ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ ХИМИЯ, ФАРМАКОГНОЗИЯ (14.04.02)

УДК 615.322:547.9 DOI: 10.17816/2075-2354.2018.18.17-21

ВЭЖХ-АНАЛИЗ ТЕРПЕНОИДНОГО КОМПЛЕКСА ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО (*EUCALYPTUS VIMINALIS* LABILL.)

А.С. Лапина[1], Н.Р. Варина[1], В.А. Куркин[1], Е.В. Авдеева[1], И.А. Платонов[2], Н.В. Никитченко[3]

[1] ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России;
[2] ФГАОУ ВО «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева»;
[3] ФГБОУ ВО «Самарский государственный технический университет» Минздрава России

Для цитирования: Лапина А.С., Варина Н.Р., Куркин В.А., и др. ВЭЖХ-анализ терпеноидного комплекса эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.) // Аспирантский вестник Поволжья. – 2018. – № 1–2. – С. 17–21. doi: 10.17816/2075-2354.2018.18.17-21

Поступила в редакцию: 18.01.2018 Принята к печати: 19.02.2018

▪ Работа посвящена вопросам фитохимического изучения листьев эвкалипта прутовидного и, в частности, терпеноидной гаммы биологически активных соединений. С позиций стандартизации сырья, как моно-, так и комплексных препаратов эвкалипта, рассмотрены возможности обнаружения наиболее фармакологически ценной группы — фенолоальдегидов терпеноидов (эуглобалей) хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ). В результате исследования разработаны методики качественного и количественного анализа, позволяющие оценивать подлинность и качество лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов эвкалипта прутовидного по содержанию указанной группы соединений.

▪ **Ключевые слова:** эвкалипт прутовидный, *Eucaliptus viminalis* Labill., ВЭЖХ-анализ, стандартизация, эвкалимин.

HPLC OF THE COMPLEX OF TERPENOIDS OF *EUCALYPTUS VIMINALIS* LABILL.

A.S. Lapina[1], N.R. Varina[1], V.A. Kurkin[1], E.V. Avdeeva[1], I.A. Platonov[2], N.V. Nikitchenko[3]

[1] Samara State Medical University;
[2] Samara National Research University;
[3] Samara State Technical University

For citation: Lapina AS, Varina NR, Kurkin VA, et al. HPLC of the complex of terpenoids of *Eucalyptus viminalis* Labill. *Aspirantskiy Vestnik Povolzhiya*. 2018;(1-2):17-21. doi: 10.17816/2075-2354.2018.18.17-21

Received: 18.01.2018 Accepted: 19.02.2018

▪ The article describes the problems of phytochemical investigation of *Eucalyptus viminalis* leaves and the complex of terpenoids as biologically active compounds in particular. The article also analyzes the possibility to detection the most pharmacologically important group such as phenolaldehydes of terpenoids (euglobals) by means of chromatographic methods (TLC and HPLC). As a result of the research, the methods of qualitative and quantitative analysis were developed. They allow to estimate the identification and quality of medicinal plant materials and medicines of *Eucalyptus viminalis*.

▪ **Keywords:** *Eucalyptus viminalis* Labill., HPLC, standardization, eukalimin.

Введение

Эвкалипт прутовидный (*Eucalyptus viminalis* Labill.) — представитель семейства Миртовые (*Myrtaceae*) — вечнозеленое дерево, широко культивируемое на территории России (Черноморское побережье Краснодарского края) и близлежащих стран (Абхазия, Грузия, Азербайджан). Листья эвкалипта обладают

бактерицидным, противовоспалительным, вяжущим, отхаркивающим, бронхолитическим и анальгетическим действием [7].

Сырье содержит эфирное масло — ведущую группу биологически активных соединений (БАС) до 3 %, главной составной частью которого является 1,8-цинеол (эвкалиптол), содержание которого достигает 60 %. В числе других компонентов эфирного масла — моноциклические монотерпены: пиперитон, α-фелландрен; бициклические — D-миртенол, α-пинен, камфен и др.; трициклические сесквитерпены — глобулол; в сырье содержатся также алифатические альдегиды. Второй группой БАС являются эуглобали, или фенолоальдегиды терпеноидов (в частности, эувималь-1), относящиеся к группе флороглюцинов и обладающие высокой антимикробной активностью, сопоставимой с таковой некоторых антибиотиков (но без развития привыкания) [2, 8, 9]. Несмотря на то, что в РФ существует нормативная документация на листья эвкалипта (ГФ СССР XI издания, ст. 15), в настоящее время актуальным представляется вопрос совершенствования методик анализа с учетом современного уровня развития фармацевтического анализа и с ориентиром на необходимость обнаружения терпеноидной гаммы, и, в частности, специфической и наиболее высоко активной группы БАС — эуглобалей [4, 5]. В связи с этим целесообразным является решение проблемы стандартизации в ряду: листья эвкалипта прутовидного — спирто-водное извлечение (настойки и экстракты) — комплексные препараты. Последнее обстоятельство указывает на необходимость привлечения метода ВЭЖХ-анализа, поскольку в случае многокомпонентных препаратов традиционно используемые для анализа эфирного масла методы ГХ и ГЖХ анализа не смогут быть применены без трудоемкой пробоподготовки для большинства классов природных БАС [1, 6, 10].

Целью настоящего исследования являлась разработка методик анализа терпеноидного комплекса листьев эвкалипта прутовидного с использованием метода ВЭЖХ.

В задачи исследования входило:

- хроматографическое исследование терпеноидной гаммы листьев эвкалипта прутовидного;
- разработка методики качественного анализа;
- разработка методики количественного анализа эуглобалей;
- адаптация разработанных методик для лекарственных препаратов эвкалипта.

Результаты и их обсуждение

Для предварительного изучения химического состава БАС в спирто-водном извлечении из листьев эвкалипта на 70 % спирте этиловом (оптимальный экстрагент для извлечения аналитов) использовался ТСХ-анализ, традиционно применяемый для целей первичной идентификации действующих веществ. Использовались пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (ТУ 26-11-17-89, зернение 5–17 мкм, тип сорбента — силикагель СТХ-1А, Россия), хроматографирование осуществлялось восходящим способом. Подготовку хроматографических пластинок осуществляли по стандартной методике в соответствии с ОФС.1.2.1.2.0003.15 ГФ РФ XIII издания [3].

В исследованиях были применены следующие системы растворителей:

А — хлороформ – метанол – вода (26 : 14 : 3);

Б — хлороформ – этанол (2 : 1), (4 : 1), (6 : 1), (9 : 1);

В — н-бутанол – уксусная кислота – вода (4 : 1 : 2).

В результате проведенных исследований было установлено, что наилучшее разделение достигается в системе хлороформ – этанол (4 : 1).

Детекция веществ осуществлялась в видимом и УФ-свете при 254 нм и 366 нм до и после обработки хроматограмм 10 % раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты. Терпеноидные соединения обнаруживались в виде сине-фиолетовых пятен на желтовато-коричневом фоне. Анализ хроматограмм показал наличие характерных пятен фиолетового цвета на хроматограммах спирто-водного извлечения на уровне пятна РСО эвкалимина (ВИЛАР), представляющего собой сумму эуглобалей. Полученные данные подтверждают факт перехода нативных терпеноидных соединений (а также комплекса соединений фенольной природы), содержащихся в листьях эвкалипта, в извлечение, что позволяет использовать подобранные условия проведения анализа в решении проблемы стандартизации фитопрепаратов на основе эвкалипта.

Аналогично (в предложенных условиях ТСХ) был исследован ряд настоек эвкалипта, полученных промышленным способом (производства Тульской, Ивановской, Тверской фармацевтических фабрик), в качестве РСО использовался эвкалимин. Результат показал наличие нативного терпеноидного комплекса в изученных образцах.

В ходе дальнейших исследований нами изучена возможность использования метода ВЭЖХ-анализа для целей качественного

Рис. 1. ВЭЖХ-анализ настойки эвкалипта

Fig. 1. HPLC analysis of eucalyptus tincture

Рис. 2. ВЭЖХ-анализ РСО эвкалимина

Fig. 2. HPLC analysis of Working standard of eucalimin

и количественного анализа лекарственных препаратов эвкалипта прутовидного (на 70 % спирте этиловом). Поскольку ВЭЖХ-анализ является одним из самых информативных методов в плане идентификации веществ (по времени удерживания по сравнению с веществами-стандартами) и их количественного определения, то параллельно оценивался хроматографический профиль всей нативной гаммы БАС. Для объективизации исследований был использован РСО эвкалимина.

Определение проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-5» (НПО «Научприбор», Россия) в изократическом режиме (стальная колонка — Диасорб С-16 № 2075 (2 мм × 80 мм)). Температура в хроматографической комнате в процессе эксперимента составила 22–23 °С. Подвижной фазой являлись различные соотношения ацетонитрила и воды (3 : 7; 2 : 8; 2,5 : 7,5) с добавлением 1 % уксусной кислоты, скорость элюирования: 100 мкл/мин; объем элюента: 2500 мкл; объем пробы: 5 мкл.

В результате исследований посредством сравнения спектральных отношений извлечения (и в последующем — настоек) эвкалипта и РСО эвкалимина мы пришли к заключению, что оптимальной системой, позволяющей достичь наиболее эффективного хроматографического разделения аналитов, явилась система ацетонитрил — вода (2,5 : 7,5) с добавлением 1 % уксусной кислоты. Все хроматограммы обрабатывали по схеме: сглаживание 20 единиц → разметка пиков (проводили вручную) при λ = 254; 270; 290; 330 нм.

На рисунках 1 и 2 представлены хроматограммы настойки эвкалипта прутовидного и эвкалимина. Из представленных данных видно, что время удерживания пика 1 настойки эвкалипта совпадает со временем удерживания эвкалимина, что служит подтверждением его наличия в настойке. Данный факт

может служить надежным доказательством подлинности и качества лекарственного препарата эвкалипта и позволяет защитить конечного потребителя от фальсифицированной продукции.

Методика ВЭЖХ-анализа фенолальдегидов терпеноидов

ВЭЖХ-анализ эуглобалей проводится после предварительной пробоподготовки с применением гексана. Гексановые извлечения из лекарственного препарата получают при семикратной обработке по 5 мл гексана 5 мл исходного препарата с использованием делительной воронки. Полученные гексановые извлечения объединяют в мерную колбу емкостью 50 мл, доводят гексаном до метки. Определение проводят на ВЭЖХ хроматографе «Милихром-5», в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме: колонка – Диасорб С-16 № 2075 (2 мм × 80 мм); подвижная фаза — система ацетонитрил – вода (2,5 : 7,5) с добавлением 1 % уксусной кислоты; объем элюента — 2500 мкл, объем пробы — 5 мкл, скорость элюирования — 100 мкл/мин. Детекцию веществ осуществляли при пяти длинах волн — 254, 270, 290, 330 и 360 нм.

Содержание суммы фенолоальдегидов терпеноидов в исследуемых образцах листьев эвкалипта составило 3,56 ± 0,5 %.

Проведенный блок исследований может служить основой для решения вопросов химической стандартизации комплексных препаратов с включением в состав листьев эвкалипта. Такие исследования были, в частности, проведены нами в отношении разработанного фитопрепарата «Дентос» на основе пяти видов лекарственного растительного сырья, содержащего разнообразные по физико-химическим характеристикам группы БАС.

Заключение

Таким образом, в результате хроматографического изучения терпеноидной гаммы эвкалипта методами ТСХ и ВЭЖХ были разработаны методики качественного и количественного анализа сырья и некоторых препаратов растения.

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Багирова В.Л., Ковалева Е.Л., Садчикова Н.П. О стандартизации лекарственных средств на современном этапе // Хим.-фармац. журн. – 2001. – Т. 34. – № 11. – С. 46–47. [Bagirova VL, Kovaleva EL, Sadchikov NP. The standardization of therapeutic agents: Current status. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2000;34(11):617-618. (In Russ.)]
2. Вичканова С.А., Крутикова Н.М. Клиническая эффективность эвкалимина в качестве антибактериального и противовоспалительного средства общерезорбтивного действия // Химия, технология, медицина: Труды ВИЛАР. – М., 2000. – С. 347–357. [Vichkanova SA, Krutikova NM. Klinicheskaya effektivnost' evkalimina v kachestve antibakterial'nogo i protivovospalitel'nogo sredstva obshcherezorbtivnogo deystviya. Khimiya, tekhnologiya, meditsina: Trudy VILAR. Moscow; 2000. P. 347-357. (In Russ.)]
3. Государственная Фармакопея Российской Федерации. XIII издание / МЗ РФ. – М., 2015. – Т. 2. – С. 280–289. [The State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. Ministry of Health of the Russian Federation. Moscow; 2015. Vol. 2. P. 280-289. (In Russ.)]
4. Государственная Фармакопея СССР: 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 1. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с. [USSR State Pharmacopeia. 11th edition. Ministry of Health of the USSR. Issue 1: General methods of analysis. Moscow: Medicine; 1987. 336 p. (In Russ.)]
5. Государственная Фармакопея СССР: 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1990. – 400 с. [USSR State Pharmacopeia. 11th edition. Ministry of Health of the USSR. Issue 2: General methods of analysis. Medicinal plant raw materials. Moscow: Medicine; 1990. 400 p. (In Russ.)]
6. Зилфикаров И.Н. Новые подходы в разработке и стандартизации фитопрепаратов из эфирномасличного сырья: дис. ... д-ра фарм. наук. – Пятигорск, 2008. – 170 с. [Zilfikarov IN. Novye podkhody v razrabotke i standartizatsii fitopreparatov iz efirnomaslichnogo syr'ya. [dissertation] Pyatigorsk; 2008. 170 p. (In Russ.)]
7. Куркин В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармац. вузов. – Изд. 3-е, перераб. и доп. – Самара: Офорт; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с. [Kurkin VA. Farmakognoziya: Uchebnik dlya studentov farmats. vuzov. Samara: Ofort, SamSMU; 2016. 1279 p. (In Russ.)]
8. Цыбулько Н.С. Исследование и стандартизация биологически активных соединений препарата «Эвкалимин»: автореф. дис. … канд. мед. наук. – М., 1994. – 22 с. [Tsybul'ko NS. Issledovanie i standartizatsiya biologicheski aktivnykh soedineniy preparata "Evkalimin". [dissertation] Moscow; 1994. 22 p. (In Russ.)]
9. Шагалиева Н.Р., Куркин В.А., Авдеева Е.В., и др. Сравнительное исследование антимикробной активности некоторых лекарственных средств, применяемых в челюстно-лицевой хирургии и в стоматологии // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник

научных трудов. – Пятигорск, 2011. – Вып. 66. – С. 611–613. [Shagalieva NR, Kurkin VA, Avdeeva EV, et al. Sravnitel'noe issledovanie antimikrobnoy aktivnosti nekotorykh lekarstvennykh sredstv, primenyaemykh v chelyustno-litsevoy khirurgii i v stomatologii. Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmatsevticheskoy produktsii: sbornik nauchnykh trudov. Pyatigorsk; 2011. Vol. 66. P. 611-613. (In Russ.)]

10. Santos SAO, Freire CSR, Neto CP, et al. Characterization of phenolic components in polar extracts of *Eucalyptus globulus* Labill. bark by high-performance liquid chromatography – mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 2011;59(17):9386-9393. doi: 10.1021/jf201801q.

Информация об авторах

Анастасия Сергеевна Лапина — аспирант кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: nstjlapina@rambler.ru

Наталья Рашидовна Варина — кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: shagalieva.nr@mail.ru

Владимир Александрович Куркин — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Елена Владимировна Авдеева — доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии. E-mail: avdeeva.ev@gmail.com

Игорь Артемьевич Платонов — доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой химии. E-mail: pia@ssau.ru

Наталья Викторовна Никитченко — кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник кафедры «Химия и технология органических соединений азота». E-mail: navinita@mail.ru

Information about the authors

Anastasia S. Lapina — Post-graduate student, Department of Pharmacognosy with Botany and Basics of Phytotherapy. E-mail: nstjlapina@rambler.ru

Natalia R. Varina — Candidate of Pharmaceutical Sciences, Assistant, Department of Pharmacognosy with Botany and Basics of Phytotherapy. E-mail: shagalieva.nr@mail.ru

Vladimir A. Kurkin — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy with Botany and Basics of Phytotherapy. E-mail: kurkinvladimir@yandex.ru

Elena V. Avdeeva — Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor, Department of Pharmacognosy with Botany and Basics of Phytotherapy. E-mail: avdeeva.ev@gmail.com

Igor A. Platonov — Doctor of Engineering, Professor, Head of the Chemistry Department. E-mail: pia@ssau.ru

Natalia V. Nikitchenko — Candidate of Chemical Sciences, Leading researcher of the Department of Chemistry and Technology of Organic Nitrogen Compounds. E-mail: navinita@mail.ru