

# ИЗУЧЕНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ЭКСТРАГЕНТА НА РАСПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЛИСТЬЕВ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО МЕЖДУ ФАЗАМИ

## **Н. Н. Бойко**

к.фарм.н., младший научный сотрудник НОЦ «Фармация» НИУ «БелГУ» (Белгород)  
e-mail: [boykoniknik@gmail.com](mailto:boykoniknik@gmail.com)

## **Д. И. Писарев**

д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ» (Белгород)

## **Е. Т. Жиликова**

д.фарм.н., профессор заведующий кафедрой фармацевтической технологии НИУ «БелГУ» (Белгород)

## **О. О. Новиков**

д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии НИУ «БелГУ» (Белгород)

Проведен ВЭЖХ анализ спиртоводных экстрактов из листьев эвкалипта прутовидного. Построена математическая модель процесса распределения веществ между фазами. Показано, что диэлектрическая постоянная растворителя играет важную роль в процессе распределения веществ между фазами.

*Ключевые слова:* листья эвкалипта прутовидного, эуглобали, диэлектрическая постоянная.

## ВВЕДЕНИЕ

На данный момент в хирургии, дерматологии, отоларингологии и ряде других областях медицины существует острая необходимость в антимикробных препаратах, к которым у микроорганизмов не выработалась устойчивость [1]. Некоторые успехи в этом деле были достигнуты отечественными учеными в середине XX века из ФГБНУ ВИЛАР, г. Москва и из ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины», г. Харьков в результате исследований некоторых видов листа эвкалипта. При этом усилиями первых был разработан препарат «Эвкалимин» [2], а вторых «Хлорофиллипт» [3]. Данные препараты по антимикробной ак-

тивности практически не уступают антибиотикам, а микроорганизмы почти не вырабатывают устойчивости к ним. Поэтому исследования в области выделения биологически активных веществ (БАВ) с антимикробной активностью из данного вида сырья являются актуальными.

Цель данной работы – изучить и смоделировать влияние экстрагента на распределение основных групп БАВ из листа эвкалипта прутовидного между фазами на примере раствора спирта этилового различной концентрации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использовали измельченные листья эвкалипта

прутовидного с размером частиц 0,1-0,5 мм. Экстрагент спиртоводные смеси 26, 43, 59, 72, 81, 97±1 % об. Температура экстракции 24±1 °С. Метод экстракции – мацерация в течение 24 часов. Соотношение растительное сырье : экстрагент 1:10 (масс./об.). Анализ основных групп БАВ в экстрактах проводили с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) с диодно-матричным детектором при длинах волн 275, 325, 350, 660 нм на приборе «Agilent Technologies 1200 Infinity», производства США. Для идентификации использовали стандартные образцы Государственной Фармакопеи Украины: хлорогеновая кислота, рутин, ФСО густой экстракт хлорофиллипта. Более подробно методика проведения ВЭЖХ-анализа описана в работе [4].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**В**ЭЖХ-анализ экстрактов выявил в них наличие хлорогеновой кислоты, рутина и производного кемпферола, а также ряд эуглобалей. По данным литературы именно последняя группа веществ ответственна за антимикробную активность упомянутых выше препаратов [2]. Результаты ВЭЖХ-анализа экстрактов приведены в таблице 1.

Таблица 1 - Величина площади пика для основных соединений идентифицированных в экстрактах из листа эвкалипта прутовидного с помощью ОФ ВЭЖХ на основе этанола разной концентрации

Соединение (λ, нм)	Время удерживания, мин*	Площадь пика соединения, mAU·s*					
		Этанол, % об.					
		26	43	59	72	81	97
1	2	3	4	5	6	7	8
1. Хлорогеновая кислота (325.4)	6.1±0.1	633±19	638±19	637±19	<b>647±19</b>	610±18	254±8
2. Концентрация хлорогеновой кислоты, мг/мл	-	0.185± 0.006	0.186± 0.006	0.186± 0.006	<b>0.189± 0.006</b>	0.178± 0.005	0.074± 0.002
3. Рутин (350.4)	16.1±0.1	1313±39	1464±44	1497±45	<b>1515±46</b>	1345±40	463±14
4. Концентрация рутина, мг/мл	-	0.89± 0.03	0.99± 0.03	1.01± 0.03	<b>1.03± 0.03</b>	0.91± 0.03	0.314± 0.009
5. Соединение кемпферола (360.4)	19.2±0.2	671±20	767±23	766±23	<b>783±24</b>	704±21	391±12

Как видно из данных таблицы 1, максимум экстракции хлорогеновой кислоты, рутина, соединения кемпферола и двух эуглобалей 1, 2 приходится на концентрацию этанола 72 % об. При этом максимальное содержание эуглобалей 3, 4 наблюдалось в этаноле 97 % об. Интересно отметить, что среди эуглобалей существует две группы, причем одна из них более гидрофильная и вероятно является гликозидной формой (эуглобали 1, 2), а другая более гидрофобная и вероятно является агликоновой формой (эуглобали 3, 4). Следует отметить, что сумма площадей агликоновых форм эуглобалей несколько превышает сумму площадей гликозидных форм.

Далее была построена зависимость содержания приведенных выше веществ в безразмерном виде (путем деления значений площади пика соединения на максимальное среди них) от концентрации этанола, которая отображена на рисунке 1.

Как видно из рисунка 1, такие вещества как хлорогеновая кислота, рутин, соединение кемпферола имеют похожую зависимость ступенеобразной формы. Эуглобали 1-4 имеют сигмообразную форму. Интересно отметить, что при концентрации этанола

6. Эуглобаль 1 (275.4)	40.9±0.1	74.1±2.2	234±7	396±12	<b>466±14</b>	444±13	419±13
7. Эуглобаль 2 (275.4)	45.3±0.1	43.8±1.3	456±14	1256±38	<b>1432±43</b>	1345±40	1208±36
8. Эуглобаль 3 (275.4)	46.7±0.1	18.0±0.5	15.4±0.5	372±11	1261±38	1596±48	<b>1904±57</b>
9. Эуглобаль 4 (275.4)	48.3±0.1	0	0	43.3±1.3	258±8	386±12	<b>510±15</b>
10. Концентрация ФСО густого экстракта хлорофиллигтам/мл	-	0.081±0.006	0.068±0.005	1.67±0.13	5.66±0.45	7.17±0.57	<b>8.55±0.68</b>

\* Среднее значение и ошибка среднего найдены при числе повторов  $n=3$  и доверительной вероятности  $P=0.95$ .

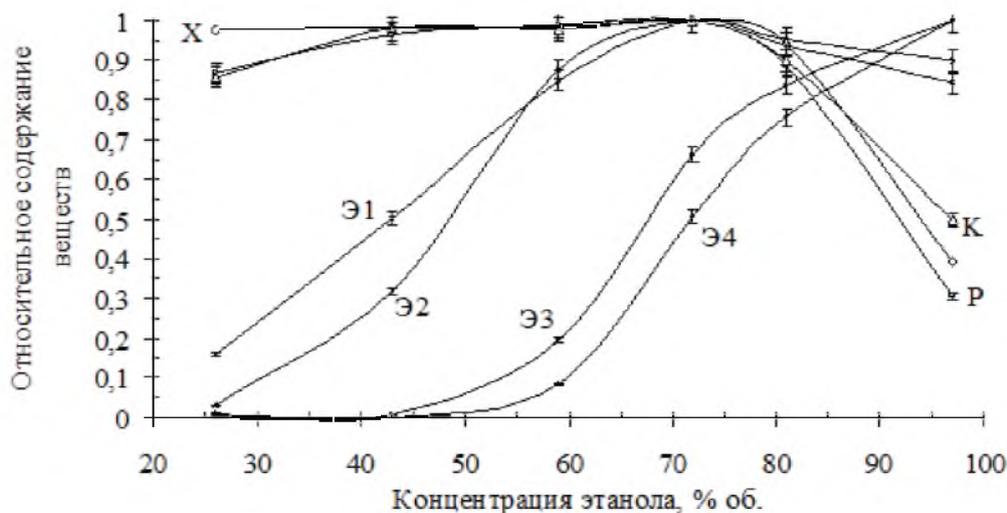


Рисунок 1 - Зависимость относительного содержания веществ в экстракте от концентрации этанола, % об. Легенда: X – хлорогеновая кислота; P – рутин; K – соединение кемпферола; Э1-4 – эуглобали.

80-85 % об, наблюдается диапазон наиболее близкого расположения всех идентифицированных веществ, в том числе и агликонов эуглобалией 3, 4. Это дает возможность рекомендовать изменить существующие нормы в концентрации этанола при получении настойки эвкалипта с 70 % об до 80-85 % об, поскольку в этом случае она должна будет обладать большей антимикробной активностью.

Для возможности моделирования зависимости концентрации вещества от физико-химических свойств растворителя были

использованы некоторые допущения в основе, которых лежит гипотеза, что ключевым параметром растворителя является его диэлектрическая проницаемость, а теоретическая зависимость концентрации гидрофильного вещества в экстракте от диэлектрической постоянной растворителя должна описываться уравнением вида  $\ln C = d/\epsilon^2 + b/\epsilon + a$ . Более подробно эти вопросы освещены в работе [4].

Для этого была построена зависимость  $\ln(S/S_{\max}) = f(1/\epsilon)$ , отображенная на рисунке 2, которая для хлорогеновой кислоты, рутина,

соединения кемпферола хорошо описывалась регрессионным уравнением вида:  $\ln(S/S_{\max}) = d/\varepsilon^2 + b/\varepsilon + a$ , с коэффициентом корреляции  $R^2 \geq 0,99$ . При этом максимум диэлектрической постоянной для этих веществ имел значение  $\varepsilon = 45 \pm 5$ ,  $46 \pm 4$ ,  $45 \pm 5$  соответственно.

Для эуглобaley 1-4 эта зависимость не давала адекватных результатов, что вероятно объясняется их сильными липофильными свойствами и требует коррекции в модели. При этом максимум диэлектрической постоянной для этих веществ лежит ниже  $\varepsilon = 35$  единиц.

Таким образом, предложенная математическая модель зависимости концентрации вещества в экстракте от диэлектрической постоянной растворителя апробирована на гидрофильных веществах листа эвкалипта прутовидного (хлорогеновая кислота, рутин, соединение кемпферола) и адекватно описывает экспериментальные данные. Однако для описания поведения гидрофобных веществ (эуглобaley 1-4), данная модель не подходит и требует корректировки и дополнительных исследований.

В результате найденных оптимальных значений диэлектрической постоянной растворителя на примере этанола различной концентрации целесообразно проверить влияние других видов широко используемых растворителей на выход эуглобaley и поиска среди них более подходящих экстрагентов. Подобные исследования могут дать возможность целенаправленного поиска оптимальных условий выделения эуглобaley из листа эвкалипта прутовидного и совершенствования технологии получения таких препаратов как «Настойка эвкалипта», «Хлорофиллипт», «Эвкалимин».

## ВЫВОДЫ

В результате проведенного ОФ ВЭЖХ анализа спиртоводных экстрактов из листа эвкалипта прутовидного были идентифицированы хлорогеновая кислота, рутин, соединение кемпферола и эуглобaley вероятно в виде агликонов и гликозидов. Изучена зависимость относительного содержания данных веществ в экстрактах. Найдено, что для концентрации этанола  $70 \pm 4$  % об, характерна макси-

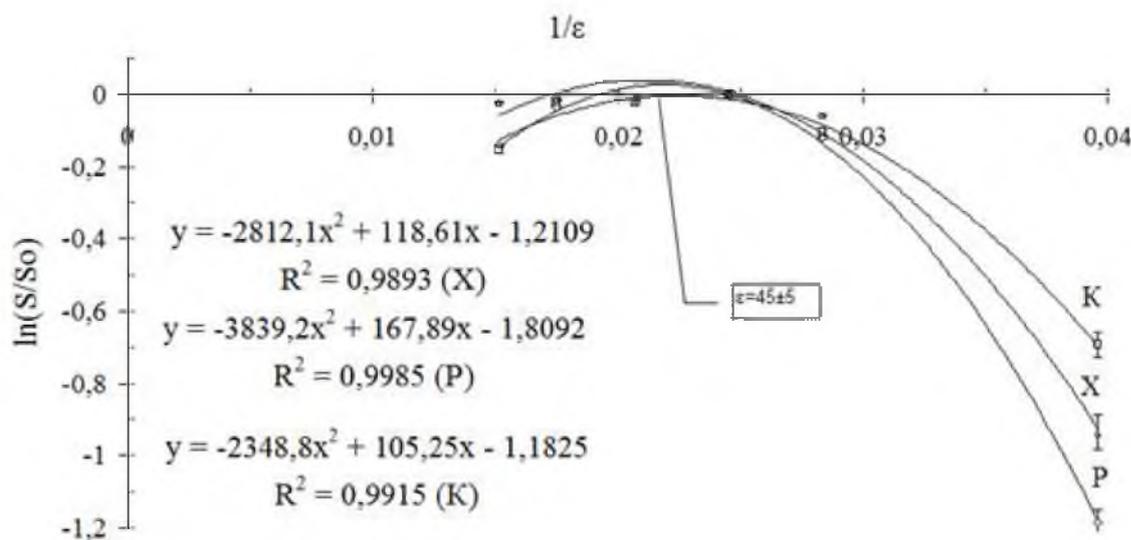


Рисунок 2 - Зависимость относительного содержания хлорогеновой кислоты (X), рутина (P), соединения кемпферола (K) в экстракте от диэлектрической проницаемости растворителя.

---

---

мальная степень экстракции хлорогеновой кислоты, рутина, соединения кемпферола и вероятно гликозидов эуглобалей. Для концентрации этанола более 80 % об, характерно селективное извлечение эуглобалей по сравнению с другими веществами, причем содержание агликоновой формы эуглобалей преобладает над их гликозидной формой.

Найден оптимальный диапазон значений диэлектрической проницаемости растворителя для эуглобалей, который должен быть менее  $\epsilon=35$  единиц. Обсуждены перспективы дальнейших исследований и возможные целенаправленные изменения в технологии получения препаратов «Настойка эвкалипта», «Хлорофиллипт», «Эвкалимин» из листа эвкалипта прутовидного.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Antimicrobial resistance. Global report on surveillance / Geneva: World Health Organization, 2014; 232 p.
2. Фитопрепарат антимикробного и противовоспалительного действия – эвкалимин / Семкина О.А., Сокольская Т.А., Краснюк И.И. и др. // Химико-фармацевтический журнал. 2006. Том 40, №8. – С. 52-56.
3. Пат. № 5242 UA. Спосіб одержання хлорофіліпту: № 2753048/SU. Надтока В.Л., Божко Н.Г., Грижко А.О. Заявл. 25.04.79; Опубл. 28.12.94, Бюл. № 7-1. (На Укр.).
4. The role of solvent dielectric constant in modeling of the extraction process of phenolic compounds from silybum marianum l. Fruits / Boyko Nikolay N., Dmitriy I. Pisarev, Elena T. Zhilyakova et al. // Journal of Pharmacy Research. – 2018; 12(4): 440-45.