

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАКЦІЇ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН З ЛИСТЯ ЕВКАЛІПТУ: ВИБІР ЕКСТРАГЕНТУ

Ключові слова: оптимізація, екстракція, листя, евкаліпт

В Україні та Російській Федерації зареєстровано більше 50 препаратів на основі біологічно активних речовин (БАР) листя евкаліпта, з них 10 – вітчизняного виробництва. Вітчизняною фармацевтичною промисловістю в різних лікарських формах випускається антистафілококковий рослинний препарат «Хлорофіліпт» (ДЗ «ДНЦЛЗ», Харків, «Артеріум», Київ) [3]. Щорічно для його виробництва в Україну імпортують близько 30 тон листя евкаліпта.

В літературі приведено системне дослідження БАР листя евкаліпта прутувидного (*Eucalyptus viminalis*) [2]. Продовжуючи ці дослідження та дослідження препаратів на його основі, ми звернули увагу на деякі параметри процесу виготовлення Хлорофіліпту, які практично не обґрунтовані: вибір розчинника, тривалість процесу і кратність екстракції, температурний режим, величина гідромодуля тощо. Зокрема в процесі екстракції використовують етанол, який підлягає предметно кількісному обліку та важко регенерується. Крім того, зміни податкового законодавства значно ускладнили систему повернення акцизного збору та списання цього розчинника. Всі ці фактори призвели до того, що більшість виробників зменшують обсяги роботи з етанолом та бажають знайти йому заміну.

Тому **метою** наших досліджень було визначення можливості створення нового модифікованого екстракту з листя евкаліпта прутувидного, аналогічного Хлорофіліпту, без використання спирту етилового.

Об'єкти та методи дослідження

Експериментальна частина. Об'єктами дослідження було листя *Eucalyptus viminalis* Labill., (сер. 060510, ЗАТ «Ліктрави», м. Житомир), екстракти на його основі та 1% спиртовий екстракт «Хлорофіліпту» промислового виробництва (сер. 741010, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», м. Харків).

Для приготування екстрактів 5,0 г сухого листя евкаліпта прутувидного, подрібненого до розміру частинок 2–3 мм, заливали 50 мл різних розчинників (96%-, 70%-, 50%-й розчини етанолу, хлороформ, етилацетат, гексан, бензин калоша, ацетон, вода очищена) і настоювали за кімнатної температури упродовж 8 год. Одержані екстракти фільтрували крізь складчастий фільтр, концентрували під вакуумом до сухого залишку.

10 г етилацетатного екстракту розчиняли в 50 мл гексану та додавали 50 мл 4%-го розчину міді сульфату, настоювали упродовж 8 год. Гексанову фракцію відділяли на ділильній воронці, промивали водою та відганяли розчинник. В результаті був одержаний густий модифікований етилацетатний екстракт. З одержаних густих екстрактів готували 1%-ні спиртові розчини, які в подальшому використовували для аналізу.

Для встановлення якісного складу екстрактів використовували загальноприйняті методи досліджень – якісні реакції, паперову та тонкошарову хроматографії [1, 2]. В

96%-, 70%-, 50%-му етанольному, етилацетатному екстрактах визначили фенолкарбонів та гідроксикоричні кислоти, кумарини, флавоноїди, терпеноїди та хлорофіли; в хлороформному та ацетоновому – кумарини, терпеноїди та хлорофіли; в гексановому – терпеноїди та хлорофіли. В водному екстракті з листя евкаліпта прутovidного було ідентифіковано фенолкарбонів та гідроксикоричні кислоти, флавоноїди. В модифікованому етилацетатному екстракті та Хлорофіліпті ідентифіковані хлорофіли та терпеноїди.

З точки зору подальшої стандартизації екстрактів та технології їх одержання в екстрактах проводили визначення кількісного вмісту основних груп БАР, які було ідентифіковано. Кількісне визначення фенольних сполук, похідних гідроксикоричної кислоти, флавоноїдів та хлорофілів здійснювали спектрофотометричним методом. Оптичну густина вимірювали у кюветі з шаром завтовшки 10 мм на спектрофотометрі Spocol 1500 (Швейцарія) за відповідної довжини хвилі. Вміст похідних гідроксикоричних кислот визначали в перерахунку на хлорогенову кислоту за 327 нм, вміст суми флавоноїдів в перерахунку на рутин – за довжини хвилі 417 нм після утворення комплексу з алюмінію хлоридом, вміст суми фенольних сполук в перерахунку на галову кислоту – за 270 нм [2] та хлорофілів *a* та *b* – за 649 та 665 нм [4]. Для статистичної достовірності досліди виконували не менше п'яти разів. Результати кількісного визначення основних груп БАР наведено в табл. 1.

Т а б л и ц я 1

Кількісний вміст біологічно активних речовин в екстрактах з листя евкаліпта прутovidного

Об'єкт дослідження	Кількісний вміст, %			
	Гідроксикоричні кислоти в перерахунку на хлорогенову кислоту	Флавоноїди в перерахунку на рутин	Сума фенольних сполук в перерахунку на галову кислоту	Хлорофіли <i>a</i> та <i>b</i>
Водний екстракт	0,87±0,06	2,91±0,03	47,62±0,08	–
Ацетоновий екстракт	–	–	25,48±0,042	0,55±0,07
Гексановий екстракт	–	–	–	1,36±0,04
Бензиновий екстракт	–	–	–	1,12±0,04
Етилацетатний екстракт	0,68±0,071	4,36±0,05	11,11±0,05	1,88±0,07
96% етанольний екстракт	1,09±0,01	4,14±0,04	33,13±0,03	1,16±0,03
70% етанольний екстракт	0,95±0,08	3,14±0,05	42,79±0,05	0,61±0,06
50% етанольний екстракт	1,69±0,010	5,45±0,03	20,37±0,05	0,463±0,08
Модифікований етилацетатний екстракт	–	–	–	4,77±0,05
Хлорофіліпт	–	–	–	4,43±0,03

Встановлено, що вміст основних БАР в етилацетатному екстракті найбільш порівняний з їх вмістом в первинному етанольному екстракті, з якого в подальшому виробляють густий екстракт «Хлорофіліпт». В модифікованому етилацетатному екстракті вміст хлорофілів *a* та *b* становить 4,77±0,05%, що порівняно з їх вмістом в екстракті «Хлорофіліпт».

Вивчення антибактеріальної активності екстрактів здійснювали методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології ім. І. І. Мечнікова в лабораторії біохі-

мії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом канд. біол. наук Осолодченко Т. П. 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%-ні спиртові розчини екстрактів (табл. 2).

Таблиця 2

Антимікробна активність екстрактів з листя евкаліпта прутovidного

Мікроорганізм	Діаметр зони затримки росту за використання екстрактів евкаліпта, мм									
	Водний	Ацетоновий	Етилацетатний	Гексановий	Хлороформний	96% етанольний	70% етанольний	50% етанольний	Модифікований етилацетатний екстракт	Хлорофіліпт
<i>S. aureus</i> 25923	22	23	25	25	27	23	22	22	26	23
<i>S. aureus</i> 6538	24	ріст	23	25	25	ріст	ріст	ріст	Ріст	ріст
<i>E. coli</i> 25922	12	13	14	14	13	13	14	18	14	13
<i>Proteus vulgaris</i> 4636	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	Ріст	ріст
<i>B. subtilis</i> 6633	15	ріст	15	15	16	14	ріст	ріст	13	14
<i>P. aeruginosa</i> 27853	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	Ріст	ріст
<i>Proteus vulgaris</i> 4636	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	Ріст	ріст
<i>S. pyogenosa</i> 2432	12	ріст	13	12	14	ріст	ріст	ріст	13	ріст
<i>Candida albicans</i> 885/653	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст	ріст

З табл. 2 видно, що екстракти з листя евкаліпта прутovidного виявляють антимікробну активність по відношенню до *S. aureus* та *B. subtilis*, та майже зовсім не впливають на *S. pyogenosa*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *P. aeruginosa* та *Candida albicans*. Модифікований етилацетатний екстракт проявляє антимікробну активність на рівні з екстрактом «Хлорофіліпту».

Висновки

Доведена можливість створення модифікованого екстракту з листя евкаліпта прутovidного, аналогічного Хлорофіліпту, без використання етанолу етилацетатною екстракцією.

ЛІТЕРАТУРА

1. Державна Фармакопея України / ДП «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: ДП «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
2. О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко, А. М. Ковальова та ін. Дослідження фенольних сполук листя евкаліпта // Фармаком. – 2005. – № 2/3. – С. 151 – 161.
3. Пат. № 5242 Україна, МПК А61К35/78. Спосіб одержання хлорофіліпту / В. Л. Надтока, Н. Г. Божко, А. О. Гришко. – № 2753048/SU; Заявл. 25.04.79; Опубл. 28.12.94, Бюл. № 7–1.
4. Туманов В. Н., Чирук С. Л. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза. – Гродно: ГрГУ им. Я. Купалы, 2007. – 62 с.

Надійшла до редакції 27.02.2012.

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

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА: ВЫБОР ЭКСТРАГЕНТА

Ключевые слова: оптимизация, экстракция, лист, эвкалипт

Р Е З Ю М Е

Изучены экстракции суммы фенольных соединений, гидроксикоричных кислот, флавоноидов и хлорофиллов из листьев эвкалипта прутовидного. Для экстрагирования БАВ использовали растворители с разной диэлектрической постоянной. Установлено, что содержание основных БАВ в этилацетатном наиболее сравнимо с их содержанием в первичном этанольном экстракте, из которого в дальнейшем получают густой экстракт хлорофиллипта. Путем изучения химического состава и антимикробной активности доказана возможность создания модифицированного экстракта из листьев эвкалипта, аналогичного Хлорофиллипту, без использования спирта этилового, с помощью этилацетатной экстракции.

О. Н. Koshevoy, А. S. Kuhtenko, А. М. Kovaleva, А. N. Komissarenko, Е. V. Vinnik

OPTIMIZATION OF THE EXTRACTIONS PROCESS OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES FROM EUCALYPTUS LEAVES: CHOICE SOLVENTS

Key words: optimization, extraction, leaves, *Eucalyptus viminalis*

S U M M A R Y

The Study of hydrocinamic acids, flavonoids, phenolic substances and chlorophyll extraction from *Eucalyptus viminalis* leaves has been carried out. For extraction of BAS solvents with different dielectric constants have been used. It was installed, that the contents of main BAS in ethylacetate extract were comparable with their contents in primary alcohol extract, from which hereinafter got the thick extract chlorophyllipt. By the way of the studies of chemical composition and antibacterial activities the possibility of the making the modified extract from *Eucalyptus* leaves, similar chlorophyllipt, without use the alcohol, by means of ethylacetate extractions were proved.