

УДК 651.1+615.32

Тишина Алёна Николаевна,
соискатель кафедры фармацевтической химии
Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России,
г. Пятигорск, Россия

**АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭКСТРАГЕНТА И
УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ ГРАЙАНОТОКСИНОВ
РОДОДЕНДРОНА ЖЕЛТОГО (*RHODODENDRON LUTEUM SWEET*)**

Аннотация. Маркерными хемотаксономическими соединениями рододендронов являются дитерпеноиды грайанового типа – грайанотоксины. При этом листопадные виды рододендронов, в частности рододендрон желтый (*Rhododendron luteum Sweet*), накапливают больше грайанотоксинов, чем вечнозеленые. Именно эти БАС связывают с антигипертензивными, цитотоксическими, противодиабетическими и антиноцептивными свойствами рододендронов, поэтому актуально подобрать оптимальный экстрагент для максимального извлечения грайанотоксинов из растительного сырья. В работе представлены результаты выбора экстрагента и условий экстракции для экстракции грайанотоксинов из листьев рододендрона желтого. Установлено, что оптимальным экстрагентом для выбранных условий является спирт этиловый 95%.

Abstract: Marker chemotaxonomic compounds of rhododendrons are grayan-type diterpenoids – grayanotoxins. At the same time, deciduous rhododendron species, in particular *Rhododendron luteum Sweet*, accumulate more grayanotoxins than evergreen ones. It is these BACs that are associated with the antihypertensive, cytotoxic, antidiabetic and antinoceptive properties of rhododendrons, so it is important to choose the optimal extractant for the maximum extraction of



grayanotoxins from plant materials. The paper presents the results of the selection of the extractant and extraction conditions for the extraction of grayanotoxins from the leaves of *Rhododendron luteum* Sweet. It has been established that the optimal extractant for the selected conditions is ethyl alcohol 95%.

Ключевые слова: рододендрон желтый, грайанотоксины, экстракция, спектрофотометрия, хроматография.

Keywords: *Rhododendron luteum*, grayanotoxins, extraction, spectrophotometry, chromatography.

Из трех видов рододендронов (семейство Вересковые (*Ericaceae*), род рододендрон (*Rhododendron*)), произрастающих на Кавказе, лишь два встречаются на территории Российской Федерации – рододендрон кавказский (*Rhododendron caucasicum* Pall.) и рододендрон желтый (*Rhododendron luteum* Sweet) [1, 2].

Сырье рододендронов издавна применяют в народной медицине в качестве противовоспалительного, антигипертензивного, антидиабетического средства [3]. Как известно, фармакологические свойства растений связаны с их биологически активными соединениями (БАС), так в рододендроне желтом содержатся арбутин, дубильные вещества, флаваноиды [4], гидроксикоричные и фенолкарбоновые кислоты [5]. Однако маркерными хемотаксономическими соединениями рододендронов и, в частности рододендрона желтого, являются дитерпеноиды грайанового типа – грайанотоксины, включающие двадцать две изоформы [6, 7]. Именно эти БАС связывают с антигипертензивным [7], цитотоксическим [6], противодиабетическим [3] и антиноцептивным свойствами рододендронов [8].

Согласно данным литературы листопадные виды рододендронов накапливают грайанотоксинов больше, чем вечнозеленые. Рододендроны, произрастающие на российском Кавказе, относятся к листопадным –



рододендрон желтый (*Rhododendron luteum* Sweet), и вечнозеленым видам – рододендрон кавказский (*Rhododendron caucasicum* Pall.) [2]. Согласно источнику [7] содержание грейанотоксинов в рододендроне желтом (*Rhododendron luteum* Sweet) составляет около 0,015%.

Поскольку именно индивидуальные грейанотоксины проявляют антиноцептивные, цитотоксические, антигипертензивные и противодиабетические свойства, актуально подобрать оптимальный экстрагент для извлечения грейанотоксинов из растительного сырья.

Цель исследования – выбрать экстрагент и условия экстракции для извлечения грейанотоксинов из листьев рододендрона желтого.

Экспериментальная часть. Исследуемое сырье – листья рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet) собраны в июне-июле 2022 года, у подножия Джинальского хребта, в городе Кисловодск Ставропольского края.

Методика получения водного извлечения. Около 5,0 г (точная навеска) листьев рододендрона желтого, измельченных и проходящих через сито диаметром 1 мм, помещали в круглодонную колбу со шлифом объемом 250 мл. К навеске листьев прибавляли 100 мл воды очищенной, присоединяли колбу к обратному холодильнику и экстрагировали сырье в течение 1 часа при температуре 100°C. По истечении времени экстракции колбу отсоединяли от обратного холодильника, фильтровали извлечение в склянку из темного стекла через бумажный фильтр (*экстракт 1*).

Условия получения *извлечения с использованием спирта этилового 70%* аналогичны методике получения водного извлечения, отличия: экстрагент – спирт этиловый 70%, температура экстракции – 80°C (*экстракт 2*).

Методика получения извлечения спиртом этиловым 95% при комнатной температуре. Около 2,5 г (точная навеска) листьев рододендрона желтого, измельченных и проходящих через сито диаметром 1 мм, помещали в колбу со шлифом объемом 250 мл. Навеску сырья заливали 25 мл спирта



этилового 95%, колбу закрывали и проводили экстракцию при комнатной температуре в течение двух суток при постоянном перемешивании (*экстракт 3*).

Методика получения извлечения спиртом этиловом 95% при нагревании. Около 5,0 г (точная навеска) измельченных и просеянных через сито с диаметром отверстий 1 мм листьев рододендрона желтого помещали в круглодонную колбу со шлифом объемом 250 мл, прибавляли к сырью 50 мл спирта этилового 95% и экстрагировали сырье в течение 2 часов с обратным холодильником при температуре – 80°C. По истечении 2 часов, колбу отсоединяли от обратного холодильника, остужали извлечение до комнатной температуры и фильтровали в склянку из темного стекла через бумажный фильтр. Затем к навеске листьев вновь добавляли 50 мл спирта этилового 95% и полностью повторяли процедуру экстракции. После экстракции первую и вторую порции экстракта объединяли (*экстракт 4*).

Методика анализа экстрактов методом спектрофотометрии в видимой и УФ областях. 0,5 мл извлечения переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводили объем экстрагентом до метки. 0,3 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 5 мл и доводили объем раствора до метки тем же экстрагентом. Регистрировали спектры поглощения в кюветах с толщиной 1 см в интервале длин волн от 190 до 450 см⁻¹. в качестве раствора сравнения использовали соответствующий экстрагент.

Методика анализа методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). На линию старта предварительно активированных в сушильном шкафу хроматографических пластинок марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» размером 100x150 мм наносили испытуемые экстракты в количестве 10 мкл. Пластинки помещали в предварительно насыщенные парами подвижной фазы (ПФ) хроматографические камеры. Хроматографировали при комнатной температуре, восходящим способом, в течении 1-3 часов в зависимости от



состава ПФ. Когда ПФ оставалось примерно 90% до конца пластинки, их вынимали, сушили на воздухе до улетучивания паров ПФ и просматривали в УФ-свете при длинах волн 365 нм и 254 нм, отмечали зоны адсорбции, рассчитывали значения факторов удерживания (R_f), сравнивали их с опубликованными значениями [9,10].

Анализ методом ВЭЖХ проводили в изократическом режиме с УФ детектором при длине волны 210 нм; колонка – 25×0,46 см, 5 мкм, Luna C18 Phenomenex; подвижная фаза: ацетонитрил – 0,05 М фосфорная кислота (2:8); скорость потока – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл.

Результаты и обсуждение. В ходе анализа литературы установлено, что наиболее часто для извлечения дитерпеноидов грайанового типа из растительного сырья используют ацетон [11], этилацетат [11,12], метанол [13], петролейный эфир [8,12], хлороформ [8], *n*-бутанол [11,12] и дихлорметан [13].

Однако перечисленные экстрагенты взрывоопасны. Кроме того, все они являются токсичными. Так, вдыхание паров ацетона может привести к воспалению слизистых оболочек и отеку легких. Пары этилацетата, *n*-бутанол и дихлорметан раздражают слизистую глаз и органы дыхания. Этилацетат, петролейный эфир и *n*-гексан обладают нейротоксичностью. Хлороформ и дихлорметан являются канцерогенами, помимо этого обладают гепатотоксичностью [14].

Таким образом, принимая во внимание токсичность экстрагентов, мы исключили перечисленные выше растворители из эксперимента и остановили свой выбор на воде очищенной, спирте этиловом 70% и спирте этиловом 95%.

Вода является универсальным растворителем, она экологична, широкодоступна, кроме того имеются литературные данные о фармакологических исследованиях водных извлечений из сырья рододендронов [15]. Растворы спирта этилового 70% и 95% так же используются для



экстракции грайанотоксинов [8, 12], помимо этого, спирт этиловый менее токсичен, чем перечисленные выше органические растворители.

Поскольку грайанотоксины имеют максимумы поглощения при длине волны около 200 нм [13], все экстракты подвергали анализу методом спектрофотометрии. Электронные УФ-спектры извлечений и значения оптических плотностей в максимуме поглощения представлены на рисунке 1. и в таблице 1.

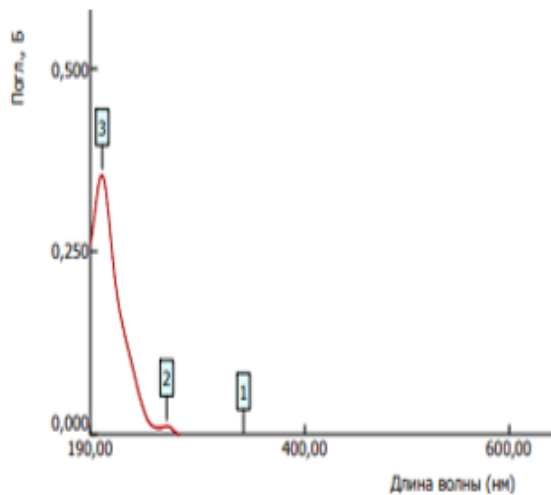
Таблица 1

**Значения оптических плотностей
экстрактов рододендрона желтого при длине волны 203 нм**

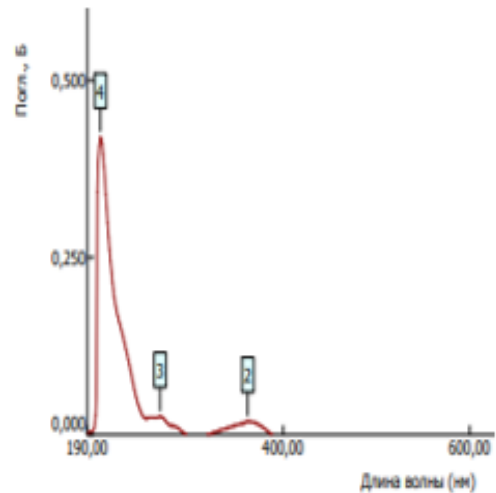
Экстрагент и условия экстракции	Оптическая плотность
Вода (температура – 100°C, одна стадия, 1 час)	0,354
Спирт этиловый 70% (температура – 80°C, одна стадия, 1 час)	0,420
Спирт этиловый 95% (температура – 20°C, одна стадия, 2 суток)	0,640
Спирт этиловый 95% (температура – 80°C, две стадии, 2 час на каждой стадии)	0,650

Как видно из данных таблицы 1 и рисунка 1 при длине волны 203 нм – максимуме поглощения, характерного для дитерпеноидов грайанового типа, наибольше оптическую плотность (0,650) имеет извлечение, полученное с использованием на спирта этилового 95% при нагревании (рис. 1, Г).

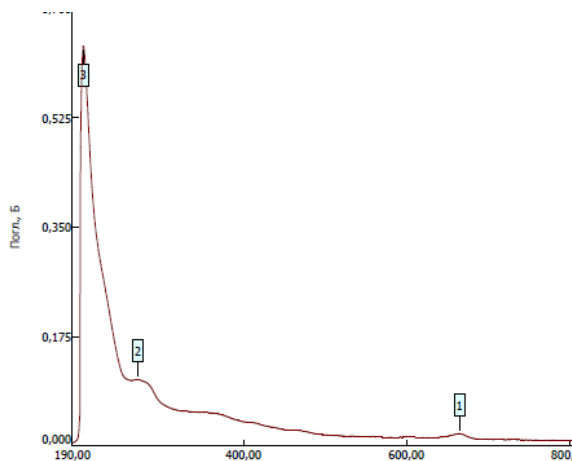




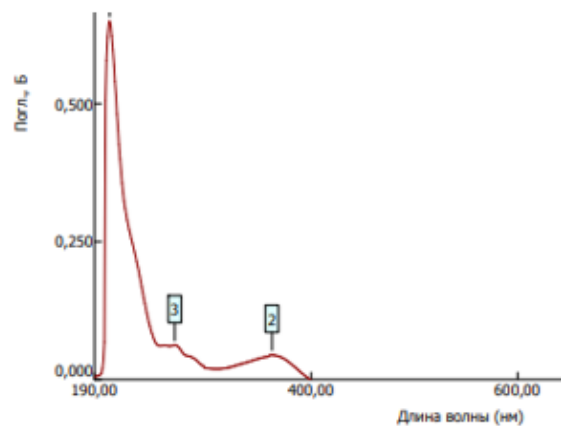
А)



Б)



В)



Г)

Рисунок 1. УФ-спектры полученных экстрактов

(А – экстрагент – вода очищенная, Б – спирт этиловый 70%,

В – спирт этиловый 95% без нагревания;

Г – спирт этиловый 95% при нагревании)

Вода очищенная экстрагирует меньше количество БАС, имеющих максимум поглощения при 203 нм, оптическая плотность при данной длине волны составила – 0,354 (рис. 1, А). Оптическая плотность 70% этанольного экстракта при 203 нм – 0,420 (рис. 1, Б). Больше количество веществ с максимумом поглощения при 203 нм было экстрагировано при комнатной температуре 95% этиловым спиртом (рис. 1, В). Установлено, что при

нагревании спирт этиловый 70% более эффективен для извлечения грайанотоксинов из растительного сырья, чем вода очищенная, но оба эти экстрагента менее эффективны, чем спирт этиловый 95% при комнатной температуре.

Для экстракции грайанотоксинов спиртом этиловом 95% необходимо нагревание, поскольку экстракция при комнатной температуре ведет к недостаточному извлечению грайанотоксинов из сырья (рис. 1, В, Г). Помимо выбора экстрагента и температурного режима следовало установить кратность экстракции и время экстракции на каждой ступени. Экспериментально определено, что одной ступени экстракции в течении 1 часа недостаточно для извлечения грайанотоксинов из листьев рододендрона желтого, и определено оптимальное число ступеней экстракции, равное двум с временем экстракции на каждой ступени – 2 часа.

Кроме метода спектрофотометрии полученные экстракты были проанализированы более специфичными методами анализа – хроматографическими.

ТСХ является одним из методов идентификации дитерпеноидов грайанового типа, в том числе и грайанотоксинов. Проанализировав источники литературы, мы выбрали ПФ, способные отделить грайанотоксин от прочих компонентов экстрактов и остановили свой выбор на трех ПФ – этилацетат, этилацетат-ацетон в соотношении (1:2) [9] и н-буанол-уксусная кислота-вода (4:1:3) [10].

Согласно данным литературы факторы удерживания (R_f) дитерпеноидов грайанового типа в этилацетате находятся в пределах от 0,4 до 0,5 [9].

В ПФ «бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5)» фактор удерживания грайанотоксина I равен 0,25 [10]. В ПФ «этилацетат-ацетон (1:2)» значения факторов удерживания дитерпеноидов грайанового типа составляют от 0,6 до 0,7 [9].



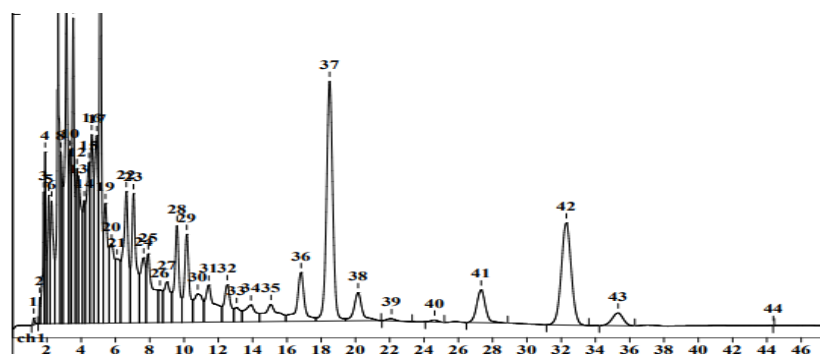
**Сравнение значений экспериментальных факторов удерживания
с данными литературы (детекция при длине волны 365 нм)**

Подвижная фаза	Экспериментальные значения факторов удерживания (Rf)			Значение Rf по литературным данным
	экстракт 2	экстракт 3	экстракт 4	
Этилацетат	0,47	0,44	0,41	0,4-0,5 [9]
Бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5)	-	-	-	0,25 [10]
Этилацетат-ацетон (1:2)	0,58	0,69	0,57	0,6-0,7 [9]
	0,67		0,65	
			0,72	

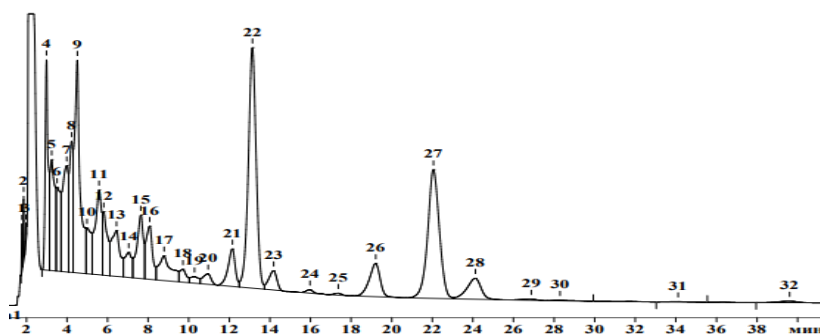
Как видно из таблицы 2, наибольшее количество пятен при длине волны 365 нм обнаружено в экстракте, полученном 95% спиртом этиловым при нагревании. В ПФ «этилацетат» все три экстракта содержат вещества, попадающие в диапазон 0,4-0,5. Для всех исследованных экстрактов в ПФ «н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5)» не были обнаружены зоны адсорбции со значением фактора удерживания около 0,25. ПФ «этилацетат-ацетон (1:2)» более эффективна для разделения компонентов спиртовых экстрактов. На хроматограмме 70% этанольного экстракта детектированы две зоны адсорбции, в интервале значений фактора удерживания 0,5-0,7. На хроматограмме 95% этанольного экстракта идентифицированы 3 зоны адсорбции, с близкой к литературным данным хроматографической подвижностью.

Метод ВЭЖХ также находит применение в анализе дитерпеноидов грайанового типа, а грайанотоксины имеют времена удерживания от 35 до 65 минут в зависимости от условий эксперимента [8,12]. Для определения наличия дитерпеноидов грайанового типа в экстрактах, полученные экстракты проанализировали методом ВЭЖХ (рис.2).

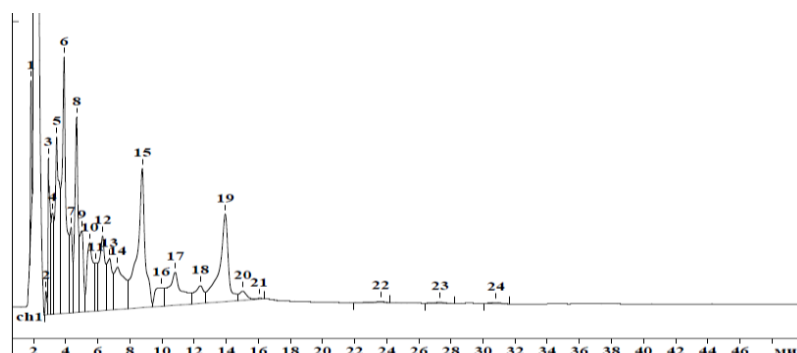




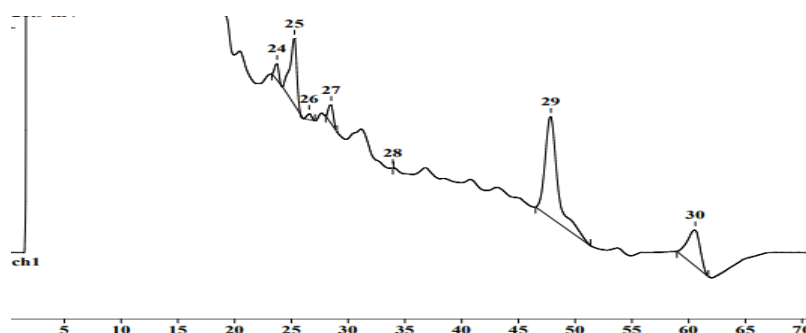
А)



Б)



В)



Г)

Рисунок 2. ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов
(А – экстрагент – вода очищенная, Б – спирт этиловый 70%,
В – спирт этиловый 95 без нагревания;
Г – спирт этиловый 95% при нагревании)



При анализе ВЭЖХ-хроматограмм экстрактов листьев рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet) определено, что водное извлечение имеет только один пик с временем удерживания от 36 до 65 минут, что говорит о низкой эффективности воды в качестве экстрагента в отношении грайанотоксинов (Рис. 2, А). Экстракт полученный с помощью спирта этилового 70% так же имеет один пик в интервале от 36 до 65 минут (Рис. 2, Б). На хроматограмме экстракта, полученного 95% спиртом этиловым при температуре 20°C, не наблюдается веществ с временами удерживания от 36 до 65 минуты (рисунок 2, В). В то же время в 95% этанольном извлечении, полученном при нагревании до 50°C, в промежутке между 36 и 65 минутой имеется два пика с временами удерживания 47 и 60 минут (Рис. 2, Г). Помимо этого, в водном извлечении до 36 минуты определено 43 компонента, в экстракте на спирте этиловом 70% 31 компонент, а в извлечении на 95% этиловом спирте при 50°C до 36 минуты детектировано 28 компонентов, при температуре 20°C – 24 вещества.

Таким образом, экспериментально установлено, что спирт этиловый 95% более селективен для извлечения дитерпеноидов грайановго типа из растительного сырья, чем вода очищенная и спирт этиловый 70%, которые извлекают значительное число «балластных веществ», что в последствии затруднит извлечение индивидуальных грайанотоксинов и их очистку. Так же следует отметить, что водное извлечение оказалось менее стабильным, спустя несколько дней после хранения извлечения в холодильнике на дне склянки образовался осадок. Водное извлечение так же является оптимальной питательной средой для размножения микроорганизмов, что делает воду не подходящим экстрагентом целевых соединений и требует дальнейшей оптимизации технологии экстракции, стабилизации и хранения водных экстрактов листьев рододендрона желтого.



Выводы:

1. На основании анализа УФ-спектров определено, что вода очищенная, растворы спирта этилового 70% и 95% могут быть использованы для извлечения дитерпеноидов грайнового типа из растительного сырья. В апробированных экспериментальных условиях наименее эффективным экстрагентом оказалась вода очищенная, наиболее эффективным – спирт этиловый 95% при нагревании и двухкратной экстракции.

2. Анализ экстрактов методами ТСХ и ВЭЖХ показал, что спирт этиловый 95% более эффективен и селективен для изолирования БАС грайанового типа.

3. Водный экстракт наименее нестабилен и является благоприятной питательной средой для размножения микроорганизмов, поэтому в дальнейшем мы отказались от использования воды очищенной в качестве экстрагента для извлечения грайанотоксинов.

4. Оптимальными условиями извлечения грайанотоксинов из листьев рододендрона желтого являются: экстрагент – спирт этиловый 95%, температурный режим – 80°C, двухстадийная экстракция с временем экстракции на каждой ступени – 2 часа. Аналитическое сопровождение экстракции предлагается проводить методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Список литературы:

1. Рододендроны: книга / Р. Я. Кондратович. Рига - 1981. - 303 С.
2. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том 2 / Отв. ред. А. Л. Буданцев, 2009. СПб., М. – С.41–50.
3. The genus *Rhododendron*: An ethnopharmacological and toxicological review / R. Popescu, B. Kopp // *Journal of Ethnopharmacology*. Vienna. № 147 (1). Pp. 42–62. DOI:10.1016/j.jep.2013.02.022.



4. Флавонолы *Rhododendron luteum* и *Rh. Dauricum* / Э.Т. Оганесян, В.А. Бандюкова, А.Л. Шинкаренко // *Химия природных соединений*. 1967. № 4. С. 279.
5. Жаворонкова М.Е. Сравнительное фармакогностическое изучение европейских и азиатских видов рода *Rhododendron* L. флоры России. Дис. ... кандидат. фармац.наук – Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, 2012.
6. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Rhododendron* / Yin Qiang, Baoshi Zhou, Kun Gao. // *Chemistry & biodiversity*. Zurich. 2011. Pp. 792-815.
7. Uber Inhaltsstoffe verschiedener *Rhododendron*-Arten und ihre Kreislaufwirkung / S. von Kiirten, S. auf dem Kellerd, P. Pachalyd, F. Zymalkowski, G. Tauberger, M. Moussawib // *Inhaltsstoffe verschiedener Rhododendron-Arten*. 1971. № 304(171). Pp.753-762. DOI: 10.1002/ardp.19713041007
8. Grayanane Diterpenoids from the Leaves of *Rhododendron auriculatum* and Their Analgesic Activities / N. Sun, G. Zheng, M. He, Y.Feng, J. Liu, M. Wang, H. Zhang, J. Zhou, G. Yao // *Journal of Natural Products*. Wuhan. 2019. Pp. 1849-1860. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00095
9. Enantioselective Total Syntheses of Grayanane Diterpenoids: (–)-Grayanotoxin III, (+)-Principinol E, and (–)-Rhodomollein XX / L.Kong, H. Yu, M. Deng, F.Wu, Z. Jiang, T.Luo // *Journal of the American Chemical Society*. Beijing. 2022. №144 (12). Pp. 5268-5273. DOI: 10.1021/jacs.2c01692.
10. Зайцева Н. В. Химический состав растений рода *Rhododendron*, произрастающих в южной Якутии // *Актуальные проблемы ботаники и охраны природы*. Нерюнгри. С. 58-66.
11. Pierisformotoxins A –D, Polyesterified Grayanane Diterpenoids from *Pieris formosa* and Their cAMP-Decreasing Activities / W.G. Wang, Z. Y. Wua, R. Chenb, H. Z. Lia, H. M. Lia, Y. D. Lia, R. T. Li, H. R. Luo. // *Chemistry & Biodiversity*. Kunming. 2013. № 10(6). Pp.1061–1071. DOI:10.1002/cbdv.201200046



12. Rhodomicranosides A–I, analgesic diterpene glucosides with diverse carbon skeletons from *Rhododendron micranthum* / N. Suna , Y. Qiub , Y. Zhuc , J. Liua, H. Zhanga, Q. Zhanga, M.Zhanga , G. Zhenga , C. Zhangb , G. Yao. // *Phytochemistry*. Wuhan. 2019. Pp. 1–12. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.017
13. Extracts from *Rhododendron ferrugineum* Do Not Exhibit Grayanotoxin I: An Analytical Survey on Grayanotoxin I within the Genus *Rhododendron* / M. Lechtenberg, F. Dierks, J. Sendker, A. Louis, H. Schepker, A. Hensel. // *Planta Medica*. Münster. 2014 № 80(15) Pp.1321–1328. DOI:10.1055/s-0034-1383039
14. Acute Hepatotoxic and Nephrotoxic Effects of Chloroform in Male F-344 Rats and Female B6C3F1 Mice / J. I. Larson, D. C. Wolf, B. E. Butterworth. // *Fundamental and applied toxicology*. North Carolina. 1993. № 20. Pp. 302-315. DOI: 10.1093/toxsci/20.3.302
15. Relationship between blood toxin level and clinical features in patients with grayanotoxin poisoning – six clinical cases / H. L.Choi, K. H. Park, J. S. Park, H. Y.Choi, H. Kim, S. M. Kim.// *Clinical Toxicology*. Cheongju. 2017. № 55(9). Pp. 991-995. DOI: 10.1080/15563650.2017.1331448

