

## ВИВЧЕННЯ МОНОСАХАРИДНОГО СКЛАДУ ЛИСТЯ КАБАЧКІВ МЕТОДОМ ГХ/МС ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇХ АНТИМІКРОБНОЇ АКТИВНОСТІ

Юсипенко О.О., Кисличенко В.С.

Національний фармацевтичний університет, м.  
Харків, Україна

### Актуальність

На даний час рослинні полісахариди все частіше розглядаються як активні фармацевтичні інгредієнти для створення лікарських препаратів та дієтичних добавок. Вони викликають постійний зростаючий інтерес завдяки своїй низькій токсичності, а також широкому спектру фармакологічної активності – мають антиатеросклеротичну, протизапальну, протівірусну, антимікробну, детоксикаційну, обволікаючу, антигіпоксичну, імунотропну, антиоксидантну, протипухлинну, актопротекторну та актопротекторну дію тощо. Більшість полісахаридів вищих рослин є імуномодуляторами, які активують ретикулоендотеліальну систему, збільшують фагоцитарний індекс, сприяють розмноженню клітин селезінки та кісткового мозку [1]. Численні дослідження останніх років показали, що полісахариди можуть безпосередньо викликати загибель ракових клітин за допомогою блокування клітинного циклу, ушкодження мітохондрій, апоптозу та ушкодження ДНК, тим самим виявляючи пряму протипухлинну дію. Також, полісахариди виявляють здатність знищувати пухлини опосередковано, активуючи імунні клітини, включаючи макрофаги, дендритні клітини та лімфоцити, що в кінцевому підсумку призводить до проліферації Т-клітин та вивільнення цитокінів для знищення пухлинних клітин [2, 3].

Враховуючи цінні фармакологічні, харчові та технічні властивості полісахаридів, перспективним є дослідження нових видів рослинної сировини, що містять цей клас біологічно активних речовин (БАР).

Аналіз літературних даних показав, що плоди кабаків (*Cucurbita pepo* ssp. *pepo* L.) родини гарбузові (*Cucurbitaceae*) є джерелом полісахаридів: цукрів, пектинових речовин та харчових волокон [4, 5]. Вміст цукрів у них становить 53,4-64,1% у перерахунку на суху речовину, вони представлені глюкозою (до 2,5%), фруктозою (до 0,2%) та сахарозою (до 0,4%). М'якуш кабаків - дієтичний продукт, він легко засвоюється організмом, не викликаючи подразнення шлунка і кишечника. Харчові волокна плодів кабаків добре адсорбують токсичні речовини та надлишок холестерину, виводять їх із організму. Плоди кабаків активізують процеси травлення, покращують моторну та секреторну функції шлунка та кишечника, перешкоджають розвитку атеросклерозу. Їх рекомендують включати в раціон харчування при захворюваннях нирок, печінки, шлунка та кишечника, а також при гіпертонії [4].

Проте відомостей щодо фітохімічного дослідження листя кабаків у доступній науковій

літературі майже не виявлено. Встановлено, що надземна частина кабаків містить амінокислоти [4]. Нами було проведено дослідження полісахаридів листя кабаків білоплодного та встановлено, що вміст суми полісахаридів в них становить  $18,08 \pm 0,99$  %, сума спирторозчинних полісахаридів -  $2,33 \pm 0,01$  %, сума водорозчинних полісахаридів -  $10,05 \pm 0,33$  %, сума пектинових речовин дорівнює  $14,63 \pm 0,88$  %, геміцелюлози А -  $9,84 \pm 0,51$  % та геміцелюлози Б -  $8,05 \pm 0,44$  % [6].

### Мета дослідження

Метою даного дослідження було вивчення якісного складу та кількісного вмісту моносахаридів листя кабаків із використанням методу газорідинної хромато-мас-спектрометрії (ГХ/МС), а також проведення дослідження антимікробної активності водного екстракту з означеної сировини.

### Матеріали та методи

Об'єктами дослідження було листя кабаків білоплодних, заготовлених у Харківській області (Україна) у серпні 2019-2020 років.

Для визначення моносахаридів в сировині методом ГХ/МС одержували ацетати альдонітрільних похідних вільних та зв'язаних моносахаридів після їх повного кислотного гідролізу [7-9].

Одержання вільних моносахаридів із досліджуваної сировини проводили таким чином: 0,200 мг сировини перетирали до порошкоподібного стану в скляній ступці. Наважку препарату поміщали до віали, додавали 10 мл розчину 80 % етанолу. Екстракцію вільних моносахаридів проводили на ультразвуковій бані при  $80$  °C впродовж 4 годин. Відбирали екстракт, упарювали досуха та ресуспендували додаванням водного розчину внутрішнього стандарту із розрахунку 250 мкг на пробу.

Для визначення загального моносахаридного складу до наважки препарату додавали 2 мл 2М трифтороцтової кислоти. Гідроліз проводили при  $100$  °C впродовж 6 годин. Відбирали 2 мл гідролізату, упарювали та промивали водою до видалення трифтороцтової кислоти. Ресуспендували додаванням водного розчину внутрішнього стандарту із розрахунку 250 мкг на пробу.

Для отримання альдонітрільних похідних моносахаридів екстракт/гідролізат, упарювали досуха на роторному випаровувачі та додавали 0,3 мл дериватизуючого реактиву (32мг/мл гідроксиламіну солянокислого в суміші піридин/метанол (4:1 v/v)). Розчинений екстракт витримували впродовж 25 хв. при  $75$  °C. Ацетилювання альдонітрільних похідних моносахаридів проводили впродовж 15 хв при  $75$  °C. До реакційної суміші додавали 1 мл дихлоретану, надлишок дериватизаційних реагентів видаляли подвійною екстракцією 1N розчином кислоти хлористоводневої та води очищеної. Дихлоретановий шар висушували досуха та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 v/v).

Хроматографічне вивчення досліджуваної сировини проводили на газорідинній хромато-мас-

спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA) у наступних умовах:

- колонка капілярна HP-5ms (30m×0,25mm×0,25mkm, Agilent technologies, USA);
- температура випаровувача - 250°C;
- температура інтерфейсу – 280°C;
- розділення проводили в режимі програмування температури - початкову температуру 160 °C витримували впродовж 8 хв., піднімали з градієнтом 5 °C/хв до 240 °C. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв.;
- пробу об'ємом 1 мкл, вводили в режимі поділу потоку 1:50;
- детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z);
- швидкість потоку газу носія через колонку 1,2 мл/хв.

Ідентифікацію проводили за часом утримання стандартів моносахаридів та з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. Як внутрішній стандарт використовували розчин сорбітолу.

Кількісний вміст моносахаридів (мг/г) розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_x \times m_{\text{внст}} \times V_{\text{роз}} \times 1000}{S_{\text{вст}} \times m \times V_{\text{екстр}}},$$

де:

$m_{\text{внст}}$  - наважка внутрішнього стандарту на пробу, мг,  
 $m$  - наважка препарату, мг,

$V_{\text{роз}}$  - об'єм розчинника для екстракції, мл,  
 $V_{\text{екстр}}$  - об'єм екстракту для дериватизації, мл,  
 $S_x$  - площа шуканої сполуки,  
 $S_{\text{вст}}$  - площа внутрішнього стандарту.

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 використовували 5 % водний розчин густого екстракту з листя кабачків, одержаний наступним чином: висушене і подрібнене сухе листя кабачків піддавали трикратній екстракції водою очищеною при загальному співвідношенні сировина:екстрагент 1:10 із врахуванням коефіцієнту поглинання розчинника (6,4 %) та загальній тривалості екстракції 4 години при температурі 80-90 °C. На першому етапі екстрагували протягом 2 годин при температурі 90 °C. Другу та третю екстракцію здійснювали впродовж 1 години кожна при температурі 90 °C. Після кожної екстракції відбувалось охолодження протягом 1 години, потім зливання суміші та її фільтрація для розділення шроту та екстракту. Одержані екстракти об'єднували, фільтрували та концентрували у вакуумі до одержання густого екстракту зеленувато-коричневого кольору з

характерним трав'янистим запахом. Вихід густого екстракту становив 19,8 % від повітряно-сухої сировини.

Для бактеріологічного дослідження використовували еталонні тест-культури: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885-653. Антимікробну активність препаратів визначали дифузійним методом «колодязів» із використанням середовища Мюллера-Хінтона з наступним вимірюванням діаметрів зон затримки росту мікроорганізмів. При оцінці антибактеріальної активності досліджуваної витяжки застосовували наступні критерії: відсутність росту або наявність зони затримки росту до 10 мм розцінювалась як відсутність чутливості, 10–15 мм – як низька, 15–25 мм – як помірна і перевищення 25 мм – як висока чутливість мікроорганізму до досліджуваного екстракту. Дослідження були проведені у трьох повторах [10].

### Результати та обговорення

Хроматограми виявлення моносахаридів та їх похідних у листі кабачків білоплодних наведені на рис. 1-2, а їх хроматографічні параметри - у табл. 1.

Як видно з даних таблиці 1, серед вільних вуглеводів ідентифіковані D-арабіноза, D-глюкоза, D-галактоза та D-сахароза. У сировині після кислотного гідролізу та дериватизації ацетильованими альдононітрилами виявлені D-рамноза, D-арабіноза, D-ксилоза, D-манноза, D-глюкоза, D-галактоза та D-фруктоза. Серед вільних моносахаридів у листі кабачка домінувала D-сахароза (11,09 мг/г), також встановлено вміст D-глюкози (1,38 мг/г), D-галактози (0,11 мг/г) і D-арабінози (0,09 мг/г). У листі кабачків після гідролізу виявлено та визначено вміст D-глюкози (32,39 мг/г), D-галактози (8,26 мг/г), D-арабінози (2,84 мг/г), D-ксилози (2,68 мг/г) та D-рамнози (2,37 мг/г), D-манози (1,25 мг/г) і D-фруктози (0,53 мг/г).

Глюкоза є джерелом енергії для багатьох організмів, від бактерій до людей. Для кращого функціонування мозок щоденно потребує 75 % глюкози, вона також потрібна для утворення червоних кров'яних клітин та нейронів. Ксилоза має протигрибкові та антибактеріальні властивості щодо видів *Candida* та грамнегативних організмів. На відміну від сахарози, ксилоза сприяє зростанню «дружньої флори» в кишечнику, таким чином посилюючи виробництво та всмоктування всіх харчових продуктів і зміцнюючи імунну систему. Арабіноза є поширеним компонентом клітинних стінок рослин і широко поширена у рослинному світі. Вона потенційно може використовуватися як харчова добавка для підтримки гарного здоров'я та запобігання ожирінню [7].

Результати визначення антимікробної активності водної витяжки з листя кабачків білоплодних наведено на рис. 3.

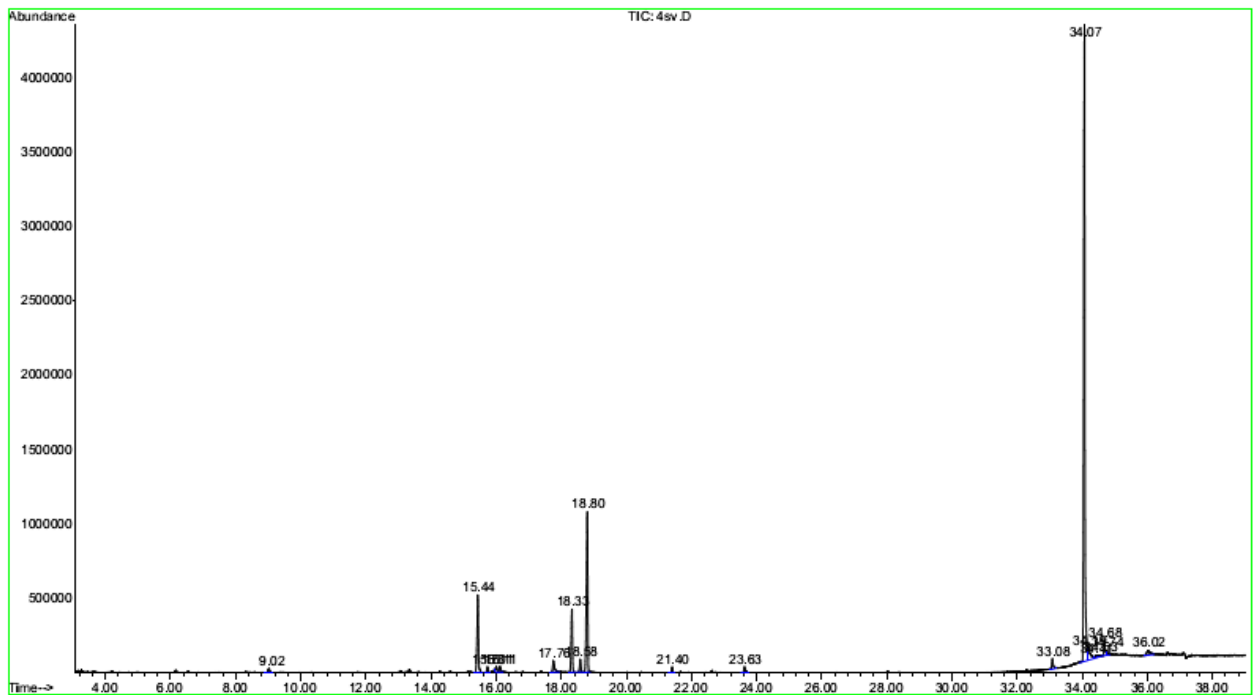


Рис. 1. ГХ/МС-хроматограма вільних моносахаридів та їх похідних у листі кабачків білоплідних

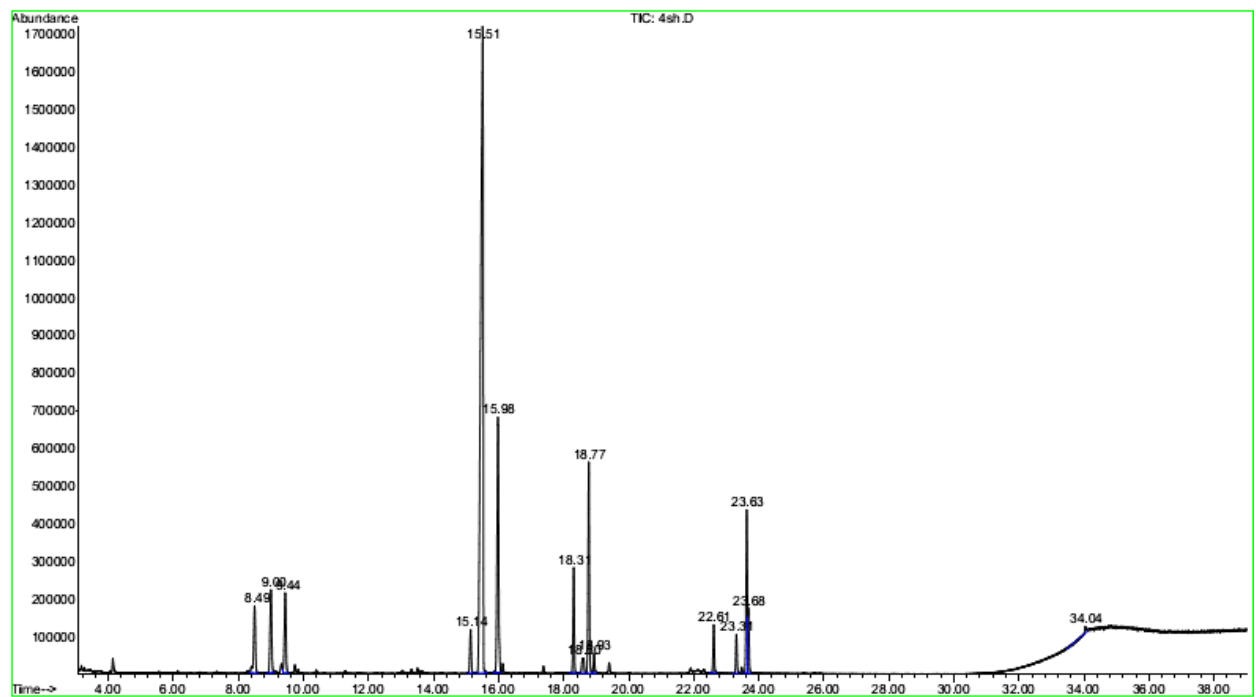
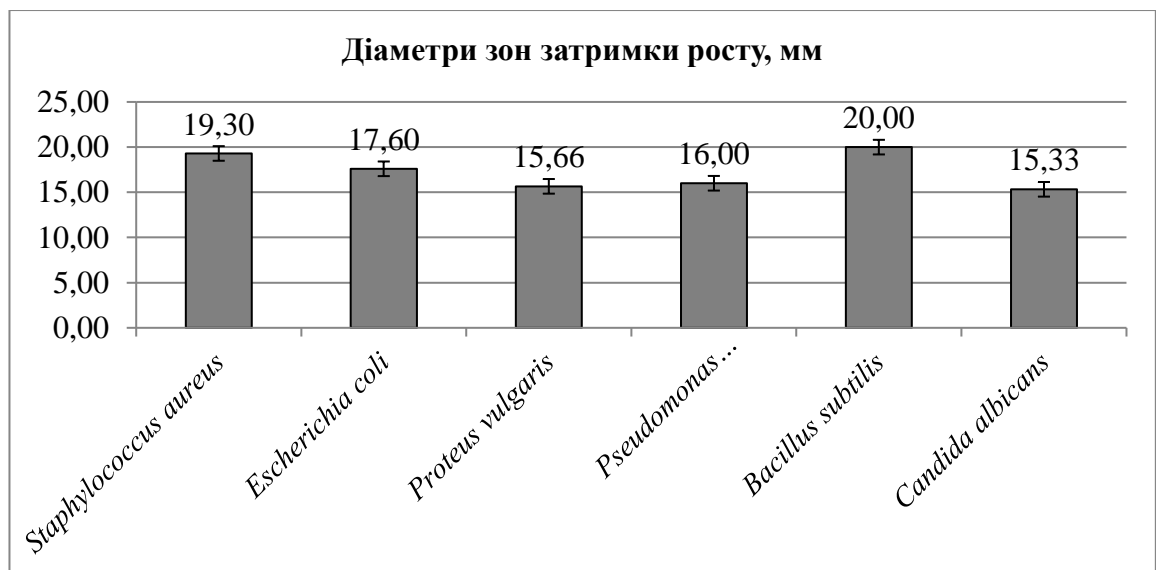


Рис. 2. ГХ/МС-хроматограма загальних моносахаридів та їх похідних у листі кабачків білоплідних

**Таблиця 1. Хроматографічні параметри для визначення моносахаридів та їх похідних у листі кабачків білоплідних**

Назва сполуки	Час утримання	Вільні моносахариди		Загальні моносахариди	
		площа піку	вміст, мг/г	площа піку	вміст, мг/г
D-Рамноза	8,51	0	0,00	6584267	2,37
D-Арабіноза	9,01	940342	0,09	7907385	2,84
D-Ксилоза	9,44	0	0,00	7444101	2,68
D-Маноза	15,13	0	0,00	3486881	1,25
D-Глюкоза	15,51	14757353	1,38	90061631	32,39
Етил-тетра-О-ацетил- $\alpha$ -D-глюкопіранозид	15,73	955785	0,09	0	0,00
D-Галактоза	15,98	1131794	0,11	22963394	8,26
Лікопіранози тетраацетат	17,77	3128616	0,29	0	0,00
Міоїнозиту гексаацетат	18,34	11771313	1,10	7582669	2,73
D-манітолу гексаацетат	18,32	2298996	0,22	0	0,00
$\alpha$ -D-рібопіранозиду метилтріацетат	18,62	0	0,00	1972788	0,71
Сорбіт	18,77	32308198	внутрішній стандарт	15446107	внутрішній стандарт
D-Фруктоза	18,93	0	0,00	1466060	0,53
Феніл-2,5-ди-О-ацетил-1-тіо- $\alpha$ -D-глюкофуранозид-уроно-6,3-лактон	21,44	816091	0,08	0	0,00
Целобіози октаацетат	22,62	0	0,00	3518884	1,27
Тетра-О-ацетил-феніл- $\alpha$ -D-гулофуранозид	23,33	0	0,00	2735046	0,98
Тетра-О-ацетил-феніл- $\alpha$ -D-гулофуранозид	23,67	1274786	0,12	12414285	4,47
1-Аліл-2,3-5,6-тетра-О-ацетил-45-маннофуранозид	23,69	0	0,00	3979996	1,43
Саліцину 2',3',4',6'-тетраацетат- $\alpha$ -О-саліцилату ацетат	33,08	1991662	0,19	0	0,00
D-Сахароза	34,07	1,18E+08	11,09	0	0,00



**Рис. 3. Діаграма результатів вивчення антимікробних властивостей витяжки з листя кабачків білоплідних (екстрагент – вода очищена),  $p < 0,05$**

Аналіз даних рис. 3 свідчить, що водна витяжка з листя кабачків проявляє достовірно виражену антимікробну активність відносно усіх тест-штамів мікроорганізмів.

Отримані результати свідчать про перспективність подальших досліджень в обраному напрямку для розробки на основі листя кабачків нових антимікробних засобів.

#### Висновки

Уперше проведено дослідження моносахаридного складу листя кабачків. Одержані результати показують перспективність їх подальшого поглибленого дослідження. Крім того, досить висока антимікробна активність листя кабачків білоплідних дозволяє припустити можливість створення на їх основі лікарського засобу антимікробної дії. Одержані дані можуть бути також використані для стандартизації та розробки методів контролю якості на досліджувану сировину.

#### Study of the monosaccharide composition of vegetable marrow leaves by the GC/MS method and determination of their antimicrobial activity

Olena Iosypenko, Viktoriia Kyslychenko

**Introduction.** Vegetable marrow (*Cucurbita pepo* L. ssp. *pepo* L.) of *Cucurbitaceae* family is a source of polysaccharides: sugars, pectins and dietary fibers. They are easily absorbed by the body, without causing irritation of the gastric and intestines. Dietary fibers of vegetable marrow fruits adsorb toxic substances and excess cholesterol well, remove them from the body. Vegetable marrow fruits activate digestion processes, improve the motor and secretory functions of the gastric and intestines, and prevent the development of atherosclerosis. They are recommended to be included in the diet for the kidneys, liver, gastric and intestines diseases, as well as for treatment of hypertension. However, there is almost no information on the phytochemical study of vegetable marrow leaves in the available scientific literature. **The aim of the work** was to identify and assay of carbohydrates by gas chromatography/mass spectrometry method (GC/MS) of vegetable marrow leaves, as well as conducting a study of the antimicrobial activity of an aqueous extract from the specified raw material. **Material & methods.** The raw materials used for research were harvested in August 2020 in Kharkiv region (Ukraine). The monosaccharides composition was determined by GC/MS method on gas chromatograph Agilent 6890N with 5973inert mass detector (Agilent Technologies, USA). Samples were analyzed on a capillary column HP-5MS of 30 m length and an internal diameter of 0.25 mm, the thickness of the stationary phase was 0.25  $\mu$ m. The first set up was at oven temperature of 160°C and held for 8 min, then raised to 240°C at the rate of 5°C/min and kept at this point for 6 min. Helium was used as a carrier gas at a constant flow rate of 1.2 cm<sup>3</sup>/min. Detection was performed in the SCAN mode at the width range of 38–400 m/z. Identification of monosaccharides was based on comparing their retention times with retention times of standards of the mass spectral library NIST 02.

Quantitative analysis was performed by adding a solution of the internal standard to the tested samples. Sorbitol solution was used as an internal standard. Reference test cultures were used for bacteriological research: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Candida albicans* ATCC 885-653. The antimicrobial activity of the preparations was determined by the diffusion method of "wells" using the Muller-Hinton medium followed by the measurement of the diameters of the zones of inhibition of the growth of microorganisms. When evaluating the antibacterial activity of the tested extract, the following criteria were used: the absence of growth or the presence of a zone of growth retardation up to 10 mm was considered as a lack of sensitivity, 10–15 mm as low, 15–25 mm as moderate, and exceeding 25 mm as high sensitivity of the microorganism to the studied extract. Experiments were carried out in three repetitions. **Results & discussion.** The GC/MS method was used to determine the qualitative composition and quantitative content of carbohydrates in vegetable marrow leaves. Free carbohydrates included D-arabinose, D-glucose, D-galactose and D-saccharose were identified. D-rhamnose, D-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-glucose, D-galactose and D-fructose were also identified in plant raw material after acidic hydrolysis and derivatization with acetylated aldononitriles. Free carbohydrate D-saccharose was present in vegetable marrow leaves in the greatest amount (11.09 mg/g). In the vegetable marrow leaves predominant ones were D-glucose 1.38 mg/g, D-galactose 0.11 mg/g and D-arabinose 0.09 mg/g. Also, monosaccharides after hydrolysis in the vegetable marrow leaves were identified. In the raw material the prevailing ones were D-glucose (32.39mg/g), D-galactose (8.26 mg/g), D-arabinose (2.84 mg/g), D-xylose (2.68 mg/g), D-rhamnose (2.37 mg/g), D-mannose (1.25 mg/g) and D-fructose (0.53 mg/g). Aqueous extract from vegetable marrow leaves showed a reliably pronounced antimicrobial activity against all test strains of microorganisms. **Conclusions.** The monosaccharide composition of vegetable marrow leaves was studied for the first time. The obtained results show the prospects of their further in-depth study. In addition, the fairly high antimicrobial activity of the leaves of white-fruited vegetable marrow suggests the possibility of creating an antimicrobial medicinal product based on them. The obtained data can also be used for standardization and development of quality control methods for the studied raw materials. **Keywords:** vegetable marrow, leaves, monosaccharide, gas chromatography/mass spectrometry method, antimicrobial activity.

#### References:

1. Krishtanova N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.C., Pavlova E.D., Sakanyan E.I. The prospects of the use of vegetable polysaccharides as medical and medical and preventive drugs // Proceedings of Voronezh State University. Chemistry. Biology. Pharmacy. 2005. № 1. P. 212-221. URL: <http://elibrary.lt/resursai/Uzsienio%20leidiniai/Vor>

[onezh/him/2005-01/him0501\\_39.pdf](#)

2. Hui Xu, Xiaojuan Xu. Polysaccharide, a potential anticancer drug with high efficacy and safety // Journal of Oncology Research and Treatments. 2016. Vol. 1:2. P. 1-2. URL: <https://www.omicsonline.org/open-access/polysaccharide-a-potential-anticancer-drug-with-high-efficacy-and-safety-.pdf>
3. Murtazina A.S., Tarabaeva A.S., Bishimbaeva N.K. Potential of plant polysaccharides in the treatment and prevention of cancer // Vestnik KazNMU. 2019. № 4. P. 350-357. URL: <https://kaznmu.kz/press/wp-content/uploads/2020/03/887961.pdf>
4. Lim T.K. Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants. Volume 2, Fruits. Springer, 2012. 1113 p. doi: [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0\\_42](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1764-0_42)
5. Puzik L.M. Changes in the components of the chemical composition of zucchini fruits depending on the characteristics of the variety, their size and storage conditions // The Bulletin of the Kharkiv national agricultural university of V. V. Dokuchaeva. 2011. № 6. P. 30-47. URL: <http://hdl.handle.net/123456789/239>
6. Iosypenko E.A., Kyslychenko V.S., Omelchenko Z.I. Study of polysaccharides of zucchini leaves // Medical science of the XXI century – looking towards the future: materials of the 67th annual international scientific and practical conference (November 29, 2019, Dushanbe (Tajikistan)). Dushanbe, 2019. Vol. 3. P. 153-155. URL: <https://www.tajmedun.tj/Uploads/documents/TOM-3.pdf>
7. Marchyshyn S., Budniak L., Slobodianiuk L., Ivasiuk I. Determination of carbohydrates and fructans content in *Cyperus esculentus* L. // Pharmacia. 2021. Vol. 68(1). P. 211-216. doi: <https://doi.org/10.3897/pharmacia.68.e54762>
8. Guerrant, G.O., Moss, C.W. Determination of monosaccharides as aldonitrile, O-methylxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography // Analytical Chemistry. 1984. Vol. 56. P. 633–638. doi: <https://doi.org/10.1021/ac00268a010>
9. Chen Y., Xie M.Y., Wang Y.X., Nie S.P., Li C. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography // Phytochem Anal. 2009. Vol. 20(6). P. 503-10. doi: <https://doi.org/10.1002/pca.1153>
10. Volyanskiy Y.L., Gritsenko I.S., Shyrokobokov V.P. [et al.]. The study of the specific activity of antimicrobial drugs: a method. recommendations. K. : StEntScPhC Ministry of Helthcare of Ukraine, 2004. 38 p.