

УДК 615.3:582.711.713:543.544.3

Л. В. Ленчик, І. В. Сенюк, Башар Джаббар Алі-Сахлані

Національний фармацевтичний університет

## ВИЗНАЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ *PRUNUS DOMESTICA* ТА ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У СИРОВИНІ

Методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором був вивчений якісний склад та вміст органічних кислот у листі сливи. При хроматографуванні використовували хроматографічну колонку – INNOWAX діаметром 0,25 мм і завдовжки 30 м. Швидкість газу-носія (гелій): 1,2 мл/хв; температура нагрівача – 250 °С. Температура термостату програмувалася від 50 до 250 °С зі швидкістю 4 °С/хв. Встановлено наявність і визначено кількісний вміст 29 органічних кислот. Всього сировина містила 3,00 % органічних кислот, у тому числі (%) – 0,56 жирних; 1,66 ди- і трикарбонових; 0,10 фенолкарбонових і 0,63 оксокислот (левулінової). Серед карбонових кислот вміст лимонної, яблучної і щавлевої кислот був найбільшим – 5520,954; 4737,60 і 4591,85 мг/кг, відповідно. Ліноленова і пальмітинова кислоти переважали серед жирних кислот, (мг/кг) 3039,44 і 1545,76 відповідно. Серед фенольних кислот в найбільшій кількості містилася бензойна кислота (226,08 мг/кг). З листя сливи був отриманий густий екстракт та вивчено його гостру токсичність за експрес-методом Пастушенко Т. В. на мишах та щурах. Встановлено, що екстракт є безпечним засобом та за класифікацією Сидорова К. К. відноситься до VI класу токсичності.

**Ключові слова:** слива; листя; газова хроматографія; органічні кислоти; гостра токсичність

### ВСТУП

Слива домашня (лат. *Prunus domestica*) родини *Rosaceae* широко розповсюджена на території України, має багато районованих і місцевих сортів та за кількістю насаджень поступається лише яблуні, груші та вишні. Згідно з літературними даними плоди сливи містять 6-17 % цукрів, до 8 % пектинових речовин, органічні кислоти (яблучну, лимонну, щавлеву, бурштинову, хінну) – до 1,6 %, флавоноїди, дубильні речовини, вітаміни [5, 8, 14]. Ядра кісточок містять жирну олію до 42 %, яка використовується в медицині під назвою «персикова олія» *Oleum Persicorum* [4]. Хімічний склад листя сливи вивчений недостатньо.

У НФаУ з листя сливи був отриманий густий екстракт та проведено скринінгове визначення його біологічної активності [2]. Серед біологічно активних речовин екстракту, що можуть бути відповідальними за фармакологічні ефекти екстракту, є органічні кислоти. З літературних джерел відомо, що, наприклад, ферулова кислота має сильну антиоксидантну дію, гальмує процеси перекисного окиснення ліпідів у біомембранах, виявляє протизапальний ефект, обумовлений блокуванням специфічних рецепторів медіаторів запалення. Хлорогенова кислота виявляє різну протизапальну та антиоксидантну активність

[11]. Бурштинова кислота чинить адаптогенну дію, впливає на синтез білка та гемоглобіну [3, 9, 12, 13, 14, 15].

Метою нашого дослідження було вивчення якісного складу та вмісту органічних кислот у листі сливи домашньої для створення методів контролю якості на сировину та визначення гострої токсичності отриманого екстракту з листя сливи.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом досліджень було листя сливи домашньої сорту «Угорка донецька». Заготівлю листя проводили в Харківській області у серпні 2014 року після збору плодів.

Вивчення якісного складу і вмісту органічних кислот у листі сливи було проведено методом газової хроматографії з мас-детектуванням на п'яти серіях сировини [1].

До 50 мг листя сливи у віалі на 2 мл додавали внутрішній стандарт (50 мкг тридекану в гексані) і додавали 1,0 мл метилюючого агента (14 %  $\text{BCl}_3$  в метанолі, Supelco 3-3033). Суміш витримували в герметично закритій віалі впродовж 8 год при 65 °С. За цей час з рослинного матеріалу відбувалася повна екстракція жирної олії, проходив її гідроліз на складові жирні кислоти та їх метилювання. Одночасно метилюванню піддавалися вільні органічні та фенолкарбонові кислоти [10].

Реакційну суміш зливали з осаду рослинного матеріалу і розбавляли 1 мл води очищеної. Для вилу-

© Ленчик Л. В., Сенюк І. В., Башар Джаббар Алі-Сахлані, 2016

чення метилових естерів додавали 0,2 мл хлористого метилену, обережно струшували кілька разів протягом години, а потім хроматографували отриманий екстракт. Пробу (2 мкл) вводили в хроматографічну колонку в режимі splitless, тобто без поділу потоку, що дозволяло ввести пробу без втрати на поділ і істотно збільшити чутливість методу хроматографування. Швидкість введення проби складала 1,2 мл/хв протягом 0,2 хв.

Вміст органічних кислот визначали на хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973 при таких параметрах: колонка – капілярна INNOWAX, внутрішній діаметр – 0,25 мм, довжина – 30 м, газ-носії – гелій, швидкість потоку – 1,2 мл/хв. Температура нагрівача введення проби – 250 °C. Температура термостату запрограмована від 50 до 250 °C зі швидкістю 4 град/хв. Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеку мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів більше 470000 в поєднанні з програмами для ідентифікації AMDIS і NIST. Кількісні розрахунки проводили за методом внутрішнього стандарту. Вміст компонентів С (мг/кг) визначали за формулою:

$$C = \frac{P_1}{P_2} \cdot \frac{50}{M},$$

де:  $P_1$  – площа піку досліджуваної речовини;  $P_2$  – площа піку стандарту; 50 – маса внутрішнього стандарту (мкг), введеного в зразок;  $M$  – наважка сировини, мг.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням пакету Statistica 6.0. Похибка не перевищувала 5 %.

Вивчення гострої токсичності екстракту з листя сливи домашньої проводили за експрес-методом Пасушенко Т. В. із співавторами на мишах та щурах [6].

Було проведено п'ять серій експериментів, для кожної серії використовували білих безпородних мишей (по три особини в кожній серії) обох статей вагою 20-25 г. Досліджуваний екстракт вводили внут-

рішньошлунково. За тваринами спостерігали впродовж тижня.

Тваринам першої групи досліджуваний екстракт вводили в дозі 3000 мг/кг; другої групи – 5000 мг/кг; третьої групи – 10000 мг/кг; четвертої групи – 15000 мг/кг і тваринам п'ятої групи досліджувану субстанцію вводили в дозі 20000 мг/кг.

Для подальшого вивчення гострої токсичності екстракту з листя сливи було обрано парентеральний (внутрішньоочеревинний) шлях введення.

Для орієнтовного визначення летальних доз досліджуваний екстракт вводили тваринам в дозах 1000, 2000, 3000, 4000 та 5000 мг/кг. Загибель тварин спостерігали при введенні екстракту з листя сливи, починаючи з дози 3000 мг/кг. Для визначення  $LD_{50}$  екстракту з листя сливи домашньої проводили випробування відповідно до методики: досліджуваним тваринам вводили субстанцію в дозах 2830, 3160, 3550, 3980, 4470 мг/кг та спостерігали за ефектом.

Визначали також  $LD_{50}$  для щурів. Досліджувану субстанцію вводили дослідним тваринам у дозах 2820, 3160, 3550, 3980, 4470, 5000 мг/кг.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В листі сливи було встановлено наявність 29 органічних кислот. Хроматограма витяжки листя сливи зображена на рисунку.

Результати досліджень наведені у табл. 1.

Загалом сировина містила 3,00 % органічних кислот, включаючи (%) 0,56 жирних; 1,66 ди- та трикарбонових; 0,10 фенольних кислот та 0,63 оксокислот (левулінову кислоту). Найбільшим у листі сливи був вміст левулінової кислоти (6345,81 мг/кг), яка відноситься до оксокислот, відома як консервант і має антисептичні властивості.

Серед ди- та трикарбонових кислот значним був вміст (мг/кг) лимонної, яблучної та оксалатної кислот – 5520,954; 4737,60 та 4591,85 мг/кг відповідно. Найбільшим серед жирних кислот був вміст серед ненасичених кислот – ліноленої кислоти 3039,44 мг/кг,

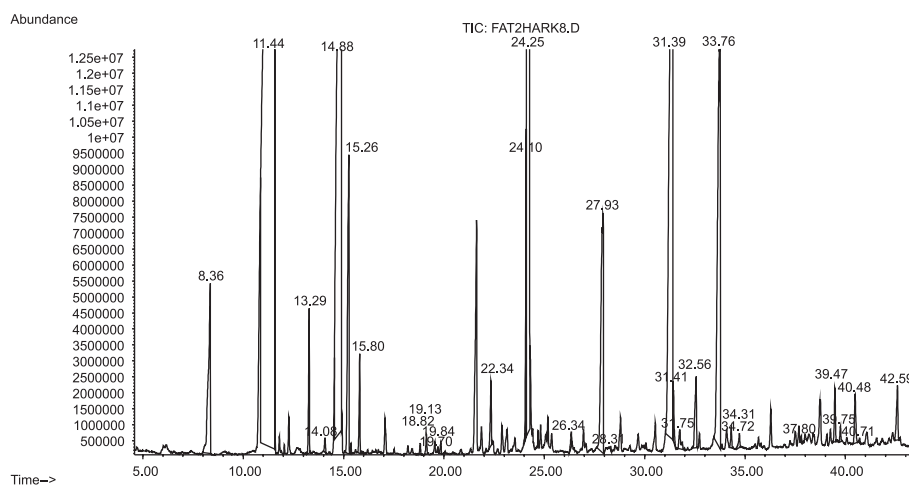
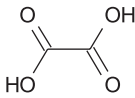
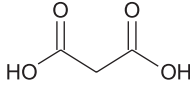
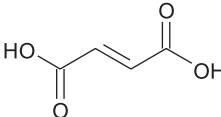
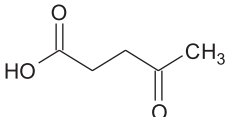
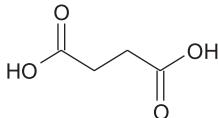
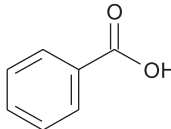
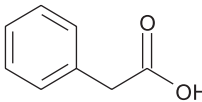
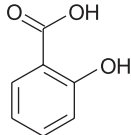
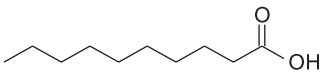
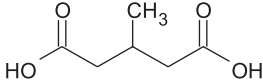
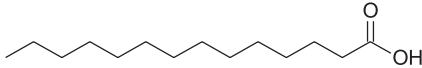
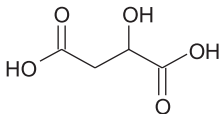
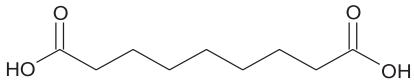
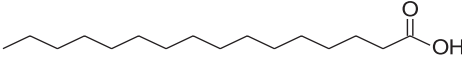


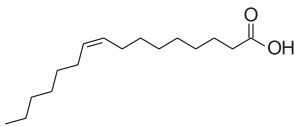
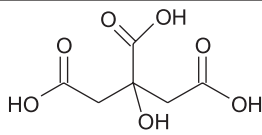
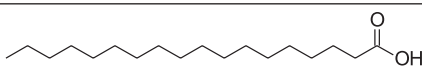
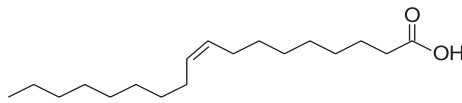
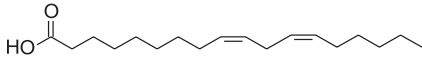
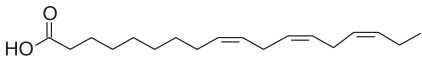
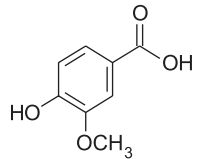
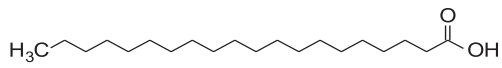
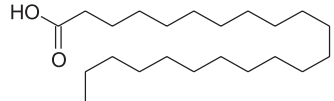
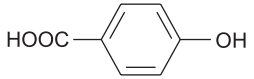
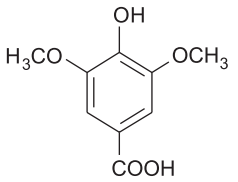
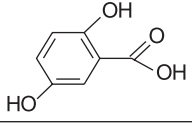
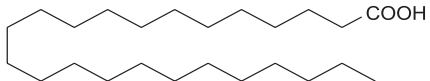
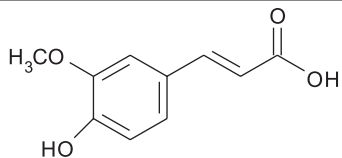
Рис. Хроматограма визначення органічних кислот у листі сливи домашньої.

Таблиця 1

## РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У ЛИСТІ СЛИВИ

Назва кислоти	Формула	Час утримання, хв	Вміст, мг/кг
1	2	3	4
Оксалатна		11,442	4591,85
Малонова		13,288	324,35
Фумарова		14,08	41,05
Левулінова		14,883	6345,81
Бурштинова		15,262	1151,88
Бензойна		15,798	226,08
Фенілоцтова		18,815	28,62
Саліцилова		19,127	55,76
Лауринова		19,702	14,59
2-Окси-3-метил бурштинова		19,841	29,38
2-Гідрокси-3-метилглутарова		22,345	201,86
Міристинова		24,096	406,51
Яблучна		24,247	4737,60
Азелаїнова		26,344	46,37
Пальмітинова		27,933	1545,76

Продовження табл. 1

1	2	3	4
Пальмітолеїнова		28,312	7,72
Лимонна (цитринова)		31,391	5520,95
Стеаринова		31,408	146,96
Олеїнова		31,748	101,07
Линолева		32,562	295,01
Линоленова		33,761	3039,44
Ванілінова		34,313	60,10
Арахінова (ейкозанова)		34,72	53,46
Бегенова		37,804	17,96
п-Гідроксибензойна		39,472	157,28
Бузкова		39,745	43,49
Гентизинова		40,481	182,26
Тетракозанова		40,71	14,05
Ферулова		42,595	211,87

Таблиця 2

**РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ  
ТОКСИЧНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ  
СЛИВИ НА МИШАХ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМУ  
ВВЕДЕННІ**

Доза екстракту, мг/кг	Кількість тварин у групі	Летальність/ кількість тварин
3000	3	0/3
5000	3	0/3
10000	3	0/3
15000	3	0/3
20000	3	0/3

серед насичених – пальмітинової – 1545,76 мг/кг. Вміст фенольних кислот був загалом значно нижчим, ніж ди- та трикарбонівих і жирних. Серед них домінувала бензойна кислота – 226,08 мг/кг.

Стосовно вивчення гострої токсичності екстракту з листя сливи домашньої спостерігали зазначені далі прояви. У першу добу у тварин першої групи спостерігалось незначне пригнічення локомоції, у деяких тварин – з'єрошеність хутра, вказані прояви зникали протягом найближчих 3-5 год. Всі тварини вижили. У тварин другої групи спостерігалось незначне пригнічення рухової активності, відсутність апетиту. Вказані прояви повністю зникали наступної доби. Всі тварини вижили. Стан тварин задовільний. У тварин третьої групи спостерігалися пригнічення рухової активності, відмова від корму та води, з'єрошеність хутра. Всі перелічені ознаки зникли протягом двох діб. Всі тварини вижили та знаходилися у задовільному стані. Протягом першої доби у тварин четвертої групи спостерігалось: значне пригнічення рухової активності, відмова від корму, хода невірна, хутро з'єрошене. Спостереження показали, що стан тварин нормалізувався протягом трьох діб: відновлювався апетит, рухова активність, хутро рівномірне, гладеньке, блискуче. Всі тварини вижили. У тварин п'ятої групи спостерігалось різке пригнічення локомоції, відмова від корму та води, описані явища зникали протягом 3-5 діб після введення екстракту. Всі тварини вижили.

Найвища доза, що вводилася дослідним тваринам, склала 20000 мг/кг, при цьому загибель тварин не спостерігалась, подальше збільшення дози було ускладнене. Результати проведення експериментальних дослідів наведені в табл. 2.

Отримані експериментальні дані свідчать про дуже низьку токсичність досліджуваної субстанції при одноразовому внутрішньошлунковому введенні, тому при проведенні дослідів на щурах тваринам вводили максимальну дозу 20000 мг/кг, при цьому загибель тварин не спостерігалась.

Таким чином, визначити LD<sub>50</sub> досліджуваної субстанції для перорального введення не вдалося. Той факт, що LD<sub>50</sub> досліджуваного екстракту для перорального введення перевищує для щурів та мишей

Таблиця 3

**РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ  
ТОКСИЧНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ  
СЛИВИ ДОМАШНЬОЇ НА МИШАХ ПРИ  
ВНУТРІШНЬООЧЕРЕВИННОМУ ВВЕДЕННІ**

Доза екстракту, мг/кг	Кількість тварин у групі	Летальність/ Кількість тварин
2820	3	0/0
3160	3	1/3
3550	3	2/3
3980	3	2/3
4470	3	3/3

Таблиця 4

**РЕЗУЛЬТАТИ ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ  
ТОКСИЧНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ  
СЛИВИ ЗВИЧАЙНОЇ НА ЩУРАХ ПРИ  
ВНУТРІШНЬООЧЕРЕВИННОМУ ВВЕДЕННІ**

Доза екстракту, мг/кг	Кількість тварин у групі	Летальність/ Кількість тварин
2820	3	0/3
3160	3	0/3
3550	3	1/3
3980	3	1/3
4470	3	2/3
5000	3	2/3

15000 мг/кг, дозволяє віднести екстракт з листя сливи домашньої згідно з класифікацією К. К. Сидорова [7] до класу практично нешкідливих сполук.

При подальшому вивченні гострої токсичності, як свідчать експериментальні дані (табл. 3), LD<sub>50</sub> для мишей при внутрішньоочеревинному введенні знаходиться в інтервалі 3160-3980 мг/кг. За найменшою дозою зазначеного інтервалу було встановлено, що LD<sub>50</sub> для мишей при внутрішньоочеревинному введенні склала 3430 (2780-4070) мг/кг.

Результати вивчення гострої токсичності екстракту з листя сливи домашньої на щурах при внутрішньоочеревинному введенні надані у табл. 4.

Було встановлено, що LD<sub>50</sub> досліджуваної субстанції для щурів знаходиться в інтервалі доз 3980-5000 мг/кг. Аналіз експериментальних даних (табл. 4) показав, що LD<sub>50</sub> для щурів при внутрішньоочеревинному введенні складає 4310 (3510-5120) мг/кг.

### ВИСНОВКИ

Методом хроматомас-спектрометрії встановлено наявність 29 органічних кислот та визначено їх вміст у листі сливи домашньої.

Екстракт з листя сливи домашньої є безпечним засобом та за класифікацією Сидорова К. К. відноситься до VI класу токсичності.

Результати даного дослідження розширюють відомості про біологічно активні речовини листя сливи домашньої та можуть використовуватися при ство-

ренні методик контролю якості на сировину та для подальшого поглибленого вивчення фармакологічної активності отриманого екстракту.

#### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
2. Загайко А. Л. Вивчення антиоксидантної активності екстракту з листя сливи звичайної / А. Л. Загайко, І. В. Сенюк, Л. В. Ленчик, Р. М. Галімулін // УБФЖ. – 2014. – № 1 (30). – С. 25-28.
3. Коваленко А. Л. Янтарная кислота: фармакологическая активность и лекарственные формы / А. Л. Коваленко, Н. В. Белякова // Фармация. – 2000. – № 5. – С. 40-43.
4. Компендиум 2011 – лекарственные препараты. / Под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: «МОРИОН», 2011. – 2320 с.
5. Лікарські рослини: [енциклопедичний довідник] / Відп. ред. А. М. Гродзінський. – К.: Вид-во «Українська енциклопедія» ім. М. П. Бажана, Укр. виробничо-комерц. центр «Олімп», 1992. – 544 с.
6. Пастушенко Т. В. Экспресс-метод определения среднесмертельных доз химических веществ / Т. В. Пастушенко, П. Б. Маруший, А. А. Жуков // Гигиена и санитария. – 1985. – № 6. – С. 46-49.
7. Сидоров К. К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / К. К. Сидоров // Токсикология новых химических веществ. – М.: Медицина, 1973. – Вып. 13. – С. 47-57.
8. Упир Л. В. Слива. В кн.: Фармацевтична енциклопедія / Голова ред. ради та автор передмови В. П. Черних. – 2-ге вид., перероб. і доп. – К.: «МОРИОН» 2010. – С. 1290.
9. Belkaid A. The chemopreventive properties of chlorogenic acid reveal a potential new role for the microsomal glucose-6-phosphate translocase in brain tumor progression / Anissa Belkaid // Cancer Cell Intern. – 2006. – Vol. 6, № 7. – P. 14752867.
10. Carrapiso A. Lipids, development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification / A. Carrapiso, C. Garcia // Lipids. – 2000. – Vol. 35 (11). – P. 1167-1177.
11. El-Medany A. Chlorogenic acid as potential anti-inflammatory analgesic agent: an investigation of the possible role of nitrogen-based radicals in rats / Azza El-Medany // Intern. J. of Pharmacol. & Toxicol. Sci. – 2011. – Vol. 1. – P. 24-33.
12. Itagaki Sh. In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors / [Shirou Itagaki, Toshimitsu Kurokawa, Chie Nakata et al.] // Food Chemistry. – 2009. – Vol. 114. – P. 466-471.
13. Kashmira Gohil J. Ferulic acid – a comprehensive pharmacology of an important bioflavonoid / J. Gohil Kashmira, B. Kshirsagar Shashank, S. Sahane Rajkumari // IJPSR. – 2012. – Vol. 3 (1). – P. 700-710.
14. Kayano Shin-ichi. Antioxidant Activity of Prune (*Prunus domestica* L.) Constituents and a New Synergist / Shin-ichi Kayano / J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, № 13. – P. 3708-3712.
15. Merkl R. Antimicrobial and Antioxidant Properties of Phenolic Acids Alkyl Esters / R. Merkl, I. Hhádková, V. Filip, J. Šmidrkal // Czech. J. Food Sci. – 2010. – Vol. 28, № 4. – P. 275-279.

**УДК 615.3:582.711.713:543.544.3****Л. В. Ленчик, И. В. Сенюк, Башар Джаббар Али-Сахлани****ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ *PRUNUS DOMESTICA* И ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СЫРЬЕ**

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором был изучен качественный состав и содержание органических кислот в листьях сливы. При хроматографировании использовали хроматографическую колонку – INNOWAX, диаметром 0,25 мм и длиной 30 м. Скорость газа-носителя (гелий): 1,2 мл/мин; температура нагревателя – 250 °С. Температура термостата программировалась от 50 до 250 °С со скоростью 4 °С/мин. Установлено наличие и определено количественное содержание 29 органических кислот. Всего сырье содержало 3,00 % органических кислот, в том числе (%) – 0,56 жирных; 1,66 ди- и трикарбоновых; 0,10 фенолкарбоновых и 0,63 оксокислот (левулиновой). Среди карбоновых кислот содержание лимонной, яблочной и щавелевой кислот было наибольшим – 5520,954; 4737,60 и 4591,85 мг/кг, соответственно. Линоленовая и пальмитиновая кислоты преобладали среди жирных кислот, (мг/кг) 3039,44 и 1545,76 соответственно. Среди фенольных кислот в наибольшем количестве содержалась бензойная кислота (226,08 мг/кг). Из листьев сливы был получен густой экстракт и изучена его острая токсичность экспресс-методом Пастушенко Т. В. на мышах и крысах. Установлено, что экстракт является безопасным средством и по классификации Сидорова К. К. относится к VI классу токсичности.

**Ключевые слова:** слива; листья; газовая хроматография; органические кислоты; острая токсичность

**UDC 615.3:582.711.713:543.544.3****L. V. Lenchik, I. V. Senyuk, Bashar Al-Jabbar Ali Sahlani****STUDY OF ACUTE TOXICITY OF *PRUNUS DOMESTICA* LEAVES EXTRACT AND ORGANIC ACIDS IN RAW MATERIAL**

Content and quantitative composition of the organic acid in plum leaves have been studied by Gas chromatography mass spectrometry on Agilent Technologies 6890 chromatograph with mass spectrometric detector 5973; chromatography column – INNOWAX, capillary diam. 0.25 mm and a length of 30 m; the rate of carrier gas (helium): 1.2 ml/min; heater temperature – 250 °C; thermostat temperature was programmed from 50 to 250 °C with a speed of 4 °C/min. 29 organic acids were established. Overall, plant raw material contained 3.00 % of the organic acids, including (%) – 0.56 fatty; 1.66 di- and three carboxylic; 0.10 phenol carboxylic acids and 0.63 phenolcarboxylic oxoacid (levulinic). Linolenic and palmitic acid prevailed among fatty acids (mg/kg) 3039.44 and 1545.76, respectively. Among the phenolic acids, the most abundant was benzoic acid (226.08 mg/kg). Among the carboxylic acids, citric, malic and oxalic acids were the largest with – 5520.954; 4737.60 and 4591.85 mg/kg, respectively. Soft extract was obtained from the plum leaves and the study of its acute toxicity was carried out by Pastushenko T. V. express method on mice and rats. It was found that the extract is safe and it refers to a Class VI toxicity on the classification K. K. Sidorov.

**Key words:** plum; leaves; gas chromatography mass spectrometry; organic acids; acute toxicity

Адреса для листування:  
61118, м. Харків, вул. Валентинівська, 4.  
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.11.2015 р.