity of the studied types of raw materials revealed the optimal extractant, namely 70% ethanol and raw materials – *Aristolochia clematitis* herb, within the blooming phase, which should be used for further study. The high antimicrobial activity of *Aristolochia clematitis* herb suggests the possibility of using extracts from it in medicines for external use.

Keywords: *Aristolochia clematitis* L., chemical compounds, HPLC, antimicrobial activity.

References

1. Bremer K, Bremer B, Thulin M. Introduction to phylogeny and systematics of flowering plants. Acta Universitatis Upsaliensis, Symbolae Botanicae Upsalienses, 2003.
2. Ping-Chung Kuo, Yue-Chiun Li, Tian-Shung Wu (Dr.). Chemical Constituents and Pharmacology of the *Aristolochia* species. Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2012. Vol. 2, Issue 4. P. 249-266. [https://doi.org/10.1016/S2225-4110\(16\)30111-0](https://doi.org/10.1016/S2225-4110(16)30111-0)
3. Fogazzi GB, Bellincioni C. *Aristolochia clematitis*, the herb responsible for aristolochic acid nephropathy, in an uncultivated piece of land of an Italian nephrologist. Nephrology Dialysis Transplantation. 2015. Vol. 30. Issue 11. P. 1893–1896. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv211>
4. Weiwei Li, Chi-Kong Chan, Yee-Lam Wong et al. Cooking methods employing natural anti-oxidant food additives effectively reduced concentration of nephrotoxic and carcinogenic aristolochic acids in contaminated food grains. Food Chem. 2018. Vol. 264. P. 270-276. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.05.052.
5. Pohodina L, Burda N, Kyslychenko V et al. Aristolochic acid I determination in *Aristolochia clematitis* L. raw materials by HPLC method. Bull. Pharm. Sci., Assiut University. 2020. Vol. 43, Issue 2. P. 149-155. doi: 10.21608/BFSA.2020.127407
6. Willer F Silva Jr, Samyra G Cecílio, Cintia Lb Magalhães et al. Combination of extracts from *Aristolochia cymbifera* with streptomycin as a potential antibacterial drug. Springerplus. 2013. Vol. 2.430. doi: 10.1186/2193-1801-2-430.
7. Jian QingYua, Zhi XiongLiao, Xiao QiangCai et al. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. Environmental Toxicology and Pharmacology. 2007. Vol. 23, Issue 2. P. 162-167. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2006.08.004>
8. Merrouni IA, Elachouri M. Anticancer medicinal plants used by Moroccan people: Ethnobotanical, preclinical, phytochemical and clinical evidence. Journal of Ethnopharmacology. 2021. Vol. 266. 113435. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113435>
9. Pereira AO, Avila JM, Carmo G et al. Chemical composition, antimicrobial and antimycobacterial activities of *Aristolochia triangularis* Cham. from Brazil. Industrial Crops and Products. 2018. Vol. 121. P. 461-467.

10. Shatalova O, Malochtan L, Pohodina L et al. Study of cytotoxic activity of extracts of the *Aristolohia clematitis* L. Norwegian Journal of development of the International Science. 2021. № 53/2021. P. 24-27. DOI: 10.24412/3453-9875-2021-53-1-24-27

11. Methodical instructions «Determination of sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs». Order of the Ministry of Health of Ukraine 05.04.2007, № 167. in Ukrainian