

УДК 615.322:582.883.4

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕРПЕНОИДНЫХ ФЕНОЛАЛЬДЕГИДОВ В ЛИСТЬЯХ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО

© Р.Ш. Хазиев*, М.В. Васильева, А.С. Макарова, Л.Т. Мусина

Казанский государственный медицинский университет, ул. Бутлерова, 49,
Казань, 420012 (Россия), e-mail: haziev@inbox.ru

Разработан способ определения терпеноидных фенолальдегидов в листьях эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.) спектрофотометрическим методом. Относительная ошибка определения не превышает $\pm 2,41\%$. Показана связь между уровнем терпеноидных фенолальдегидов, определяемых разработанным методом, и антибактериальной активностью содержащих их извлечений.

Ключевые слова: эвкалипт прутовидный, *Eucalyptus viminalis* Labill., терпеноидные фенолальдегиды, стандартизация, антибактериальная активность.

Введение

Листья эвкалипта прутовидного, служащие источником ряда препаратов антимикробного и противовоспалительного действия – настойки, эфирного масла, «Хлорофиллипта», «Галенофиллипта», стандартизуются в настоящее время Государственной фармакопеей по содержанию эфирного масла [1, с. 257–258]. Вышедшие в последние годы нормативные документы различных производителей (ОАО «Красногорск-лексредства», ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга», ООО ПКФ «Фитофарм»), кроме этого показателя стандартизуют листья эвкалипта прутовидного и по содержанию терпеноидных фенолальдегидов [2–4]. При небольших различиях метод определения терпеноидных фенолальдегидов в этих нормативных документах принципиально один и тот же – фенолальдегиды экстрагируются 70 или 95% спиртом и полученный раствор фотометрируется при 278 нм. Однако, на наш взгляд, этот метод дает завышенные результаты, поскольку спиртовое извлечение не подвергается никакой очистке и будет содержать помимо фенолальдегидов, другие фенолы, находящиеся в листьях эвкалипта (флавоноиды, танины, фенолкарбоновые кислоты) и поглощающих свет при используемой длине волны.

Целью нашей работы – разработка метода количественного определения фенолальдегидов лишеного этого недостатка.

Экспериментальная часть

В качестве объекта исследования использовали листья эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.) из семейства миртовых – *Myrtaceae*, заготовленные в сентябре 2011 г. в Абхазии.

Хазиев Рамиль Шамилович – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии,
тел.: (843) 521-27-88, e-mail: haziev@inbox.ru
Васильева Марина Вячеславовна – студентка,
тел.: (843) 521-27-88
Макарова Алёна Сергеевна – студентка,
тел.: (843) 521-27-88, e-mail: anela_90@mail.ru
Мусина Линара Табрисовна – профессор кафедры микробиологии, доктор медицинских наук,
тел.: (843) 236-13-51, e-mail: musina@kgmu.kcn.ru

Запись УФ-спектров и определение оптических плотностей полученных растворов проводили на спектрофотометре LAMBDA 25 (Perkin Elmer, США) в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Для тонкослойной хроматографии использовали пластины «Сорбфил» («ПТСХ-АФ-В», производитель ЗАО «Сорбполимер»). Извлечения хроматографировали в системе этилацетат – уксусная кисло-

* Автор, с которым следует вести переписку.

та – вода (5 : 1 : 1), детектирование зон абсорбции флавоноидов проводили в видимом и УФ-свете до и после обработки 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, дубильных веществ и фенолкарбоновых кислот – до и после обработки хлоридом (III) железа.

Оценку антибактериальной активности проводили методом двукратных серийных разведений на мясо-пептонном бульоне (МПБ) при pH 7,0 с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P [5]. Однако метод серийных разведений в МПБ зачастую не позволяет визуально определить наличие или отсутствие роста из-за помутнения среды.

Чтобы устранить этот недостаток фармакопейной методики, нами был разработан метод, где антибактериальную активность определяли, делая пересев из каждой пробирки на чашки с мясо-пептонным агаром (МПА), которые затем инкубировали в термостате в течение 18–24 ч. Отмечали рост микроорганизмов. Разведение препарата, на котором отсутствовал рост тест-штамма, характеризовало антибактериальную активность препарата.

Результаты и обсуждение

Проведенное нами определение содержания терпеноидных фенолальдегидов в образцах листьев эвкалипта прутовидного методами, изложенными в нормативных документах различных производителей [2–4], дало результаты на уровне от 11 до 15% при норме 3% [3, 4] и 5% [2], что косвенно свидетельствовало о правомочности наших сомнений в точности данных методик. К тому же УФ-спектр полученного спиртового экстракта имел в измеряемом диапазоне скорее точку перегиба, нежели четко выраженный максимум, что также говорило о поглощении сопутствующих веществ (рис. 1).

Терпеноидные фенольдегиды (эуглобали, макрокарпали и сидероксилонали) являются липофильными соединениями и, по мнению ряда авторов, лучше всего экстрагируются не этиловым спиртом, а петролейным эфиром с небольшими добавками (до 20%) ацетона [6]. Поскольку сопутствующие вещества фенольной природы, искажающие результаты определения фенолальдегидов, о которых речь шла выше, имеют гидрофильную природу, мы использовали избирательную экстракцию фенолальдегидов гидрофобным растворителем – гексаном. ТСХ-анализ показал отсутствие вышеупомянутых примесей в гексановом извлечении. УФ-спектр гексанового экстракта имел отчетливый максимум при 278 ± 3 нм, характерный для фенолальдегидов эвкалипта, который и был выбран в качестве аналитической длины волны (рис. 2).

Известно, что фенольные гидроксилы, находящиеся по соседству с карбонильной группой, могут образовывать комплексы с хлоридом алюминия, которые вызывают bathochromный сдвиг максимумов поглощения в УФ-спектре. В частности, эта реакция широко используется в анализе флавоноидов [7]. Мы предположили, что фенолальдегиды эвкалипта могут образовывать аналогичные комплексы с хлоридом алюминия с соответствующим bathochromным сдвигом.

Для проведения реакции гексановое извлечение упаривали под вакуумом, остаток растворяли в 95% этиловом спирте и добавляли 3% спиртовый раствор алюминия хлорида. Наблюдаемый bathochromный сдвиг максимума поглощения (около 15–20 нм) явился дополнительным доказательством того, что поглощение гексанового экстракта в УФ-свете обусловлено терпеноидными фенолальдегидами эвкалипта.

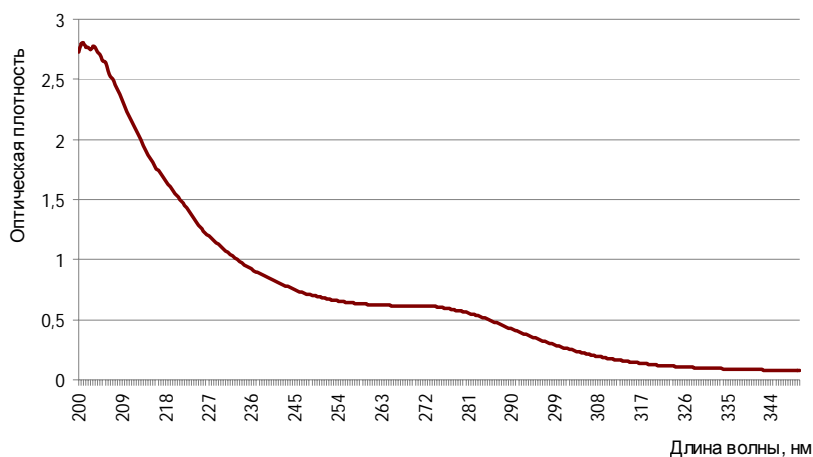


Рис. 1. УФ-спектр этанольного экстракта *E. viminalis*

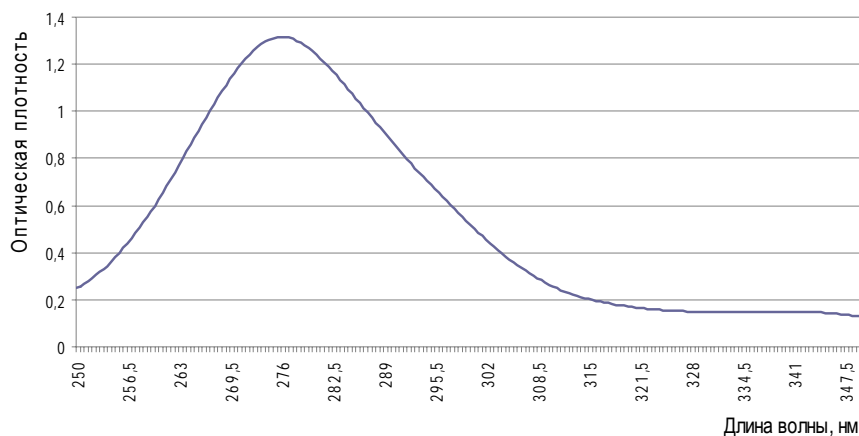


Рис. 2. УФ-спектр гексанового экстракта *E. viminalis*

УФ-спектры гексанового и спиртового растворов (без хлорида алюминия) оказались одинаковыми как по характеру кривой, так и по показателю поглощения в точке максимума. Это позволило нам использовать удельный показатель поглощения эвкалимина в спирте для нашей методики.

На дальнейших этапах разработки методики были определены условия исчерпывающей экстракции терпеноидных фенолальдегидов по соотношению сырья и экстрагента и продолжительности нагревания (табл. 1).

Полученные результаты показали, что условиями исчерпывающей экстракции фенолальдегидов из листьев эвкалипта прутовидного является часовая экстракция кипящим гексаном при соотношении сырья и растворителя 1 : 200.

Все вышеизложенное позволило нам предложить следующую методику количественного определения.

Методика количественного определения суммы терпеноидных фенолальдегидов в листьях эвкалипта прутовидного

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера 1 мм. Около 1 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 500 мл, прибавляют 200 мл гексана. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане при умеренном кипении гексана в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводя объем раствора до метки гексаном.

1 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора до метки гексаном. Измерение оптической плотности раствора проводят при длине волны 278 нм, используя в качестве раствора сравнения гексан. Содержание суммы терпеноидных фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$X = \frac{D \cdot 200 \cdot 50 \cdot 100}{720 \cdot m \cdot 1 \cdot (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; 720 – удельный показатель поглощения ГСО эвкалимина; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании, %.

Для определения метрологических характеристик разработанной методики провели 10 параллельных определений (табл. 2).

Таблица 1. Зависимость выхода фенолальдегидов листьев эвкалипта прутовидного в гексан от параметров экстракции

Соотношение сырье (г) – экстрагент (мл)	Время экстракции, мин	Содержание суммы фенолальдегидов в пересчете на эвкалимин, %
1 : 100	30	3,99±0,03
1 : 100	60	4,98±0,05
1 : 100	90	5,25±0,12
1 : 200	30	4,07±0,09
1 : 200	60	5,58±0,13
1 : 200	90	5,57±0,03

Таблица 2. Метрологические характеристики метода определения фенолальдегидов в листьях эвкалипта прутовидного

f	\bar{X}	S ²	S	P	t (0,95; 9)	Δx	ε, %
9	5,58	0,0354	0,1881	0,95	2,26	0,13	±2,41

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной воспроизводимости методики, ошибка единичного определения не превышает ± 2,41%.

Для установления корреляции между содержанием фенолальдегидов, определенных разработанным нами способом, и уровнем антимикробной активности были проведены микробиологические испытания методом двукратных серийных разведений на МПБ (рН 7,0) и последующим пересевом методом репликаций на чашки Петри с МПА с тест-микробом *Staphylococcus aureus* ATCC 6538-P. Для этого гексан из полученных извлечений отгонялся досуха под вакуумом, остаток растворялся в 50 мл 95% этанола. Полученный раствор подвергался микробиологическим испытаниям (табл. 3).

Испытанный раствор показал высокий уровень антимикробной активности, что подтверждает избирательную экстракцию действующих веществ эвкалипта прутовидного – терпеноидных фенолальдегидов гексаном.

Таблица 3. Антимикробная активность извлечения из листьев эвкалипта прутовидного (на культуре *Staphylococcus aureus* ATTC 6538-P)

Извлечение	Концентрация терпеноидных фенолальдегидов в извлечении, %	Максимальное разбавление извлечения, инактивирующее размножение стафилококков	Минимальная подавляющая концентрация терпеноидных фенолальдегидов, мкг/мл
Спиртовой экстракт (1 : 50), полученный после удаления гексана	0,11±0,02	1 : 256	4,4

Выводы

1. Разработанный метод количественного определения суммы фенолальдегидов в листьях эвкалипта прутовидного отличается хорошей воспроизводимостью, ошибка не превышает ±2,41%.

2. Высокая антибактериальная активность гексанового экстракта из листьев эвкалипта прутовидного подтверждает избирательную экстрагируемость фенолальдегидов выбранным растворителем.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. М., 1989. 400 с.
2. ФСП 42-8000-06. Эвкалипта прутовидного листья / ОАО «Красногорсклексредства». Введ. 16.10.06. М., 2006. 14 с.
3. ФСП 42-0039337502 Эвкалипта прутовидного листья. / ОАО «Фармацевтическая фабрика Санкт-Петербурга». Введ. 30.06.03 СПб., 2003. 14 с.
4. ФСП 42-2007-08. Эвкалипта прутовидного листья / ООО ПКФ «Фитофарм». Введ. 12.05.08. М., 2008. 10 с.
5. ФС 42-1348-91. Раствор хлорофиллипта спиртовый 1% / Фармакопейный государственный комитет. Введ. 10.10.91. М., 1991. 4 с.
6. Eschler B.M., Pass D.M., Willis R., Foley W.J. Distribution of foliar formylated phloroglucinol derivatives amongst *Eucalyptus* species // *Biochemical Systematics and Ecology*. 2000. Vol. 28. Pp. 813–824.
7. Тюкавкина Н.А., Зурабян С.Э., Белобородов В.Л., Лузин А.П. Органическая химия : учебник для вузов. Кн. 2: Специальный курс / под ред. Н.А.Тюкавкиной. М., 2008. 592 с.
8. Савина А.А., Захаров В.Ф., Цыбулько Н.С. Строение нового фенолальдегида из листьев *Eucalyptus viminalis* // *Химия природных соединений*. 1991. №6. С. 789–795.

Поступило в редакцию 23 июля 2012 г.

После переработки 15 января 2013 г.

Khaziev R.Sh.*, Vasilyeva M.V., Makarova A.S., Musina L.T. QUANTITATIVE DETERMINATION OF FORMYLATED PHLOROGLUCINOL COMPOUNDS IN THE LEAVES OF EUCALYPTUS VIMINALIS

Kazan State Medical University, ul. Butlerova, 49, Kazan, 420012 (Russia), e-mail: xaziev@inbox.ru

The way of determination of spectrophotometric method of formylated phloroglucinol compounds in the leaves of *Eucalyptus viminalis* was developed. The relative error of determination doesn't exceed 2,4%. The relation between the level of formylated phloroglucinol compounds determined by the developed method and antibacterial activity of extracts containing them is shown.

Keywords: *Eucalyptus viminalis*, formylated phloroglucinol compounds, standardization, antibacterial activity.

References

1. *Gosudarstvennaia farmakopeia SSSR: Vyp. 2. Obshchie metody analiza. Lekarstvennoe rastitel'noe syr'e. 11-e izd.* [State Pharmacopoeia of the USSR, Vol. 2. Common methods of analysis. Herbal drugs. 11th ed.]. Moscow, 1989, 400 p. (in Russ.).
2. *FSP 42-8000-06. Evkalipta prutovidnogo list'ia. OAO «Krasnogorskleksredstva».* [Pharmacopoeia article Enterprise 42-8000-06. Eucalyptus leaves. Public limited company «Krasnogorskleksredstva»]. Moscow, 2006, 14 p. (in Russ.).
3. *FSP 42-0039337502 Evkalipta prutovidnogo list'ia. OAO «Farmatsevticheskaia fabrika Sankt-Peterburga».* [Pharmacopoeia article Enterprise 42-0039337502. Eucalyptus leaves. Public limited company «Farmatsevticheskaia fabrika Sankt-Peterburga»]. St. Petersburg, 2003. 14 p. (in Russ.).
4. *FSP 42-2007-08. Evkalipta prutovidnogo list'ia. OOO PKF «Fitofarm».* [Pharmacopoeia article Enterprise 42-2007-08. Eucalyptus leaves. Ltd «Fitofarm»]. Moscow, 2008, 10 p. (in Russ.).
5. *FS 42-1348-91. Rastvor khlorofillipta spirtovyi 1%. Farmakopeinyi gosudarstvennyi komitet.* [Pharmacopoeia article 42-1348-91. Chlorophyllipta alcohol solution of 1%. State Pharmacopoeia Committee.]. Moscow, 1991, 4 p. (in Russ.).
6. Eschler B.M., Pass D.M., Willis R., Foley W.J. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2000, vol. 28, pp. 813–824.
7. Tiukavkina N.A., Zurabian S.E., Beloborodov V.L., Luzin A.P. *Organicheskaia khimiia: uchebn. dlia vuzov.* [Organic chemistry: a textbook for high schools.]. Moscow, 2008, part. 2, 592 p. (in Russ.).
8. Savina A.A., Zakharov V.F., Tsybul'ko N.S. *Khimiia prirodnikh soedinenii*, 1991, no. 6, pp. 789–795. (in Russ.).

Received July 23, 2013

Revised January 15, 2013

* Corresponding author.

