

УДК 615.32:582.883.4:581.45

Ю. Н. Авідзба, О. М. Кошовий, О. С. Кухтенко, А. М. Комісаренко

Національний фармацевтичний університет

ДОСЛІДЖЕННЯ ПРОДУКТІВ КОМПЛЕКСНОЇ ПЕРЕРОБКИ ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ ПІСЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЕФІРНОЇ ОЛІЇ

Вивчено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук гідрофільних екстрактів з листя евкаліпту, одержаних зі шроту та дистилату після виробництва ефірної олії. Встановлено, що екстракти містять амінокислоти, полісахариди, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, значну кількість дубильних речовин, що гідролізуються. Вивчено їх якісний склад та кількісний вміст основних груп БАР. Досліджено антимікробну, протизапальну та анаболізуючу активність сумарного сухого екстракту з листя евкаліпту, одержаного шляхом комплексної переробки.

Ключові слова: *Eucalyptus viminalis* Labill.; листя; гідрофільний екстракт; хімічний склад; антимікробна, анаболізуюча, протизапальна активність

ВСТУП

Перспективним напрямом розвитку сучасної фітохімії є створення нових лікарських препаратів шляхом комплексної переробки різної рослинної сировини. Це дозволить забезпечити розширення номенклатури вітчизняних препаратів, раціонально використовувати природні ресурси, підвищити рентабельність виробництва та зменшити його негативний вплив на навколишнє середовище.

Раніше нами було проведено вивчення біологічно активних речовин листя евкаліпту прутноподібного (*Eucalyptus viminalis* Labill.). На основі порівняльного вивчення якісного складу та кількісного вмісту біологічно активних речовин (гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, полісахаридів та амінокислот) листя та шроту листя *Eucalyptus viminalis* Labill. після виробництва густого екстракту хлорофіліпту науково обґрунтовано можливість створення комплексної технології отримання нового лікарського засобу «Евкабол» [4, 6].

Продовжуючи дослідження в цьому напрямку, було доцільно дослідити хімічний склад та фармакологічну активність продуктів комплексної переробки листя евкаліпту після одержання ефірної олії, оскільки щорічно в Україні відходами виробництва ефірної олії евкаліпту стають близько 100 тонн шроту листя евкаліпту та 3000000 л водної витяжки, які містять значну кількість БАР.

Отже, метою наших досліджень було вивчення хімічного складу та фармакологічної активності ек-

страктів з листя евкаліпту, одержаних шляхом комплексної переробки.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктом нашого дослідження був водний екстракт, 50 % спиртовий екстракт та сумарний сухий екстракт з листя евкаліпту (*Folia E. viminalis* Labill.), які були одержані шляхом комплексної переробки після одержання ефірної олії.

Для одержання екстрактів 1,0 кг листя евкаліпту заливали 30 л води очищеної, проводили перегонку ефірної олії протягом 1 години. Водну витяжку зливали, робили відбір проби, яку в подальшому і аналізували (екстракт 1). До шроту, який залишився після одержання ефірної олії, додавали 3,0 л 50 % спирту етилового і проводили екстракцію протягом доби. Екстракцію повторювали тричі. 50 % спиртові екстракти об'єднували, робили відбір проби, яку в подальшому і аналізували (екстракт 2). В подальшому залишки одержаних водних та 50 % спиртових витяжок об'єднували, упарювали при температурі 85-95 °С під вакуумом у вакуум-циркуляційному апараті при розрідженні 680-700 мм рт. ст. до об'єму водного залишку 2,0 л. Кубовий залишок – це густа прозора темно-коричнева рідина, яку залишали для відстоювання на 4-5 діб у холодильнику. Одержаний водний концентрат сушили у розпилювальній сушильні з температурою теплоносія на вході 160 °С і 80-90 °С на виході до сухого екстракту (екстракт 3).

Для встановлення якісного складу екстрактів використовували загальноприйняті методи досліджень – якісні реакції, паперову (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ) [2, 4, 6].

© Авідзба Ю. Н., Кошовий О. М., Кухтенко О. С., Комісаренко А. М., 2014

Таблиця 1

КІЛЬКІСНИЙ ВМІСТ ОСНОВНИХ ГРУП БАР В ЕКСТРАКТАХ З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ

Група БАР, що визначалась, та використаний метод	Кількісний вміст, %		
	екстракт 1	екстракт 2	екстракт 3
Сухий залишок			
Гравіметрія згідно з ДФУ	7,92	5,43-	-
Похідні гідроксикоричної кислоти			
Спектрофотометричний метод в перерахунку на хлорогенову кислоту	3,32±0,02	2,76±0,01	2,91±0,03
Флавоноїди			
Спектрофотометричний метод у перерахунку на рутин	1,63±0,03	6,11±0,05	4,41±0,05
Фенольні сполуки			
Спектрофотометричний метод у перерахунку на галову кислоту	21,4	37,9	32,01±0,03

Попереднє хроматографічне вивчення якісного складу амінокислот в екстрактах з листя евкаліпту проводили методом висхідної хроматографії на хроматографічному папері «Filtrak № 4» у системі розчинників н-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:2). Для порівняння використовували стандартний набір амінокислот (ТУ 6-09-3147-83) у концентрації 0,1 %. Хроматограми обробляли 0,2 % розчином нінгідрину в ацетоні та висушували у сушильній шафі при температурі 60-80 °С. Амінокислоти ідентифікували порівнянням значень R_f з вірогідними зразками при паралельному хроматографуванні. В цілому виявлено 7 амінокислот.

Ідентифікацію моноцукрів проводили за допомогою паперової хроматографії низхідним способом в системі н-бутанол – кислота оцтова – вода (4:1:2) з достовірними зразками нейтральних моноцукрів. Хроматограми проявляли розчином анілінфталату. В екстракті були ідентифіковані глюкоза, галактоза та рамноза, а після гідролізу ще й арабіноза.

Гідроксикоричні кислоти та флавоноїди вивчали методом двовимірної ПХ у порівнянні з вірогідними зразками гідроксикоричних кислот та флавоноїдів у системах н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2) та 5 % оцтова кислота з наступною обробкою хроматограм парами аміаку.

Для виявлення кумаринів екстракти хроматографували (ПХ) в системах хлороформ (формамід 25 %) та гексан (формамід 25 %) з наступним переглядом хроматограм у фільтрованому УФ-світлі до та після обробки 10 % спиртовим розчином калію гідроксиду.

У результаті хроматографічного вивчення екстрактів та продуктів їх гідролізу (5 % сірчана кислота) за допомогою ПХ в системах: I – н-бутанол – оцтова кислота – вода (4:1:2), II – 5 %, III – 30 % та IV – 60 % оцтова кислота з використанням 1 % спиртового розчину заліза хлориду (III) як хромогенного реактиву встановили наявність галової, елагової кислот, гало- та елаготанінів.

У результаті попереднього хімічного та хроматографічного дослідження отриманих екстрактів вста-

новлено наявність таких груп БАР, як похідні гідроксикоричної кислоти, флавоноїди та поліфенольні сполуки, амінокислоти та цукри.

У цілому в екстрактах з листя *Eucalyptus viminalis* Labill. було виявлено: 2 фенолкарбонові кислоти – галову та елагову; 5 похідних гідроксикоричної кислоти – *n*-кумарову, кавову, ферулову, хлорогенову та неохлорогенову; 6 кумаринів – кумарин, умбеліферон, скополетин, дафноретин, скимін і скополін; 8 флавоноїдів і їх глікозидів – лютеолін, мірицетин, кверцетин, кемпферол, ізорамнетин, ізокверцитрин, астрагалін та ізорамнетину-3-*O*-β-D-глюкопіранозид.

Кількісне визначення БАР проводили спектрофотометричним методом. Похідні гідроксикоричної кислоти в перерахунку на хлорогенову кислоту визначали при довжині хвилі 327 нм; флавоноїди в перерахунку на рутин після утворення комплексу з алюмінієм хлоридом – при 417 нм; поліфенольні сполуки в перерахунку на галову кислоту – при довжині хвилі 270 нм. Оптичну густину вимірювали у кюветі з товщиною шару 10 мм на спектрофотометрі Specol 1500 (Швейцарія). Для статистичної достовірності результатів визначення проводили не менше 5 разів (табл. 1) [2, 4, 6].

Вивчення антибактеріальної активності екстрактів проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та поживних середовищ під керівництвом канд. біол. н. Осолодченко Т. П. [1, 6]. 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, *Candida albicans* 885/653 ATCC. Використовували 1 % водні розчини екстрактів. Екстракти зі шроту листя евкаліпту виявляють антибактеріальну дію по відношенню до *S.aureus*, *E.coli* та *B.subtilis*.

Протизапальну активність сумарного сухого екстракту досліджували у дослідах на білих мишах масою 17-22 г на моделі формалінового набряку [1]. Пре-

**ВПЛИВ 10-ТИ ДЕННОГО ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОГО ВВЕДЕННЯ ЕКСТРАКТУ
З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ НА ВМІСТ ЗАГАЛЬНОГО БІЛКА ТА ДНК В М'ЯЗАХ ЩУРІВ**

Препарат	Доза, мг/кг	N	ДНК		Загальний білок	
			мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %	мкг/г тканини	приріст відносно контролю, %
Контроль	–	7	445±50,1	–	121±5,13	–
Екстракт евкаліпту	200	5	526±62,3	+18	124±3,88	+1
	600	5	623±51,2	+40	143±3,51	+18
Калію оротат	200	5	521±45,5	+17	131±1,85	+8

паратом порівняння обрали вольтарен [3]. Дослідні тварини поділили на три групи: контрольна група, група тварин, яких лікували екстрактом евкаліпту, та група тварин, яких лікували препаратом порівняння. Ступінь протизапальної активності екстракту оцінювали за антиексудативним ефектом. Для відтворення гострого асептичного ексудативного запалення використовували як флоген 2 % розчин формаліну, який вводили субплантарно в кількості 0,05 мл через 1 годину після перорального введення досліджуваного екстракту евкаліпту, препарату порівняння вольтарену і у контрольній групі – води. Активність досліджуваних засобів вивчали за їх здатністю зменшувати розвиток набряку в порівнянні з контролем.

Отримані на моделі формалінового набряку у мишей результати свідчать про виражену протизапальну активність сухого екстракту з листя евкаліпту, отриманого шляхом комплексної переробки. Максимальний антиексудативний ефект екстракту 64,54 % спостерігався у дозі 20 мг/кг.

Співробітниками ДП ДНЦЛЗ за нашою участю в лабораторії загальної фармакології під керівництвом к. м. н. Чайки Л. О. проведені дослідження з виявлення та вивчення анаболічної активності сухого екстракту з листя евкаліпту. Дослідження проводились в порівнянні з відомим нестероїдним анаболічним препаратом калію оротатом («Борщагівський ХФЗ», сер. 1411, придатний до Х1.2012 г.) [3, 6].

Як показники анаболічної дії, вибрали вміст ДНК та загального білка, котрі визначали в тканинах м'язів [5, 6, 7].

Дослідження проводили на 23 нелінійних щурах-самцях. Препарати вводили внутрішньошлунково кожен день протягом 10 діб: екстракт евкаліпту – в дозах 200 та 600 мг/кг (по насипній масі), що відповідає 2 % та 6 % від вищої разової дози екстракту; калію оротат – у дозі 200 мг/кг (по калію оротату). Контрольній групі тварин вводили воду очищену в еквівалентному об'ємі.

Через 24 години після останнього введення дослідних препаратів щурів декапітували, вилучали печінку та м'яз задньої сторони стегна. М'яз заморожували і зберігали в рідкому азоті. Для проведення дослідження тканини подрібнювали: печінку пропускали через прес, м'яз розтирали у фарфоровій ступці в рід-

кому азоті. В подрібнених тканинах визначали вміст ДНК за методом Трудолюбової М. Г. [5] та загального білка за методом Miller G. I. [7].

Десятиденне внутрішньошлункове введення щурів екстракту з листя евкаліпту в дозі 200 мг/кг створює помітну тенденцію до підвищення вмісту ДНК у м'язі на 18 %. Вміст білка при цій дозі екстракту не змінюється (табл. 2). При введенні екстракту в дозі 600 мг/кг зареєстровано значне достовірне підвищення рівня ДНК в м'язі на 40 % при достовірному зростанні вмісту загального білка на 18 %. Калію оротат у дозі 200 мг/кг на вміст ДНК та загального білка в м'язі щурів спричиняє ефект, порівняний для дози екстракту 200 мг/кг.

При визначенні вмісту ДНК та загального білка в печінці щурів, які отримували екстракт у зазначених дозах, не виявлено будь-яких змін в їх рівні. Тобто, десятиденне внутрішньошлункове введення екстракту в дозах 200 та 600 мг/кг спричиняє дозозалежну анаболізуючу активність на м'яз щурів, підвищуючи вміст ДНК та загального білка.

Отримані результати попереднього дослідження показали перспективність подальшого дослідження дії сухого екстракту з листя евкаліпту на синтезуючу білок систему організму.

Проведені фармакологічні дослідження вказали на перспективність використання екстракту з листя евкаліпту, отриманого шляхом комплексної переробки як антибактеріального, протизапального та анаболізуючого засобу.

ВИСНОВКИ

Вивчено якісний склад та кількісний вміст фенольних сполук у сухому екстракті з листя евкаліпту, одержаного шляхом комплексної переробки, досліджено його антимікробну, протизапальну та анаболізуючу активність, що свідчить про перспективність використання його для створення нових лікарських засобів.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рекомендації] / За ред. чл.-кор. НАМН України О. В. Стефанова. – К.: Здоров'я, 2001. – С. 292-306.

2. Ковальова А. М. Розробка методу стандартизації нового лікарського засобу піфламін / [А. М. Ковальова, Г. В. Георгієвський, В. М. Ковальов та ін.] // Фармаком. – 2002. – № 2. – С. 92-97.
3. Компендиум. Лекарственные препараты 2011 г. / Под ред. проф. В. Н. Коваленко и проф. А. П. Викторова. – К.: Морион, 2011. – 2911 с.
4. Кошовий О. М. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпту / [О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко, А. М. Ковальова та ін.] // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 151-161.
5. Трудолюбова М. Г. Количественное определение РНК и ДНК в субклеточных фракциях клеток животных. Современные методы биохимии / Под ред. В. Н. Орехович. – М.: Медицина, 1977. – С. 113-116.
6. Koshoviy O. M. A new herbal remedy with anabolic activity on the basis of hydrophilic compounds of Eucalyptus leaves / [O. M. Koshoviy, V. S. Kyslichenko, V. V. Velma et al.] // Herba Polonica. – 2008. – Vol. 55, № 1. – P. 72-77.
7. Miller G. I. Protein determination for large number of sample / G. I. Miller // Anal. Chem. – 1959. – Vol. 31, № 5. – P. 964-966.

УДК 615.32:582.883.4:581.45

Ю. Н. Авидзба, О. Н. Кошевой, А. С. Кухтенко, А. Н. Комиссаренко

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОДУКТОВ КОМПЛЕКСНОЙ ПЕРЕРАБОТКИ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА ПОСЛЕ ПОЛУЧЕНИЯ ЭФИРНОГО МАСЛА

Изучен качественный состав и количественное содержание фенольных соединений гидрофильных экстрактов из листьев эвкалипта, полученных из шрота и дистиллята после производства эфирного масла. Установлено, что экстракты содержат аминокислоты, полисахариды, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды, значительное количество гидролизуемых дубильных веществ. Изучен их качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ. Исследована антимикробная, противовоспалительная и анаболизирующая активность суммарного сухого экстракта из листьев эвкалипта, полученного путем комплексной переработки.

Ключевые слова: Eucalyptus viminalis Labill.; листья; гидрофильный экстракт; химический состав; антимикробная, анаболизирующая, противовоспалительная активность

UDC 615.32:582.883.4:581.45

Yu. N. Avidzba, O. M. Koshoviy, O. S. Kukhtenko, A. M. Komissarenko

STUDY OF INTEGRATED PROCESSING PRODUCTS FROM EUCALYPTUS LEAVES AFTER PRODUCTION ESSENTIAL OIL

The qualitative and quantitative composition of phenolic compounds content of eucalyptus leaves hydrophilic extracts derived from the waste and the distillation liquid after essential oil production were studied. It has been established that the extracts contain aminoacids, polysaccharides, hydroxycinnamic acids, flavonoids, a significant amount of the hydrolyzable tannins. Qualitative and quantitative composition of basic biological active substances were studied. Antimicrobial, anti-inflammatory and anabolic activity of total dry extract from Eucalyptus leaves, obtained by complex processing were investigated.

Key words: Eucalyptus viminalis Labill.; leaves; hydrophilic extract; chemical composition; antimicrobial, anabolic, anti-inflammatory activity

Адреса для листування:

61146, м. Харків, вул. Блюхера, 4.

Тел. (0572) 67-57-97, 67-91-51.

Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції:

12.02.2014 р.