

ДОСЛІДЖЕННЯ ФОТОСИНТЕЗУВАЛЬНИХ ПІГМЕНТІВ СИРОВИНИ МАТІОЛИ ДВОРОГОЇ (*MATTHIOLA BICORNIS* (SIBTH. & SM.) DC.) ТА АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ ЕКСТРАКТІВ НА ЇЇ ОСНОВІ

Пінкевич¹ В. О., Журавель¹ І. О.,
Осолодченко² Т. П.

¹Національний фармацевтичний університет, м.
Харків, Україна

²Державна установа «Інститут мікробіології та
імунології ім. І.І. Мечникова Національної
академії медичних наук України», м. Харків,
Україна

Вступ

Пігментна система рослин є основою для фотосинтетичного перетворення сонячної енергії в енергію хімічних зв'язків. Найважливішими складовими фотосинтетичного апарату рослин є пігменти – хлорофіли (зелені) та каротиноїди (жовті, оранжеві або червоні). Колір хлорофілу, виходячи з хімічної будови його молекули, пояснюється наявністю подвійних кон'югованих зв'язків у порфіриновому (тетрапірольному) ядрі та утворенням металорганічного зв'язку з магнієм. Хлорофіл є естером хлорофілінової кислоти і спиртів: метилового та фітолу. Відомо близько 10 структурних форм хлорофілів, які відрізняються за хімічною будовою, забарвленням, поширенням серед живих організмів. Каротиноїди складаються з залишків ізопрену. Виявлено понад 600 структурних модифікацій каротиноїдів, відмінних за кількістю подвійних зв'язків, просторовою конфігурацією, наявністю кисню. Так, їх поділяють на каротини (α , β , γ), які не містять кисню, та ксантофіли – кисневмісні каротиноїди. Серед ксантофілів виділяють гідроксильні (лютеїн, зеаксантин) і епоксидні (віолаксантин, неоксантин) похідні [1-4].

З літературних джерел відомо, що пігменти виявляють різноманітну фармакологічну активність. Так, хлорофіл, наприклад, має протимікробні, протизапальні та антиоксидантні властивості, регулює роботу серця, нервово-м'язового апарату, чинить тонізуючий вплив на організм. Каротиноїди сприяють нормалізації обміну речовин, мають провітамінну, антиоксидантну, радіопротекторну і антиканцерогенну активності, які в сукупності позитивно впливають на імунітет. Також вони беруть участь в окисно-відновних реакціях, підтримують нормальний рівень споживання кисню тканинами організму [1-4].

Похідні хлорофілу входять у склад біологічно активних добавок, використовуються як барвники в харчовій та парфумерно-косметичній промисловості. Окрім цього, їх якісний склад і кількісний вміст є показником пристосування до умов навколишнього середовища (наприклад, вміст хлорофілів та каротиноїдів дещо відрізняється у рослин, адаптованих до різних умов освітлення) [1-2].

Зважаючи на вищезазначене, дослідження даного класу біологічно активних речовин є актуальним.

Метою дослідження було визначення кількісного вмісту хлорофілів a , b і каротиноїдів у обмолоченій від стебел траві та стеблах матіоли дворогої сортів Цариця ночі та Вечірній аромат та скринінг антимікробної активності екстрактів на основі її сировини.

Матеріали та методи

Обмолочена від стебел трава та стебла матіоли дворогої сортів Цариця ночі та Вечірній аромат було обрано як об'єкти дослідження.

Сировину заготовляли у фазі масового цвітіння у ботанічному саду Національного фармацевтичного університету та на присадибних ділянках у Харківській області у серпні 2020 року. Сировину висушували на відкритому повітрі у затінку. Висушену траву обмолочували та відділяли стебла від суміші листя і квіток.

Визначення вмісту хлорофілів та каротиноїдів у досліджуваних видах сировини здійснювали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Optizen POP (Корея) без їх попереднього розділення. Для виділення пігментів використовували 96% етанол. Екстракцію проводили попередньо охолодженим розчинником в темному місці за методикою, зазначеною у наукових працях вітчизняних науковців [5-6]. Для розрахунку концентрації хлорофілів a , b і каротиноїдів у кожному зі зразків визначали їх оптичну густину спектрофотометрично при довжинах хвиль, відповідних максимумам спектра поглинання досліджуваних пігментів в даному розчиннику. Для хлорофілу a максимум поглинання в 96% етанолі спостерігається за $\lambda = 665$ нм, для хлорофілу b – за $\lambda = 649$ нм. Каротиноїди визначали при довжині хвилі 441 нм. Вміст кожного з рослинних пігментів розраховували за відомими формулами, наведеними в літературних джерелах [5-7]. Обробку даних, одержаних у результаті проведених експериментальних досліджень, проводили статистичним методом за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel [8].

Для визначення антимікробної активності одержували етанольні екстракти з обмолоченої трави матіоли дворогої суміші сортів шляхом вичерпної екстракції при нагріванні у співвідношенні сировина-екстрагент 1:50. Як екстрагенти використовували 70% та 96% етанол. Після екстракції витяжки упарювали під вакуумом до повного видалення розчинника.

Вивчення антимікробної активності проводили методом дифузії в агар з визначенням зон затримки росту мікроорганізмів в ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМН України», м. Харків під керівництвом зав. лабораторією «Біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ», кандидата біологічних наук Осолодченко Т. П.

Відповідно до рекомендацій ВООЗ [9-10] для оцінки антибактеріальної активності препаратів використовували наступні музейні тест-штами мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Escherichia coli ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Антимікозну активність досліджували на тест-штамі *Candida albicans* ATCC 885/653.

Мікробну суспензію готували з використанням приладу Densi-La-Meter (PLIVA-Lachema, Чехія, довжина хвилі 540 нм) згідно інструкції, що додається до приладу та інформаційного листа про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 «Стандартизація приготування мікробних суспензій», м. Київ. Мікробне навантаження становило 10^7 мікробних клітин на 1 мл середовища і встановлювалося за стандартом McFarland. В роботі використовували 18-24 годинну культуру мікроорганізмів.

Для досліджень використовували агар Мюллера-Хінтона («HimediaLaboratorles» Pvt. Ltd., Індія), а для *Candida albicans* – агар Сабуро («HimediaLaboratorles» Pvt. Ltd., Індія).

Метод дифузії препарату в агар проводили «колодязями» [9-10]. У чашки Петрі розливали два шари поживного середовища. Нижній шар являв собою підкладку з 10 мл незасіяного середовища, на яку строго горизонтально встановлювали 3-6 тонкостінних циліндрів з нержавіючої сталі діаметром 8 мм і висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар, що складався з живильного агаризованого середовища, розплавленого і охолодженого до 40°C, в яке вносили відповідний стандарт добової культури тестового мікроорганізму. Попередньо верхній шар добре перемішувався до утворення однорідної маси. Після застигання циліндри

стерильним пінцетом витягували і в утворені лунки поміщали випробовувану речовину з урахуванням її об'єму (0,3 мл). Об'єм середовища для верхнього шару коливався від 14,0 до 16,0 мл. Чашки підсушували 30-40 хв при кімнатній температурі і ставили в термостат на 18-24 год.

Для інтерпретації результатів використали критерії, які застосовують при оцінці нових антибактеріальних речовин і вивченні антибіотикостійких штамів:

відсутність зон затримки росту мікроорганізмів навколо лунки, а також зони затримки до 10,00 мм вказує на те, що мікроорганізм не чутливий до внесеного в лунку препарату або концентрації антибіотика;

зони затримки росту діаметром 10,00-15,00 мм вказують на малу чутливість культури до випробовуваної концентрації антибактеріальної речовини;

зони затримки росту діаметром 15,00-25,00 мм розцінюються як показник чутливості мікроорганізму до випробовуваного лікарського засобу;

зони затримки росту, діаметр яких перевищує 25,00 мм, свідчить про високу чутливість мікроорганізмів до досліджуваних препаратів [9-10].

Результати та їх обговорення

Результати кількісного визначення фотосинтезувальних пігментів у обмолоченій траві та стеблах матіоли дворогої сортів Цариця ночі та Вечірній аромат наведені в таблиці 1.

Таблиця 1. Кількісний вміст хлорофілу а, хлорофілу b, каротиноїдів у обмолоченій траві та стеблах матіоли дворогої сортів Цариця ночі та Вечірній аромат

	хлорофіл а, мг/г	хлорофіл b, мг/г	сума хлорофілів, мг/г	каротиноїди, мг/г	співвідношення хл а/хл b	співвідношення суми хлорофілів/каротиноїди
Обмолочена трава матіоли дворогої сорту Цариця ночі	1,17±0,06	0,64±0,03	1,81±0,09	0,14±0,02	1,82±0,09	12,92±0,39
Обмолочена трава матіоли дворогої сорту Вечірній аромат	1,30±0,06	0,65±0,06	1,95±0,09	0,12±0,01	2,01±0,01	16,25±0,49
Стебла матіоли дворогої сорту Цариця ночі	0,31±0,02	0,24±0,02	0,55±0,03	0,03±0,01	1,29±0,06	18,33±0,55
Стебла матіоли дворогої сорту Вечірній аромат	0,39±0,02	0,31±0,02	0,70±0,03	0,03±0,01	1,26±0,06	23,33±0,70

За результатами досліджень встановлено, що вміст хлорофілів був у 1,08 разів вищий у обмолоченій траві та у 1,27 разів вищий у стеблах сорту Вечірній аромат, ніж у аналогічній сировині сорту Цариця ночі. Каротиноїди накопичувалися в однаковій кількості обох сортів майже в однаковій кількості.

Хлорофілу а містилося приблизно у 3 рази більше, хлорофілу b – у 2 рази більше а каротиноїдів – у 4 рази більше у обмолоченій траві, ніж у стеблах.

Найвищим серед пігментів був вміст хлорофілу а, найменшим – каротиноїдів.

Співвідношення хлорофілу а до хлорофілу b становило 1,82±0,09 та 2,01±0,01 для обмолоченої трави та 1,29±0,06 і 1,26±0,06 для стебел сортів Цариця ночі та Вечірній аромат відповідно.

Оскільки вміст хлорофілів та каротиноїдів був вищий у обмолоченій траві та в обох досліджуваних сортах відрізнявся незначно, для одержання екстрактів було доцільно обрати траву матіюли дворогої суміші сортів. Всі зразки екстрактів матіюли дворогої пригнічували ріст взятих для аналізу штамів мікроорганізмів. Діаметри зон затримки росту становили від 15,00±0,69 до 23,00±1,02 мм, що згідно з вищезазначеними критеріями вказує на чутливість мікроорганізмів до екстрактів матіюли дворогої трави і свідчить про їх помірну антимікробну активність. Екстракт з використанням як екстрагенту 70% етанолу виявляв сильнішу антимікробну активність, ніж екстракт з використанням як екстрагенту 96% етанолу. Грам-позитивні бактерії були більш чутливими до дії досліджуваних екстрактів, ніж грам-негативні. Зони затримки росту тест-штамів грам-позитивних *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 та *Bacillus subtilis*

ATCC 6633 становили 23,00±1,02 і 21,00±0,97 мм та 21,00±0,93 і 20,00±0,79 мм для 70% та 96% етанольного екстракту відповідно, а грам-негативних *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 – 20,00±0,83, 17,00±0,84 і 17,00±0,75 мм для екстракту на 70% етанолі та 17,00±0,67, 16,00±0,71 і 16,00±0,64 мм для екстракту на 96% етанолі. Найменшу чутливість до дії представлених на аналіз зразків виявляв тест-штам грибів роду Кандида (*Candida albicans* ATCC 653/885), зони затримки росту якого становили 15,00±0,69 мм для екстракту з використанням як екстрагенту 96% етанолу та 16,00±0,79 мм для екстракту з використанням як екстрагенту 70% етанолу.

Результати визначення антибактеріальної активності досліджуваних етанольних екстрактів трави матіюли дворогої представлені в таблиці 2.

Таблиця 2. Антибактеріальна активність екстрактів матіюли дворогої трави по відношенню до тест-штамів мікроорганізмів

№	Мікроорганізм	Грам-позитивний чи грам- негативний	Екстракт матіюли дворогої (екстрагент – 70% етанол)	Екстракт матіюли дворогої (екстрагент – 96% етанол)
			Діаметри зон затримки росту в мм (M±m, p≤0,05)	
1	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	грам-позитивний	23,00±1,02	21,00±0,93
2	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	грам-негативний	20,00±0,83	17,00±0,67
3	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	грам-негативний	17,00±0,84	16,00±0,71
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	грам-негативний	17,00±0,75	16,00±0,64
5	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	грам-позитивний	21,00±0,97	20,00±0,79
6	<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885	гриби	16,00±0,79	15,00±0,69

Висновки

1. Спектрофотометричним методом проведено кількісний аналіз хлорофілів та каротиноїдів у обмолоченій траві та стеблах матіюли дворогої сортів Цариця ночі та Вечірній аромат. Вміст хлорофілу а становив 1,17±0,06 мг/г, 1,30±0,06 мг/г, 0,31±0,02 мг/г та 0,39±0,02 мг/г, хлорофілу b – 0,64±0,03 мг/г, 0,65±0,06 мг/г, 0,24±0,02 мг/г та 0,31±0,02 мг/г а каротиноїдів – 0,14±0,02 мг/г, 0,12±0,01 мг/г, 0,03±0,01 мг/г та 0,03±0,01 мг/г у обмолоченій траві та стеблах матіюли дворогої сорту Цариця ночі та Вечірній аромат відповідно.
2. Для одержання екстрактів було доцільно обрати траву матіюли дворогої суміші сортів, так як у обмолоченій траві накопичувалося більше пігментів і їх вміст по сортах відрізнявся незначно.
3. Дослідження антимікробної активності етанольних екстрактів матіюли дворогої трави показало, що діаметри зон затримки росту мікроорганізмів становили від 15,00±0,69 до 23,00±1,02 мм. Згідно з критеріями, які застосовують при оцінці нових антибактеріальних речовин і вивченні антибіотикостійких штамів, зони затримки росту

діаметром 15,00-25,00 мм розцінюються як показник чутливості мікроорганізму до випробовуваного лікарського засобу. В результаті експерименту встановлено, що матіюли дворогої трави екстракти виявляють помірну антимікробну дію, а найбільш виражену активність проти мікроорганізмів має екстракт, для одержання якого як екстрагент використовувався 70% етанол.

4. Отримані результати можуть бути в подальшому використані при розробці методів контролю якості на сировину, що досліджувалася та свідчать про те, що матіюла дворога є перспективною сировиною для подальшого поглибленого фармакогностичного вивчення та розробки нових лікарських препаратів на її основі.

The study of photosynthesis pigments of night-scented stock (*Matthiola bicornis* (Sibth. & Sm.) DC.) raw materials and antimicrobial activity of extracts based on it

Pinkevych V. O., Zhuravel I. O., Osolodchenko T. P.
It is known from the literature that pigments exhibit a variety of pharmacological activity. For example,

chlorophyll has antimicrobial, anti-inflammatory and antioxidant properties, regulates the work of heart, neuromuscular system, and has a tonic effect on the body. Carotenoids contribute to the normalization of metabolism, have provitamin, antioxidant, radioprotective and anticancer activities, which together have a positive effect on immunity. They also participate in redox reactions, maintain a normal level of oxygen consumption by body tissues. Against this background, the study of this class of biologically active substances is important. The aim of the study was to determine the quantitative content of chlorophyll a, b and carotenoids in threshed grass and stalks of *Matthiola bicornis* (Sibth. & Sm.) DC. Tsarytsia Nochi (Queen of Night) and Vechirni Aromat (Evening Scent) cultivars, and screening of antimicrobial activity of extracts based on its raw materials. Determination of the content of chlorophylls and carotenoids in the studied types of raw materials was carried out by spectrophotometric method without their prior separation. Ethanol (96%) was used to isolate the pigments. The extraction was performed with pre-cooled solvent in a dark place according to the method specified in the scientific works of domestic scientists. To calculate the concentrations of chlorophyll a, b and carotenoids in each of the samples determined their optical density spectrophotometrically at wavelengths corresponding to the maxima of the absorption spectrum of the studied pigments in this solvent. The content of each of the plant pigments was calculated according to known formulas given in the literature. To determine the antimicrobial activity, ethanolic extracts of *Matthiola bicornis* (Sibth. & Sm.) DC grass were obtained by exhaustive extraction under heating in a ratio of raw material-extractant of 1:50. Ethanol (70% and 96%) were used as extractants. After extraction, the extracts were evaporated in vacuum to completely remove the solvent. The study of antimicrobial activity was performed by the method of diffusion into agar with the definition of zones of growth retardation of microorganisms in the State Institution «Institute of Microbiology and Immunology I. I. Mechnikov National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kharkiv under the leadership of the head of laboratory «Biochemistry of microorganisms and nutrient media», Candidate of Biological Sciences Osolodchenko T. P. In accordance with WHO recommendations to assess the antibacterial activity used the following museum test strains of microorganisms: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 and *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Antimycotic activity was investigated on the test strain *Candida albicans* ATCC 885/653. To interpret the results, we used the criteria used in the evaluation of new antibacterial substances and the study of antibiotic-resistant strains. The content of chlorophyll a was 1,17±0,06 mg/g, 1,30±0,06 mg/g, 0,31±0,02 mg/g and 0,39±0,02 mg/g, chlorophyll b – 0,64±0,03 mg/g, 0,65±0,06 mg/g, 0,24±0,02 mg/g та 0,31±0,02 mg/g and carotenoids – 0,14±0,02 mg/g, 0,12±0,01 mg/g, 0,03±0,01 mg/g та 0,03±0,01 mg/g in threshed grass and

stalks of Night-scented stock, cultivars Queen of Night and Evening Scent respectively. The study of antimicrobial activity of ethanolic extracts of *Matthiola bicornis* (Sibth. & Sm.) DC grass showed that the diameters of the zones of growth retardation of microorganisms were from 15±0,69 to 23±1,02 millimeters. According to the criteria used in the evaluation of new antibacterial substances and the study of antibiotic-resistant strains, growth retardation zones with a diameter of 15-25 millimeters are regarded as an indicator of sensitivity of the microorganism to the test drug and demonstrate its moderate antimicrobial activity. The obtained results can be further used in the development of quality control methods for the studied raw materials and indicate that *Matthiola bicornis* (Sibth. & Sm.) DC is a promising raw material for further in-depth pharmacognostic study and development of new drugs based on it.

Keywords: *Matthiola bicornis*, chlorophylls, carotenoids, spectrophotometry, antimicrobial activity

References

1. Chlorophyll: structure, production and medicinal uses / ed. HLe, E Salcedo. Nova Biomedical.2012. 206 p.
2. İnanç A.L. Chlorophyll: structural properties, health benefits and its occurrence in virgin olive oils. Academic Food Journal. 2011. Vol. 9 (2). P. 26-32.
3. Di Pietro N., Di Tomo P., Pandolfi A. Carotenoids in cardiovascular disease prevention. JSM Atheroscler. 2016. 1. (1). 1002-1015.
4. Eldahshan OA, Singab AN. Carotenoids. J. Pharmacogn. Phytoch. 2013. 2 (1). 225-234. DOI: 10.12691/ajfst-4-3-4
5. Grynenko UV, Zhuravel IO Determination of the chlorophylls and carotenoids content in spinach leaves (*Spinacia oleracea* L.). Coliection of scientific works of staff member of P. L. Shupyk NMAPE. 2017. 28. 29-33.
6. Kyslychenko OA, Protska VV, Zhuravel IO The study of photosynthesis pigments of canna hybrida herb of some varieties. Current issues in pharmacy and medicine: science and practice. 2019. 12 (2). 141-147. DOI:10.14739/2409-2932.2019.2.170976
7. Malayeva Ye.V., Stepovaya Ye.S. Pigment content of photosynthetic apparatus of *Chrysanthemum × koreanum* Hort. in vitro and in vivo. Subtropical and Ornamental Horticulture. 2019. Vol. 68. P. 178-183. DOI: 10.31360/2225-3068-2019-68-178-183
8. Margitay L., Palanytsia B., Terek O. Analysis of the results of spectrophotometric investigation of the photosynthetic pigments content in the plants leaves by using computer programs. Visnyk of L'viv Univ. Biology series. 2016. Vol. 41. P. 123-131.
9. Studying of the specific activity of antimicrobial drugs / ed. YuL Volianskyi. Kyiv, 2004. 38 p.
10. Ivashchenko I.V., Rakhmetov D.B., Ivashchenko O.A. Antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Artemisia abrotanum* L. (Asteraceae) at its introduction in Ukrainian Polissya. The Journal of Karazin Kharkiv National University. Series: biology. 2014. 21. 97-105.