

Рекомендована д-м фармац. наук., проф. Т. Г. Калинюком

УДК 615.451.16:581.45:582.883.4

## ПЕРСПЕКТИВИ ОТРИМАННЯ МОДИФІКОВАНОГО ГУСТОГО СПИРТОВОГО ЕКСТРАКТУ З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ

© О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, А. М. Ковальова, А. М. Комісаренко

Національний фармацевтичний університет, Харків

**Резюме:** проведено вивчення ізопреноїдного складу та мікробіологічної активності густих екстрактів листя евкаліпту. Показана доцільність заміни бензолу на менш токсичний гексан та перспективність заміни розчину міді сульфату на цинку сульфат в процесі очищення спиртового екстракту з листя евкаліпту.

**Ключові слова:** терпеноїди, густий екстракт, лист, евкаліпт прутноподібний, модифікація.

**Вступ.** Вітчизняна фармацевтична промисловість у різних лікарських формах випускає антистафілококовий препарат «Хлорофіліпт». Відомо, що його основними БАР є похідні хлорофілів *a* та *b* – мідь-заміщені порфірини, та терпеноїди. Під час дослідження БАР евкаліпту прутноподібного та препаратів на його основі ми звернули увагу на те, що деякі параметри процесу виготовлення хлорофіліпту є практично не обґрунтовані, зокрема очищення екстракту, яку проводять додаванням 4 % розчину сульфату міді та бензолу, який є кров'яною отрутою, неточна оцінка ролі катіонів міді (II) у технології лікарського препарату, що приводить до перевитрати міді сульфату, утворення великих об'ємів рідких відходів, що містять органічний розчинник і мідь [1].

Мета дослідження – встановити можливість заміни бензолу та міді сульфату на менш токсичний органічний розчинник та іншу кислоту Льюїса шляхом вивчення хімічного складу отриманих модифікованих екстрактів та їх антимікробної активності.

**Методи дослідження.** Об'єкти дослідження – густий спиртовий екстракт з листя *Eucalyptus viminalis* Labill. (сер. 50609, ЗАТ «Ліктрави», м. Житомир), густі модифіковані спиртові екстракти, отримані з використанням гексану, цинку, міді, заліза та магнію сульфатів, та густий екстракт хлорофіліпту (сер. 331109, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», м. Харків).

Для проведення спиртової екстракції 500,0 г, подрібненого шляхом вальцювання до розмірів часток 2,5–3,0 мм, сухого листя евкаліпту прутноподібного заливали 2500 мл 96 % етилового спирту та настоювали при кімнатній температурі протягом 8 годин. Екстракцію проводили тричі. Екстракти об'єднували, відганяли розчинник та отримали густий екстракт, який в подальшому очищали. Для заміни бензолу в процесі очищен-

ня цього екстракту використовували різні полярні органічні розчинники: етилацетат, ацетон, хлороформ, бензин-калоша та гексан, проте деякі з них мають недоліки, які потрібно врахувати. Етилацетат в процесі очищення гідролізується; ацетон є прекурсором, що ускладнює його використання в промисловості; хлороформ має велику густину та весь осад, який утворюється, знаходиться в органічній фазі; бензин-калоша дуже важко видаляється з екстракту, тому найбільш доцільно з доступних розчинників було використовувати гексан. Для подальшого очищення 10 г густого спиртового екстракту з листя евкаліпту розчиняли в 50 мл гексану, додавали рівну кількість 4 % розчинів міді, цинку, заліза та магнію сульфатів, настоювали перемішуючи протягом 8 годин, органічну фазу відділяли, промивали водою, відганяли органічний розчинник та отримали модифіковані густі екстракти, які в подальшому і досліджували.

Для встановлення доцільності проведених змін технології було проведено вивчення антимікробної активності отриманих екстрактів. Дослідження проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології імені І. І. Мечнікова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом к. біол. н. Т. П. Осолодченко. Відповідно до рекомендацій ВООЗ для оцінки активності препаратів використовували референс-штами *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* 6538 ATCC, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* NCTC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Pseudomonas aeruginosa* 9027 ATCC, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 та *Candida albicans* 885/653 ATCC. Для дослідження використовували 1 % спиртові розчини екстрактів.

Для ідентифікації БАР в екстрактах використовували методи тонкошарової (ТШХ), газової (ГХ) та газорідної хроматографії (ГРХ).

В отриманих екстрактах проводили визначення кількісного вмісту основних груп ідентифікованих БАР. Кількісне визначення хлорофілів проводили спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Specol 1500 (Швейцарія) [2]. Для статистичної достовірності досліди проводили не менше п'яти разів. Кількісне визначення терпеноїдів проводили методом ГХ за допомогою газового хроматографа Agilent Technology 6890 (ГХ) з мас-спектрометричним детектором 5973 (МС). Для аналізу використовували колонку HP-5 довжиною 30 м та внутрішнім діаметром 0,25 мм. Аналіз проводили за таких умов: температуру термостату програмували від 50 до 250 °С зі швидкістю 4 °С/хв; температура інжектора – 250 °С; газ-носії – гелій, швидкість потоку 1мл/хв; переніс від ГХ до МС прогрівався до 230 °С; температура джерела підтримувалась 200 °С; електронну іонізацію проводили при 70 eV у ранжуванні мас  $m/z$  29 до 450. Ідентифікували на основі порівняння отриманих мас-спектрів із даними бібліотеки NIST05-WILEY (близько 500000 мас-спектрів).

**Результати й обговорення.** В отриманих екстрактах із листя евкаліпту прутоподібного ідентифіковано терпеноїди та хлорофіли *a* та *b*.

Встановили, що модифіковані екстракти з листя евкаліпту прутоподібного, в технології яких використовували розчини міді та цинку сульфату та хлорофіліпт, виявляють антимікробну активність майже на одному рівні щодо *S. aureus* та *B. subtilis*, причому цинковий екстракт активніший, ніж мідний, а екстракти, в технології яких використовували розчини сульфатів заліза та магнію майже не виявляли антимікробну активність. Тому в подальшому було продовжено більш глибоке хімічне вивчення модифікованих екстрактів, в технології яких використовували розчини міді та цинку сульфатів.

Результати аналізу терпеноїдного складу густих екстрактів листя евкаліпту наведено в таблиці 1. В густому спиртовому екстракті з листя евкаліпту виявлено 51 речовина, 35 з яких ідентифіковано; в густому екстракті, який модифіковано розчином міді сульфату, – 42 речовини, 37 з яких ідентифіковано; в густому екстракті, який модифікований розчином цинку сульфату, – 40 речовини, 34 з яких ідентифіковано; а в густому екстракті хлорофіліпту – 35, з яких ідентифіковано 28. В усіх екстрактах домінуючими речовинами є  $\alpha$ -феландрен, 1,8-цинеол, аромадендрен, леден та глобулол.

**Таблиця 1.** Хімічний склад густих екстрактів із листя евкаліпту

№ за/п	Речовина	Час утримання, хв	Об'єкт дослідження			
			Хлорофіліпт	Евкаліпт (спирт)	Евкаліпт (спирт CuSO <sub>4</sub> )	Евкаліпт (спирт ZnSO <sub>4</sub> )
1	2	3	4	5	6	7
1.	Ізоамілацеталь	6,50		0,19		
2.	$\alpha$ -феландрен	7,84	3,13	2,64	3,54	3,00
3.	пара-цімен	8,44		1,67		0,83
4.	лімонен	8,55		0,21		
5.	1,8-цінеол	8,64	11,15	34,13	5,88	21,7
6.	транс-пінокарвеол	12,06	1,48	1,12	0,71	1,03
7.	пінокарвон	12,84	0,41	0,42		0,27
8.	борнеол	12,98		0,27		
9.	терпінен-4-ол	13,35	0,68	0,55	0,37	0,48
10.	$\alpha$ -терпінеол	13,82	1,5		0,48	1,3
11.	*	15,07		0,21		
12.	гераніол	15,95		0,51	0,55	0,44
13.	*	18,05		0,18		
14.	$\alpha$ -терпінилацетат	19,01	0,57	0,33	0,485	0,46
15.	ізоледен	19,73		0,19		0,43
16.	*	19,76			0,34	
17.	копасн	19,83		0,18		0,36
18.	геранілацетат	20,12	0,47	0,78	0,54	1,0
19.	*	20,51			0,41	
20.	$\alpha$ -гурьонен	20,89	1,81	1,60	1,89	1,87
21.	*	21,04		0,23		
22.	*	21,47		0,20		

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5	6	7
23.	каларен	21,59	1,15	1,00		0,91
24.	аромадендрен	21,84	26,01	21,59	22,78	26,1
25.	ало-аромадендрен	22,48	3,95		4,95	4,53
26.	*	22,83		0,18		
27.	*	22,96		0,19		
28.	*	22,98			0,33	
29.	леден	23,53	2,55	1,44	4,48	1,82
30.	γ-кадінен	24,11		0,29		0,42
31.	*	24,15			0,44	
32.	дегідроаромадендрен	24,26	0,47	0,23	0,65	0,39
33.	δ -кадінен	24,38		0,25	0,44	
34.	*	25,18		0,18		
35.	*	25,21	0,44			
36.	*	25,27			0,36	
37.	епі-глобулол	25,45	3,47	1,93	4,21	3,18
38.	*	25,56		0,22		
39.	*	25,63	0,47	0,22		
40.	*	25,69			1,46	
41.	спатуленол	25,93				0,41
42.	глобулол	26,10	14,66	8,17	12,25	12,05
43.	віридіфлорол	26,26	2,57	1,75	2,88	2,70
44.	епі- γ -евдесмол	26,49	1,16	0,65		1,08
45.	*	26,57			1,43	
46.	епі- β -евдесмол	26,93	1,17	0,62		1,05
47.	кубенол	27,10	3,29	0,23	1,61	0,36
48.	*	27,15			0,63	
49.	*	27,27		0,54		0,47
50.	β -евдесмол	27,49	1,05	1,62	7,86	2,58
51.	α-евдесмол	27,55	1,15	0,64	3,15	1,27
52.	*	28,94	0,69	0,33		0,59
53.	*	28,98			1,01	
54.	*	29,08	0,89	0,41		0,63
55.	*	29,12			1,08	
56.	*	29,42	0,73	0,26		0,41
57.	*	29,46			0,68	
58.	*	29,51	0,41	0,20		
59.	*	29,54			0,45	
60.	*	29,77	0,61	0,45		0,93
61.	*	29,79			1,34	
62.	розіфоліол	30,08	2,06	1,17	0,61	0,74
63.	*	30,30			0,40	
64.	*	31,40		0,29	0,99	0,51
65.	пальмітинова кислота	31,78	0,89	0,53	1,72	0,83
66.	етилпальмітат	32,09	1,01	0,45	2,01	0,85
67.	фітол	33,33	0,51	0,735	1,54	1,04
68.	ліноленова кислота	33,68			0,43	
69.	етиллінолеат	33,78	0,32	0,26	0,84	0,39
70.	етилліноленат	33,85	0,68	0,385	1,85	0,69

У густому спиртовому екстракті з листя евкаліпту вміст терпеноїдів складав  $(5,7 \pm 0,01)$  %, а вміст хлорофілів *a* та *b* –  $(1,31 \pm 0,01)$ %; в густих модифікованих екстрактах з використанням міді та цинку сульфату, вміст терпеноїдів –  $(6,1 \pm 0,02)$  % та  $(6,25 \pm 0,01)$ %, хлорофілів *a* та *b* –  $(2,22 \pm 0,01)$  % та  $(3,52 \pm 0,01)$  % відповідно, в густому екстракті хлорофіліпту вміст терпеноїдів

–  $(4,3 \pm 0,02)$  %, хлорофілів *a* та *b* –  $(3,31 \pm 0,01)$  %.

**Висновки.** Таким чином, хімічним та мікробіологічним шляхом доказана доцільність заміни бензолу на менш токсичний гексан та показана перспективність заміни розчину міді сульфату на цинку сульфат в процесі очистки спиртового екстракту з листя евкаліпту, але це потребує подальшого вивчення.

#### Література

1. Пат. № 5242 Україна, МПК А61К35/78. Спосіб одержання хлорофіліпту / В. Л. Надтока, Н. Г. Божко, А. О. Грижко. – № 2753048/SU; Заявл. 25.04.79; Опубл. 28.12.94, Бюл. № 7-1.

2. Туманов В. Н. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза / В. Н. Туманов, С. Л. Чирук. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.

### ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГУСТОГО СПИРТОВОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА

**О. Н. Кошевой, А. С. Кухтенко, А. М. Ковалева, А. Н. Комиссаренко**

*Национальный фармацевтический университет, Харьков*

**Резюме:** проведено изучение изопреноидного состава и микробиологической активности густых экстрактов из листьев эвкалипта прутовидного. Показана целесообразность замены бензола на менее токсичный гексан и перспективность замены раствора меди сульфата на цинка сульфат в процессе очистки спиртового экстракта из листьев эвкалипта.

**Ключевые слова:** терпеноиды, густой экстракт, лист, эвкалипт прутовидный, модификация.

### THE PROSPECTS OF THE CREATING MODIFIED THICK ALCOHOL EXTRACT FROM EUCALYPTUS LEAVES

**O. M. Koshovyi, O. S. Kuhtenko, A. M. Kovalyova, A. M. Komisarenko**

*National Pharmaceutical University*

**Summary:** isoprenoids composition and antibacterial activities of the Eucalyptus leaves thick extract were studied. Practicability of the change the benzene to more nontoxic hexane and prospects of change the solution cuprum sulphate to zinc sulphate in process peelings the Eucalyptus leaves alcohol extract were shown.

**Key words:** terpenoids, thick extract, leave, *Eucalyptus viminalis*, modification.