

Перспективи отримання густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської

О.М.Кошовий, Є.О.Передерій, І.С.Кащенко, О.П.Гудзенко, А.М.Ковальова,
А.М.Комісаренко, Н.І.Тихоненко

Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук,
ДЗ «Луганський державний медичний університет», кафедра технології ліків, організації та економіки фармації
Харків, Луганськ, Україна

Проведено вивчення ізопреноїдного складу та мікробіологічної активності густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської. Встановлено можливість створення нових рослинних субстанцій на основі густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської з використанням гексану, розчинів міді та цинку сульфатів.

Ключові слова: шавлія лікарська, листя, етилацетат, екстракт, модифікація, антимікробна активність.

ВСТУП

В усьому світі лікування інфекційних захворювань залишається актуальною проблемою. За даними ВООЗ (WHO, 2010), смертність хворих унаслідок інфекційних хвороб займає друге місце у світі. У пошуках ефективних засобів боротьби з інфекціями одним з найбільш перспективних напрямів є впровадження препаратів, які виявляють поряд з антибактеріальною дією також імуномодельючу активність, що характерно для рослинних засобів, зокрема представників роду *Salvia*.

Препарати шавлії лікарської широко використовують для лікування інфекційно-запальних захворювань верхніх дихальних шляхів, інфекцій ротової порожнини та шкірних покривів. В Україні та Російській Федерації зареєстровано близько 38 препаратів, з них 14 вітчизняного виробництва.

Раніше ми повідомляли, що первинні спиртові екстракти з листя шавлії лікарської та з

листя евкаліпту прутовидного мають схожий хімічний склад та містять похідні гідроксикоричної кислоти, кумарини, флавоноїди, поліфенольні сполуки, хлорофіли та терпеноїди. Крім того, екстракт з листя шавлії лікарської виявляє антимікробну активність по відношенню до грампозитивних та грамнегативних бактерій, грибів на рівні з екстрактом з листя евкаліпту прутовидного. Усе це свідчить про можливість створення нового антибактеріального засобу з листя шавлії лікарської [2, 5], аналогічного хлорофіліпту. Але в процесі екстракції використовували спирт етиловий, який підлягає предметно кількісному обліку та важко регенерується. Крім того, зміни податкового законодавства значно ускладнили систему повернення акцизного збору та списання цього розчинника. Усі ці фактори призвели до того, що більшість виробників зменшують обсяги роботи зі спиртом етиловим та бажають знайти йому заміну. В якості заміника було запропоновано використовувати етилацетат. Вивчено хімічний склад та антимікробну активність етилацетатного екстракту з листя шавлії лікарської [1].

З первинного густого спиртового екстракту з листя евкаліпту прутовидного за допомогою 4% розчину міді сульфату та бензолу, отримують густий екстракт хлорофіліпту, який у подальшому використовують для виробництва різних лікарських форм [3]. Подібна модифікація первинного екстракту значно підвищує його антимікробну активність.

Метою дослідження було встановити можливість створення нових густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської за технологічною схемою аналогічною хлорофіліпту шляхом вивчення їх хімічного складу та антимікробної активності.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Об'єктами дослідження були густий етилацетатний екстракт з листя *Salvia officinalis* (сер. 120409, ЗАТ «Ліктрави», м. Житомир), густі модифіковані етилацетатні екстракти, отримані з використанням гексану, цинку, міді, заліза та магнію сульфатів, та густий екстракт хлорофіліпту (сер. 331109, ТОВ «ДЗ «ГНЦЛС», м. Харків) як препарат порівняння.

Для проведення етилацетатної екстракції 500,0 г подрібненого шляхом вальцювання до розмірів часток 2,5-3,0 мм сухого листя шавлії лікарської заливали 2500,0 мл етилацетату та настоювали при кімнатній температурі протягом 5 годин. Екстракцію проводили тричі. Екстракти об'єднували, відганяли розчинник та отримували густий екстракт, який у подальшому очищали. Раніше нами була доведена доцільність заміни бензолу, який є кров'яною отрутою, на менш токсичний гексан [4]. Тому для подальшої очистки по 10,0 г густого етилацетатного екстракту з листя шавлії лікарської розчиняли в 50,0 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 отримували модифіковані густі екстракти, які в подальшому і досліджували.

Для вибору найбільш перспективної кислоти Льюїса в технології модифікації первинного етилацетатного екстракту з листя шавлії лікарської було проведено вивчення антимікробної активності отриманих екстрактів. Дослідження проводили методом дифузії в агар в Інституті мікробіології та імунології ім. І.І.Мечникова в лабораторії біохімії мікроорганізмів та живильних середовищ під керівництвом к.біол.н. Т.П.Осолодченко [1]. 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 біологічно активних добавок (БАР) в екстрактах використовували методи тонкошарової (ТШХ) та газової (ГХ) хроматографії.

В отриманих екстрактах проводили визначення кількісного вмісту основних груп іден-

тифікованих БАР. Кількісне визначення хлорофілів проводили спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Spescol 1500 (Швейцарія) [6]. 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: температура термостата програмувалася від 50°C до 250°C зі швидкістю 4°C/хв.; температура інжектора — 250°C; газ носій — гелій, швидкість потоку 1 мл/хв.; переніс від ГХ до МС прогрівався до 230°C; температура джерела підтримувалась 200°C; електронна іонізація проводилась при 70 eV у ранжировці мас m/z 29 до 450. Ідентифікація проводилася на основі порівняння отриманих мас-спектрів з даними бібліотеки NIST05-WILEY (близько 500000 мас-спектрів).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

В отриманих екстрактах з листя шавлії лікарської були ідентифіковані терпеноїди та хлорофіли *a* та *b*.

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

Результати дослідження терпеноїдного складу густих екстрактів з листя шавлії лікарської та хлорофіліпту наведені в табл. 1. У густому спиртовому екстракті з листя шавлії лікарської виявлено 38 речовин, 27 з яких ідентифіковано; в густому екстракті, модифікованому розчином міді сульфату, — 26 речовини, 24 з яких ідентифіковано; у густому екстракті, модифікованому розчином цинку сульфату, — 29 речовин, 27 з яких ідентифіковано; а в густому екстракті хлорофіліпту — 33, з яких ідентифіковано 26. В усіх екстрактах з листя шавлії лікарської домінуючими речовинами є б-туйон, в-туйон, 1,8-цинеол, камфора, борнеол, борнилацетат, каріофілен, гумулен, віридіфлорол та епі-маноол.

ТАБЛИЦЯ 1

Хімічний склад густих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської

Речовина	Часутримування, хв.	Об'єкт дослідження			
		Хлорофіліт	Шавлія (ЕА)	Шавлія (ЕА CuSO ₄)	Шавлія (ЕА ZnSO ₄)
б-пінен	5.96			0.42	0.24
камфен	6.35		0.89	0.58	0.48
*	6.71		0.22		
мірцен	7.46		0.19		
етилкапронат	7.69		0.21		
б-феландрен	7.84	3.13			
б-терпінен	8.18		0.23	0.3	0.42
п-цимен	8.44		0.22	0.2	0.27
лімонен	8.55		0.16	0.26	0.23
1,8-цинеол	8.64	11.15	8.14	7.35	6.98
г-терпінен	9.45		0.19	0.21	0.21
транс-ліналооксид	9.92			0.09	0.12
цис-ліналооксид	10.42		0.17		0.12
ліналоол	10.85		0.3	0.31	0.35
б-туйон	11.01		18.0	18.4	17.6
в-туйон	11.35		8.66	9.0	8.42
туйоловий спирт	11.99		0.21		0.23
транс-пінокарвеол	12.06	1.48			
камфора	12.27		15.5	15.8	15.6
метилкамфенілол	12.40				
пінокамфон	12.76		0.16		0.17
пінокарвон	12.84	0.41			
борнеол	12.98		4.61	5.06	5.13
терпінен-4-ол	13.35	0.68	0.3	0.41	0.30
*	13.72		0.31		
б-терпінеол	13.82	1.5			
миртенол	14.13		0.72		1.25
вербенон	14.43			0.35	
борнилацетат	16.94		1.41	1.54	1.55
*	17.16		0.22		
*	18.81		0.54		
б-терпінилацетат	19.01	0.57			
*	19.02		1.03		
геранілацетат	20.12	0.47			
б-гур'юнен	20.89	1.81			
каріофілен	21.20		2.57	3.59	3.06
каларен	21.59	1.15			
*	21.82		0.33	0.38	0.38
аромадендрен	21.84	26.01			
гумулен	22.25		2.57	3.4	3.08
алло-аромадендрен	22.48	3.95			
леден	23.53	2.55			
дегідроаромадендрен	24.26	0.47			
*	25.21	0.44			
епі-глобулол	25.45	3.47			
*	25.63	0.47			
каріофіленоксид	26.02		0.54	0.39	0.66
глобулол	26.10	14.66			
віридіфлорол	26.26	2.57	4.95	5.38	6.32
*	26.41		0.18		
епі-г-евдесмол	26.49	1.16			
гумуленоксид	26.63		0.85	0.74	1.05
епі-в-евдесмол	26.93	1.17			
кубенол	27.10	3.29			
аромадендренноксид	27.13		0.51	0.54	0.6
*	27.62		0.34	0.39	0.42
*	27.88		0.19		
*	28.94	0.69			
*	29.08	0.89			
*	29.42	0.73			
*	29.51	0.41			
*	29.77	0.61			
розіфоліол	30.08	2.06			
пальмітинова кислота	31.78	0.89	0.669	0.32	0.35
етилпальмітат	32.09	1.01			
епі-маноол	32.91		9.56	11.4	11.6
*	33.21		0.50		
фітол	33.33	0.51			
*	33.62		0.30		
етиллінолеат	33.78	0.32			
етилліноленат	33.85	0.68			

Примітка: * – речовина не ідентифікована.

У густому етилацетатному екстракті з листя шавлії лікарської вміст терпеноїдів складав $5,92 \pm 0,04\%$, а вміст хлорофілів *a* та *b* — $1,23 \pm 0,01\%$; у густих модифікованих екстрактах з використанням міді та цинку сульфату вміст терпеноїдів — $6,4 \pm 0,03\%$ та $5,25 \pm 0,04\%$, хлорофілів *a* та *b* — $3,63 \pm 0,02\%$ та $3,72 \pm 0,01\%$ відповідно; у густому екстракті хлорофіліпту вміст терпеноїдів — $4,29 \pm 0,03\%$, хлорофілів *a* та *b* — $3,31 \pm 0,01\%$.

ВИСНОВКИ

Таким чином, хімічним та мікробіологічним шляхом встановлена можливість створення нових густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської з використанням гексану та розчинів міді, цинку сульфатів.

Вивчено ізопреноїдний склад та антимікробну активність густих модифікованих етилацетатних екстрактів з листя шавлії лікарської, що буде використано при розробці методик контролю якості на нові рослинні субстанції.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вибір оптимального екстрагенту для створення нового лікарського засобу з листя шавлії лікарської / О.М.Кошовий, Є.О.Передерій, О.П.Гудзенко, А.М.Ковальова, А.М.Комісаренко // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — в друку.
2. Дослідження ізопреноїдного складу та антимікробної активності густого екстракту листя шавлії лікарської / О.М.Кошовий, Є.О.Передерій, Т.П.Осолодченко, А.М.Ковальова, А.М.Комісаренко // Клінічна фармація. — 2011. — Т.15, №1. — С. 26-29.
3. 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.
4. Перспективи модифікації технології отримання густого екстракту хлорофіліпту / А.М.Ковальова, О.С.Кухтенко, О.М.Кошовий, А.М.Комісаренко // Біологічно активні речовини: фундаментальні та прикладні питання одержання та застосування. Новий світ, 23-28 травня 2011. — 2011. — С. 265-266.
5. Перспективи створення нового антибактеріального засобу з листя шавлії лікарської / О.М.Кошовий, Є.О.Передерій, О.П.Гудзенко, А.М.Ковальова, А.М.Комісаренко // Український журнал клінічної та лабораторної медицини. — 2010. — №1. — С. 33-35.
6. Туманов В.Н. Качественные и количественные методы исследования пигментов фотосинтеза / В.Н.Туманов, С.Л.Чирук. — Гродно: ГрГУ им. Я.Купалы, 2007. — 62 с.

О.Н.Кошевой, Е.А.Передерий, И.С.Кашченко, А.П.Гудзенко, А.М.Ковалева, А.Н.Комиссаренко, Н.И.Тихоненко. Перспективы получения густых модифицированных этилацетатных экстрактов из листьев шалфея лекарственного. Харьков, Луганск, Украина.

Ключевые слова: шалфей лекарственный, лист, этилацетат, экстракт, модификация, антимикриальная активность.

Проведено изучение изопреноидного состава и микробиологической активности густых модифицированных этилацетатных экстрактов из листьев шалфея лекарственного. Установлена возможность создания новых растительных субстанций на основе густых модифицированных этилацетатных экстрактов из листьев шалфея лекарственного с использованием гексана, растворов меди и цинка сульфатов.

O.N.Koshevoy, E.A.Perederiy, I.S.Kashchenko, A.P.Gudzenko, A.M.Kovaleva, A.N.Komissarenko, N.I.Tihonenko. The prospects of creation thick modified ethylacetate extracts from Salvia officinalis leaves. Kharkiv, Lugansk, Ukraine.

Key words: Salvia officinalis leaves, ethylacetate, extract, modification, antibacterial activity.

Isoprenoids composition and antibacterial activity of the getting thick modified ethylacetate extracts from Salvia officinalis leaves were studied. The possibility of creation of new herbs substances on the base of thick modified ethylacetate extracts from Salvia officinalis leaves with using hexane, cuprum solution and zinc sulphates were installed.

Надійшла до редакції 31.03.2011 р.