

ФАРМАКОГНОСТИЧНІ, ФІТОХІМІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

УДК 582.998:543.613.3

С. М. МАРЧИШИН¹, д-р фарм. наук, проф.,

С. С. КОЗАЧОК¹, канд. фарм. наук, Н. А. ГУДЗЬ²

¹ ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

² Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

ЛЕТКІ СПОЛУКИ СТЕВІЇ (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI)

Ключові слова: ефірна олія, карбонові кислоти, стевія (*Stevia rebaudiana* Bertoni), газова хромато-мас-спектрометрія

Стевію (*Stevia rebaudiana* Bertoni) із родини *Asteraceae*, яку в народі називають «медова трава», більше ніж 50 років широко використовують у фармацевтичній та харчовій промисловості як дієтичну добавку та цукрозамінник.

Природний ареал зростання стевії досить вузький: долина високогірної ріки Парани на кордоні Парагваю та Бразилії. У центральній Європі та Росії здійснюють інтродукцію стевії протягом останніх десятиліть.

Більш ніж 100 хімічних сполук ідентифіковано у стевії. Вона містить значну кількість терпенів та флавоноїдів. У 1931 р. було відкрито та описано глікозид – стевіозид, що міститься у листі стевії у кількості 6–18% та є в 300 разів солодший, ніж цукор. Однак хімічний склад листя стевії залишається до кінця невивченим, зокрема вміст її летких компонентів [1].

Матеріали та методи дослідження

Об'єктом досліджень було листя стевії (*Stevia rebaudiana* Bertoni), упаковка 50 г, виробник ПрАТ «Ліктрави», партія № 005 24.07.2013.

Хроматографічне розділення летких сполук стевії листя здійснювали методом газової хромато-мас-спектрометрії з використанням газового хроматографа Agilent 6890N, обладнаного мас-спектрометричним детектором 5973inert (Agilent technologies, USA) та капілярної колонки HP-5MS (30m × 0,25mm × 0,25μm, Agilent technologies, USA).

Ефірну олію з листя стевії одержували методом перегонки з водяною парою із використанням зворотного холодильника за температури 100 °С, упродовж 3 год. Відігнані води екстрагували гептаном. Екстракт упарювали до 100–200 мкл у потоці азоту [2]. Аналіз компонентів ефірної олії стевії листя виконували в градієнтному режимі. Початкову температуру 50 °С витримували впродовж 5 хв із наступним градієнтом 4 °С/хв до 220 °С, із градієнтом 10 °С/хв до 300 °С – витримували впродовж 10 хв, газ-носій – гелій, швидкість потоку через колонку – 1,0 мл/хв. Температура випаровувача – 300 °С, режим вводу проби з поділом потоку (split) з коефіцієнтом 1:50, об'єм інжекції – 2 мкл. Ідентифікацію компонентів проби здійснювали з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02, вміст визначених компонентів виражали методом внутрішнього нормування відносно площ їх піків.

Для аналізу жирнокислотного вмісту (низько- та високомолекулярні кислоти) листя стевії одержували їх метилові ефіри в суміші метанол/толуол (44/20 v/v) та у присутності двох об'ємів сірчаної кислоти. Як внутрішній стандарт використовували ундеканову кислоту, розчинену в гептані. Реакційну суміш витримували за температури 80 °С упродовж 2 год. Відбирали 0,5 мл верхньої органічної фази та виконували хроматографічне розділення. Використовували таку хроматографічну

систему: температура випаровувача – 250 °С, температура інтерфейсу – 280 °С, режим програмування температури – початкова температура 60 °С, витримували впродовж 4 хв, піднімали з градієнтом 4 °С/хв до 250 °С, витримували 6 хв, із градієнтом 20 °С піднімали до 300 °С, витримували 5 хв. Швидкість потоку газу-носія (гелія) через колонку – 1,0 мл/хв. Пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі поділу потоку 1:20. Детектування виконували в режимі SCAN у діапазоні мас (38–400 m/z). Ідентифікацію компонентів проби здійснювали з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02, кількісний вміст визначали методом внутрішнього стандарту [3].

Результати дослідження та обговорення

За даними хроматограми ефірної олії стевії виявлено 51 пік, із них ідентифіковано 29 речовин, що становить 85,86% від загальної кількості (рис. 1). Серед терпеноїдів найбільша частка припадає на сесквітерпени – 44,39%. У стевії листі сесквітерпени ідентифіковано в ациклічній (β -фарнезен, β -неролідол, фітон), моноциклічній (α -каріофілен, β -бісаболен, гермакрен D), моноциклічно-оксидній (епоксикаріофілен, епоксид(1,11)гумулен) та трициклічній ((-)- β -бурбонен, спатуленол, леден, (-) - ало-ізо-лонгіфолен) формах (табл. 1 та 2). Сесквітерпени у найбільшій кількості представлені оксидами – 25,33%, зокрема епоксикаріофіленом (20,82%), трициклічними – 9,76%, ациклічними – 6,33%, біциклічними – 1,56% та моноциклічними терпенами – 1,41%.

Відомо, що сесквітерпени виявляють широкий спектр протизапальної активності, а їх оксидні форми – додатково противірусну дію [4]. Згідно з результатами досліджень М. Дж. Шавана, П. С. Вакте, Д. Б. Шінде, епоксикаріофілен виявляє сильну центральну та периферичну анальгезуючу активність поряд із протизапальною дією [5].

В ефірній олії стевії виявлено монотерпени – 0,77% (β -пінен і транс-пінан), дитерпени у кількості 10,54% (фітол та 13-епіманол оксид), арени – 5,6% (α -куркумен, 2,6-ди-ізо-пропіл-нафтален та нафтален, 1,2,3,5,6,7,8,8а-октагідро-1-метил-6-метилен-4-(1-метилетил)) та ациклічні багатоатомні вуглеводні – 8,63% (ейкозан, гексатриаконтан, 1-октадецен).

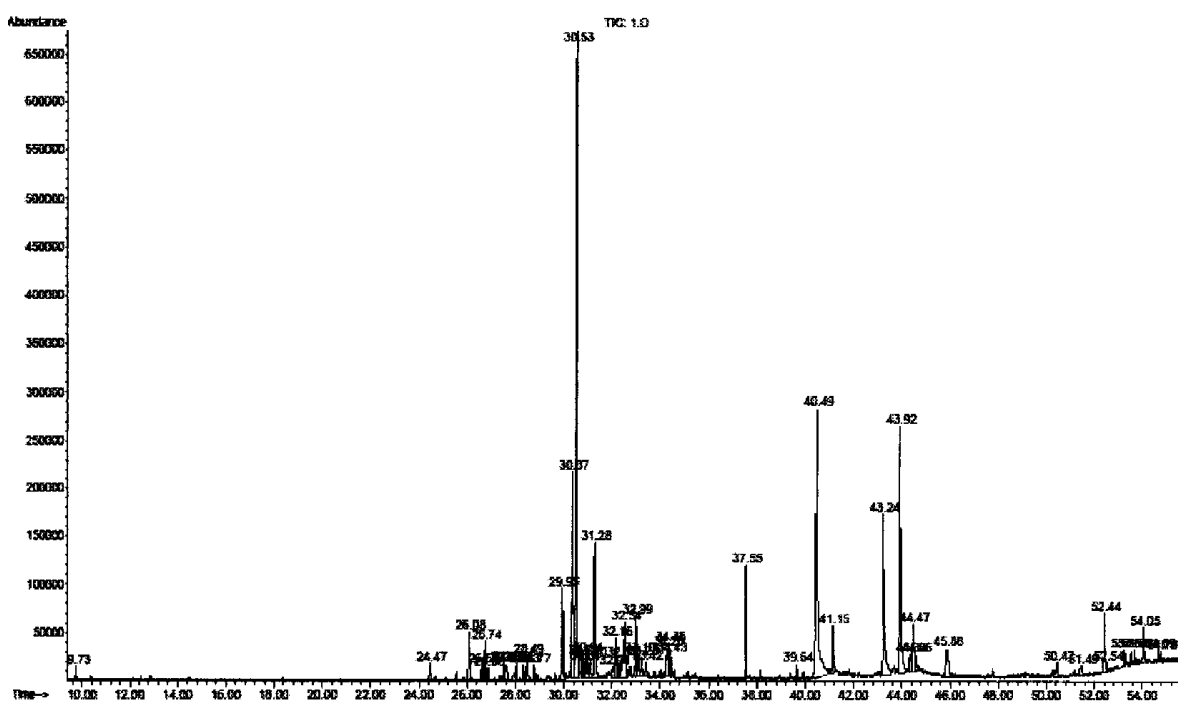


Рис. 1 Хроматограма ГХ-МС-аналізу легкої фракції стевії, одержаної методом перегонки із водяною парою

Результати ГХ-МС-аналізу ефірної олії стевії

Сполуки	Клас	ЧУ, хв	МС, %	Вміст, %
β -Пінен	Біциклічні монотерпени	9,73	94	0,30
(-)- β -Бурбонен	Трициклічні сесквітерпени	24,47	86	0,43
2-Норпінен	Біциклічні сесквітерпени	26,08	91	1,17
α -Каріофілен	Моноциклічні сесквітерпени	26,62	83	0,44
β -Фарнезен	Ациклічні сесквітерпени	26,75	80	1,01
α -Куркумен	Арени	27,54	83	0,48
β -Бісаболен	Моноциклічні сесквітерпени	28,33	98	0,35
Гермакрен D	Моноциклічні сесквітерпени	28,49	81	0,62
Кадінен D	Біциклічні сесквітерпени	28,78	98	0,39
β -Неролідол	Ациклічні сесквітерпени	29,95	91	2,39
Спагуленол	Трициклічні сесквітерпени	30,36	94	6,03
Епоксикаріофілен	Оксиди моноциклічних сесквітерпеноїдів	30,53	87	20,82
Леден	Трициклічні сесквітерпени	30,77	93	0,60
Епокси(1,11)гумулен	Оксиди моноциклічних сесквітерпеноїдів	31,28	74	4,51
Нафтален, 1,2,3,5,6,7,8,8а-октагідро- 1-метил-6-метилен-4-(1- метилетил)	Конденсовані арени	32,16	95	1,25
(-)-Алоізолонгіфолен	Трициклічні сесквітерпени	32,53	83	2,70
2,6-Діізопропілнафтален	Конденсовані арени	33,10	98	3,87
Фітон (гексагідрофарнезиллацетон)	Ациклічні сесквітерпени	37,55	91	2,93
<i>Пальмітинова кислота</i>	Жирні кислоти	40,49	98	13,93
13-Епіманол оксид	Дитерпени-оксиди	41,15	78	1,59
1-Октадецен	Ациклічні вуглеводні	43,24	98	6,36
Фітол	Дитерпени-спирти	43,92	87	8,95
<i>Фталева кислота</i>	Низькомолекулярні органічні кислоти	45,88	81	2,00
Гексатриаконтан	Ациклічні вуглеводні	52,44	81	1,51
Ейкозан	Ациклічні вуглеводні	54,05	86	0,76

Примітки, тут і в табл. 3: ЧУ, хв – час утримування; МС, % – відсоток співпадання із мас-спектрометричним детектором; вміст, % – відсоток від загальної кількості визначених компонентів ефірної олії.

Таблиця 2

Основні класи та підкласи визначених компонентів ефірної олії стевії

Клас	Підклас	Вміст, %	
Монотерпени	Монотерпенові вуглеводні	0,77	0,77
	Оксигеновмістні монотерпени	–	
Сесквітерпени	Сесквітерпенові вуглеводні	19,06	44,39
	Оксигеновмістні сесквітерпени	25,33	
Інші	Арени	5,6	24,77
	Дитерпени	10,54	
	Ациклічні багатоатомні вуглеводні	8,63	
Загальний вміст, %			69,93

У результаті хроматографічного аналізу метилових ефірів летких компонентів стевії листя виявлено 30 речовин, із них ідентифіковано 21, що становить 88,5% від загальної кількості (рис. 2).

Встановлено, що вміст ненасичених жирних кислот (39,35%) переважає над насиченими – 24,11% (табл. 3, 4). Серед ненасичених кислот у досліджуваному об'єкті основна кількість припадає на ліноленову (25,63%), що є есенціальною та належить до класу омега-3 жирних кислот; серед насичених домінує пальмітинова кислота (20,51%).

Хімічний профіль низькомолекулярних органічних кислот стевії листа представлено щавлевою – 1,99%, маленовою – 2,20%, леуліновою – 7,39%, диметоксиацетатною – 0,44%, лимонною – 3,35% та фталевою – 2% кислотами.

Серед метилових ефірів легкої фракції ідентифіковано у значній кількості ізостевіол (6,23%), що є специфічним дитерпеном стевії. Завдяки його вмісту настій із листа стевії знижує рівень глюкози у плазмі крові та підвищує чутливість клітин до інсуліну [6, 7].

Встановлено наявність тритерпенів – стігмастан-3,5-дієну та (22E)-3,5-циклостігмаста-6,22-дієну, що виявляють виражену антибактеріальну, фунгіцидну, протизапальну активність [8].

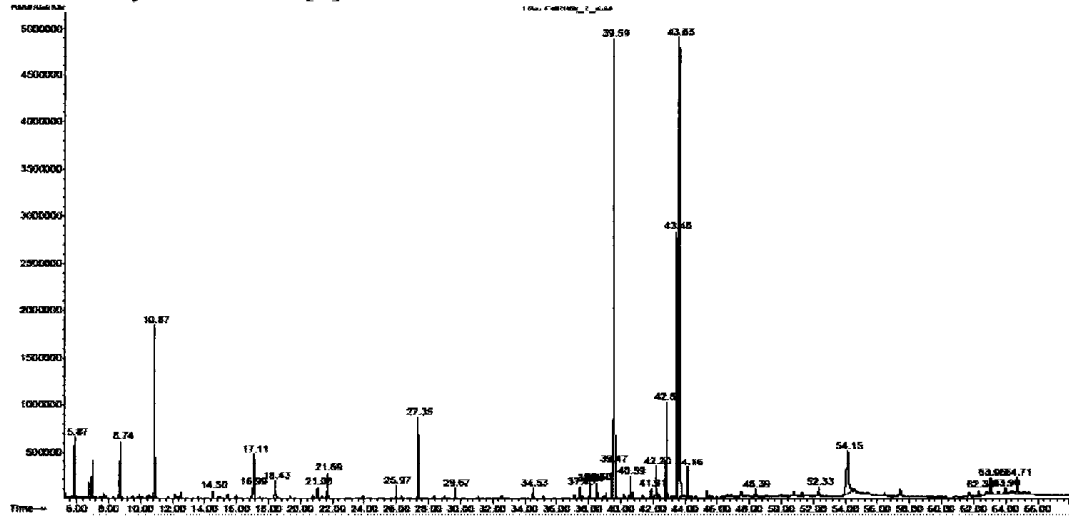


Рис. 2. Хромотограма ГХ-МС-аналізу метилових ефірів летких компонентів стевії

Таблиця 3

Якісний склад та кількісний вміст метилових ефірів летких компонентів стевії

Назва речовини	ЧУ, хв	МС, %	Вміст, %
Щавлева кислота $C_2H_2O_4$	5,88	78	1,99
Маленова кислота $C_3H_4O_4$	8,74	94	2,20
Леулінова кислота $C_5H_8O_3$	10,87	94	7,39
Диметоксиацетатна кислота $C_6H_{12}O_4$	21,08	72	0,44
Лимонна кислота $C_6H_8O_7$	27,35	90	3,35
Азелаїнова кислота $C_9H_{16}O_4$	29,67	95	0,40
Метилміристинова кислота $C_{15}H_{30}O_2$	34,53	98	0,40
Транс-пінан $C_{10}H_{18}$	37,45	90	0,47
Фітол $C_{20}H_{40}O$	38,50	87	0,62
Пальмітолеїнова кислота* $C_{16}H_{30}O_2$	39,48	86	1,50
Пальмітинова кислота $C_{16}H_{32}O_2$	39,59	98	20,51
2-Тридециніл валеріанової кислоти $C_{18}H_{32}O_2$	40,59	78	0,88
14-Метилпальмітинова кислота $C_{17}H_{34}O_2$	41,91	97	0,43
Лінолева кислота** $C_{18}H_{32}O_2$	43,48	99	12,22
Ліноленова кислота*** $C_{18}H_{30}O_2$	43,65	98	25,63
Стеаринова кислота $C_{18}H_{36}O_2$	44,17	99	1,39
Ейкозанова кислота $C_{20}H_{40}O_2$	48,39	99	0,39
Докозанова кислота $C_{22}H_{44}O_2$	52,33	98	0,60
(-)-Ізостевіол $C_{20}H_{30}O_3$	54,15	97	6,23
(22E)-3,5-циклостігмаста-6,22-дієн $C_{29}H_{46}$	62,34	86	0,49
Стігмастан-3,5-дієн $C_{29}H_{48}$	64,71	83	0,98
Загальний вміст у мг/кг, що відповідає 100%		8,05	

Примітка: *, **, *** – моно-, ди- та триненасичені жирні кислоти.

Основні класи та підкласи сполук леткої фракції стевії

Клас	Підклас	Вміст, %	
Органічні кислоти	Низькомолекулярні кислоти	16,25	79,71
	Насичені жирні кислоти	24,11	
	Ненасичені жирні кислоти	39,35	
Терпени	Дитерпеноїди	6,85	8,32
	Тритерпени	1,47	
Загальний вміст, %			88,03

Висновки

1. В ефірній олії з листя стевії ідентифіковано 29 компонентів із загальним вмістом 85,86%

2. Встановлено якісний склад та кількісний вміст основних компонентів ефірної олії листя стевії: епоксикаріюфілен (20,82%), фітол (8,95%), спатуленол (6,03%), епокси(1,11)гумулен (4,51%).

3. Ідентифіковано 21 метиловий ефір леткої фракції стевії листя, із загальним вмістом 88,5%. Встановлено наявність насичених та ненасичених жирних кислот, низькомолекулярних органічних кислот, ди- та тритерпеноїдів, високомолекулярних ациклічних алканів.

4. Визначено специфічний дитерпеноїд – ізостевіол у кількості 6,23%, що є маркером для ідентифікації леткої фракції стевії листя.

ЛІТЕРАТУРА

1. Lemus-Mondaca R., Vega-Galvez A., Zura-Bravo L., Ah-Hen K. Stevia rebaudiana Bertoni, source of a high-potency natural sweetener: A comprehensive review on the biochemical, nutritional and functional aspects // Food Chem. – 2012. – V. 132. – P. 1121–1132.
2. Черногород Л. Б., Виноградов Б. А. Эфирные масла некоторых видов рода *Achillea* L., содержащие фразанол // Раст. ресурсы. – 2006. – Т. 42, Вып. 2. – С. 61–68.
3. Garcés R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues / Anal Biochem. – 1993. – V. 15, N 211 (1). – P. 139–143.
4. Виноградов Б., Виноградова Н., Голан Л. Ароматерапия. Уч. курс. – AND Group, inc., 2006. – 219 с.
5. Chavan M. J., Wakte P. S., Shinde D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark // Phytomedicine. – 2010. – V. 17, N 2. – P. 149–151.
6. Nordentoft I., Jeppesen P. B., Hong J. et al. Isosteviol increases insulin sensitivity and changes gene expression of key insulin regulatory genes and transcription factors in islets of the diabetic KKAY mouse // Diabetes Obes Metab. – 2008. – V. 10, N 10. – P. 939–949.
7. Ma J., Ma Z., Wang J. et al. Isosteviol reduces plasma glucose levels in the intravenous glucose tolerance test in Zucker diabetic fatty rats // Ibid. – 2007. – V. 9, N 4. – P. 597–599.
8. Jose D. L. Sanchez-Perez, Ma. Guadalupe Jaimés-Lara, Rafael Salgado-Garciglia et al. Root extracts from Mexican avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) inhibit the mycelial growth of the oomycete *Phytophthora cinnamomi* // Eur. J. Plant. Pathol. – 2009. – N 124. – P. 595–601.

Надійшла до редакції 07. 09. 2014.

С. М. Марчишин¹, С. С. Козачок¹, Н. А. Гудзь²

¹ ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МОЗ Украины»

² Буковинский государственный медицинский университет, г. Черновцы

ЛЕТУЧИЕ СОЕДИНЕНИЯ СТЕВИИ (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI)

Ключевые слова: эфирное масло, карбоновые кислоты, *Stevia rebaudiana* Bertoni, газовая хромато-масс-спектрометрия

АННОТАЦИЯ

Стевию (*Stevia rebaudiana* Bertoni) из семейства *Asteraceae* широко используют в фармацевтической и пищевой промышленности как диетическую добавку и сахарозаменитель.

Химический состав стевии изучен недостаточно, поэтому целью наших исследований было определение качественного состава и количественного содержания летучих соединений листьев этого растения.

Исследования проведены с помощью газового хроматографа Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA) с масс-спектрометрическим детектором, с использованием библиотеки масс-спектров NIST 02.

В эфирном масле стевии листьев идентифицировано 29 веществ. Среди терпеноидов наибольшее количество представляют сесквитерпены – 44,39%. В стевии листьях сесквитерпены представлены ациклическими, моноциклическими, моноциклически-оксидными и трициклическими формами. Наибольшая часть сесквитерпенов в стевии листьях содержится в форме оксидов, что составляет 25,33%. Компонентный состав эфирного масла стевии также представлен монотерпенами, дитерпенами, аренами и многоатомными алканами.

По результатам хроматографического анализа метилированных эфиров летучих компонентов стевии листьев идентифицировано 21 вещество. Установлен химический профиль летучей фракции: низкомолекулярные органические кислоты, насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты, дитерпеноиды и тритерпены.

Среди метилированных эфиров летучей фракции в значительном количестве идентифицирован изостевиол (6,23%), что является специфическим дитерпеном стевии. Благодаря изостевиолу настоек из листьев стевии снижает уровень глюкозы в плазме крови и повышает чувствительность клеток к инсулину. Изостевиол может быть использован в качестве маркера для стандартизации липофильной фракции стевии листьев.

S. M. Marchyshyn¹, S. S. Kozachok¹, N. A. Hudz²

¹ SHEI «Horbachevsky Ternopil State Medical University of Ministry of Health Care of Ukraine»

² Bukovinian State Medical University, Chernivtsi

VOLATILE COMPOUNDS OF STEVIA (*STEVIA REBAUDIANA* BERTONI)

Key words: essential oil, carboxylic acids, *Stevia rebaudiana* Bertoni, gas chromatography-mass spectrometry

ABSTRACT

Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) from the *Asteraceae* family is widely used in the pharmaceutical and food industry as a dietary supplement and sweetener.

The chemical constituents of *Stevia* have not already enough studied, thus the aim of our researches was to determine the qualitative composition and quantity content of the volatile compounds from the leaves of *Stevia*.

The investigation was conducted by a gas chromatograph Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA) with a mass-spectrometric detector and library of the mass-spectra NIST 02.

29 compounds were revealed in the essential oil from the leaves of *Stevia*. Among terpenoids, sesquiterpenes are in the highest quantity – 44,39%. In the leaves of *Stevia* sesquiterpenes represented by an acyclic, monocyclic, monocyclic oxide and tricyclic forms. The greatest part of sesquiterpenes presents in the form of oxide (25,33%) in the leaves from *Stevia*. Component composition of the essential oil of *Stevia* also represented by monoterpenes, diterpenes, arenas and polyhydric alkanes.

According to the results of the chromatographic analysis of methyl ethers of volatile components from the leaves of *Stevia* it was identified 21 substances. Set up the chemical profile of the volatile fractions there are low molecular weight organic acids, saturated and unsaturated fatty acids, diterpenoids and triterpenes.

Among the methyl esters of the volatile fraction isosteviol was revealed in a significant amount (6.23%), which is specific diterpenes of *Stevia*. Due to the presence of isosteviol, infusion of the leaves of *Stevia* lowers the glucose level in blood and increases the sensitivity of cells to insulin. Isosteviol can be used as a marker for the standardization of the lipophilic fraction of *Stevia* leaves.

Електронна адреса для листування з авторами: svitlanafarm@ukr.net