

Phytother. – 1988. – Vol. 22, №2. –P. 124–156. 24. Poplawski, Holyb M., Samek Z. et. al. //Coll. Czech. Chtm. Coom. – 1971. – Vol. 36. – P. 2189. 25. J. Ethnopharmacology – 1986. – V. 16. –№ 2–3. – P. 289 – 294. 26. Флавоноїди – клініко-фармакологічний аспект / І.С. Чекман // Фітотерапія в Україні. – 2000. – №2. – С. 3–5. 27. Лікування захворювань серцево-судинної системи фітопрепаратом з антиоксидантними властивостями / Г.О. Кругликова, А.П. Лебеда та ін. // Фітотерапія в Україні. – 2001. – №4. – С. 18–20. 28. Перевозченко І.І. Шукайте лікаря в природі. – К.: Урожай, 2002. – 295 с. 29. Довженко В.Р. Растения служат человеку: Справочник. – Симферополь, 1991. – 305 с. 30. Атлас лекарственных растений СРСР. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 1965. – 865 с. 31. Мазнев Н. Большая энциклопедия народной медицины. – М., 2005. – 655 с.

УДК 541.123.4:579.873.088.5

Е.В. Карпенко¹, Т.Я. Покинсьброда¹, Р.Г. Макітра¹,
Е.Я. Пальчикова², Н.В. Роговик³, В.Й. Роговик³

¹Відділення фізико-хімії горючих копалин Інституту фізико-органічної хімії й вуглехімії
ім. Л.М. Литвиненка НАН України,

²Інститут геології й геохімії горючих копалин НАН України,

³Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНИХ ЕКСТРАГЕНТІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СПОЛУК НА ОСНОВІ ПРИНЦИПУ ЛІНІЙНОСТІ ВІЛЬНИХ ЕНЕРГІЙ

© Карпенко Е.В., Покинсьброда Т.Я., Макітра Р.Г., Пальчикова Е.Я.,
Роговик Н.В., Роговик В.Й., 2008

Екстракція має важливе значення при виділенні біологічно активних сполук (БАС) із рослинного чи мікробного матеріалу, їх розділенні та очищенні, наприклад, для одержання алкалоїдів групи морфіну [1], а також більшості антибіотиків [2]. Розподілення органічних речовин між двома фазами є також однією з важливих характеристик, що визначають їхню біохімічну активність. Логарифм констант розподілу K_r між n -октанолом і водою, т. зв. індекс гідрофобності Ганша [3], стосується оцінки ефективності медикаментів. У роботах Абрахама клітину організму розглядають як активну протоплазму, оточену напівпроникною мембраною. Вплив розчинених у водному середовищі органічних речовин на ступінь інгібування біоломінесценції *Protobacterium phosphoreum* [4] і на їх 50 % летальну концентрацію стосовно золотих рибок [5] зв'язували зі здатністю речовин до специфічної й неспецифічної сольватації. Самі константи розподілу речовин між двома фазами неоднозначно залежать від властивостей органічної фази. У [6] показано, що експериментальні значення K_r можна задовільно узагальнити за допомогою шестипараметрового лінійного рівняння:

$$\lg P = a_0 + a_1(n^2 - 1)/(n^2 + 2) + a_2(\varepsilon - 1)/(2\varepsilon + 1) + a_3B + a_4E_T + a_5\delta^2 + a_6V_M. \quad (1)$$

У цьому рівнянні n – показник заломлення й ε – діелектрична проникність органічного розчинника, що відповідають за неспецифічну сольватацію екстрагованих речовин; B та E_T – основність по Пальму й електрофільність по Райхардту [7] визначають специфічну сольватацію. Квадрат параметра Гільдебранда (δ^2) [8] і мольний об'єм V_M характеризують структурні особливості екстрагента.

У [9] вивчений розподіл між водою й органічними екстрагентами анестетика новокаїну (прокаїну) – диметилетанольного ефіру пара-амінобензойної кислоти (I), а також продукту його гідролізу – пара-амінобензойної кислоти (II). Оптимальними екстрагентами у випадку (I) є хлороформ і дихлорметан, а у випадку (II) – складні ефіри. Тому доцільно було б узагальнити дані по Кр (табл. 1) за допомогою рівняння (1). Для (I) ці величини (Кр) отримані за фіксованого рН 8,37, завдяки чому пригнічується можливий вплив дисоціації аміногрупи.

Дані щодо розподілу I узагальнено з доволі високим коефіцієнтом множинної кореляції R шестипараметровим рівнянням (2):

$$\lg K_p = -5,718 + (21,60 \pm 8,47) \cdot f(n^2) + (11,42 \pm 2,15) \cdot f(\epsilon) + (2,04 \pm 1,43) \cdot 10^{-3} B + (0,03 \pm 0,05) \cdot E_T - (7,41 \pm 2,23) \cdot 10^{-3} \delta^2 - (10,40 \pm 3,62) \cdot 10^{-3} V_M \quad (2)$$

з $R = 0,969$ і середньоквадратичною похибкою $S = \pm 0,158$. Значення коефіцієнтів парної кореляції між $\lg K_p$ і окремими параметрами, за винятком полярності, низькі: $r_{0-1} = 0,076$, $r_{0-2} = 0,863$, $r_{0-3} = 0,171$, $r_{0-4} = 0,600$, $r_{0-5} = 0,454$, $r_{0-6} = 0,351$. Рівняння адекватне до тесту Фішера для цієї кількості точок за ступеня надійності 0,95. Сольватаційні фактори сприяють переходу новокаїну в екстрагуючу фазу (знак плюс) у той час, коли її самоасоціація та збільшення мольного об'єму протидіють. Після вилучення малозначущих факторів отримаємо рівняння (3):

$$\lg K_p = -3,680 + (11,67 \pm 5,04) \cdot f(n^2) + (13,07 \pm 1,41) \cdot f(\epsilon) - (5,27 \pm 1,08) \cdot 10^{-3} \delta^2 - (4,74 \pm 1,78) \cdot 10^{-3} V_M, \quad (3)$$

з $R 0,960$, $s \pm 0,178$

Значення $\lg K_p$ для різних екстрагентів, обчислені за рівнянням (3), а також їх розбіжності з експериментом $\Delta \lg K_p$ наведені у таблиці. Величини відхилень $\Delta \lg K_p$ знаходяться у межах похибки $s = \pm 0,178$ або лише незначно їх перевищують. Новокаїн у кислому середовищі легко гідролізує з утворенням *n*-амінобензойної кислоти. У цьому випадку для усіх 12 розчинників також отримано задовільний ступінь кореляції. Але знаки для окремих членів рівняння (4) та їх значущості відрізняються від таких у рівнянні (2), яке описує розподіл новокаїну:

$$\lg K_p = 7,588 - (70,27 \pm 15,83) \cdot f(n^2) + (16,04 \pm 4,01) \cdot f(\epsilon) - (5,90 \pm 2,66) \cdot 10^{-3} B + (0,10 \pm 0,09) E_T - (4,99 \pm 4,23) \cdot 10^{-3} \delta^2 + (2,31 \pm 0,68) \cdot 10^{-3} V_M \quad (4)$$

з $R 0,975$, $s \pm 0,295$

$$\lg K_p = 8,826 - (72,35 \pm 11,76) \cdot f(n^2) + (18,66 \pm 2,09) \cdot f(\epsilon) - (6,00 \pm 2,40) \cdot 10^{-3} B + (27,08 \pm 5,91) \cdot 10^{-3} V_M, \quad (5)$$

з $R 0,972$, $s \pm 0,313$.

Рівняння (5) адекватно описує розподіл *n*-амінобензойної кислоти залежно від властивостей екстрагентів.

Отже, можна зробити висновок, що константи розподілу новокаїну та *n*-амінобензойної кислоти не залежить лінійно від будь-якої фізичної характеристики органічного екстрагента. Відповідно можна припустити, що величини $\lg K_p$ у системі октаном-вода (індекси Ганша) будуть характеризувати біологічну активність цих речовин лише приблизно.

Актуальною проблемою є підбір оптимальних умов синтезу, а також виділення біогенних ПАР. Особливістю біологічних систем, зокрема культуральної рідини – первинного продукту мікробного синтезу – є їх багатокомпонентність. Серед найактивніших продуцентів біоПАР заслуговують на увагу представники роду *Pseudomonas*, які є продуцентами високоефективних рамноліпідних ПАР. Поверхнево-активні властивості цих речовин і перспективи їх практичного використання описані в попередніх роботах [10, 11, 12]. Зручним методом первинного виділення концентрату біогенних поверхнево-активних речовин з культуральної рідини є кислотне осадження так званого біокомплексу, до складу якого входять рамноліпідні ПАР та екзополісахариди. Найдоцільнішим методом виділення рамноліпідів з комплексу є їх переведення в органічний розчинник (фазу).

Відповідно до принципу лінійності вільних енергій зміна рівноваги при переході речовини з однієї фази в іншу пропорційна до логарифму коефіцієнта розподілу, а не концентрації самої речовини.

Експериментальні (по [9]) і обчислені за рівняннями (3) і (5) значення констант розподілу $\lg K_p$ прокаїну, n -амінобензойної кислоти та рамноліпідів (рівняння 7) між водною та органічною фазами

Розчинник	Прокаїн(І)				n -Амінобензойна кислота (II)				Рамноліпід (III)			
	$\lg K_{p\text{експ}}$	$\lg K_p$ розрах	$\Delta \lg K_p$ розрах	$\lg K_{p\text{експ}}$	$\lg K_p$ розрах	$\Delta \lg K_p$ розрах	$\lg K_{p\text{експ}}$	$\lg K_p$ розрах	$\Delta \lg K_p$ розрах	$\lg K_{p\text{експ}}$	$\lg K_p$ розрах	$\Delta \lg K_p$ розрах
Хлороформ	1,4400	0,9306	-0,5094	-1,6117	-0,6017	-1,0100	0,1364	0,0729	-0,0635			
Дихлорметан	1,4200	1,1560	0,0960	-0,4328	0,4572	-0,8900	-	-	-			
Етилацетат	1,1200	1,1955	0,0755	0,8802	-0,3198	1,2000	0,1987	0,1383	-0,0604			
n -Пропілацетат	0,9100	1,1402	0,2302	0,6899	-0,2801	0,97000						
n -Бутилацетат	0,7300	0,9370	0,2070	0,4772	-0,6028	1,0800	0,3118	0,3196	0,0078			
n -Амілацетат	1,0700	0,8130	-0,2570	0,3990	-0,3210	0,7200	0,4518	0,4413	-0,0105			
Діетиловий ефір	1,1100	1,1295	0,0195	0,8301	0,3801	0,4500	0,174	0,2158	0,0218			
Дибутиловий ефір	0,1400	0,1199	-0,0201	-0,1739	0,3461	-0,5200	-	-	-			
n -Бутанол	1,1300	1,2979	0,1679	1,1569	0,2569	0,9000	0,2201	0,2595	0,0394			
n -Пентанол	1,300	1,1901	-0,1099	0,9589	1,1489	0,8100	-	-	-			
n -Октанол	1,0700	1,0432	-0,0268	0,9276	0,2676	0,6600	-	-	-			
Циклогексан	-0,8200	-0,6926	0,1271	-3,0714	0,2686	-3,3400	-	-	-			
Бензол	-	-	-	-	-	-	0,2504	0,2228	-0,0276			
Тетрахлорметан	-	-	-	-	-	-	0,00864	0,1387	0,0524			
Гексан	-	-	-	-	-	-	0,0607	0,0656	0,0049			
Циклогексанон	-	-	-	-	-	-	0,4564	0,4387	-0,0176			
Дихлоретан	-	-	-	-	-	-	0,0682	0,1216	0,0534			

Тому формально потрібно працювати з величинами коефіцієнтів розподілу в молях, але, оскільки біокомплекс є складною сумішшю, достатнім буде врахування маси рамноліпідів Р, що переходять із водної фази в 1 моль екстрагенту. Відповідні дані, отримані шляхом перерахунку з вагових кількостей екстрагованого рамноліпиду, наведені в таблиці. Узагальнення цих даних приводить до шестипараметрового рівняння 6:

$$\lg P = -1,349 + (4,054 \pm 0,98) \cdot f(n^2) + (0,514 \pm 0,32) \cdot f(\varepsilon) + (0,923 \pm 0,205) \cdot 10^{-3} B - (6,341 \pm 9,534) \cdot 10^{-3} \cdot E_T + (0,152 \pm 0,508) \cdot 10^{-3} \cdot \delta^2 + (4,257 \pm 0,748) \cdot 10^{-3} V_M$$

$$R \ 0,959, \ s \pm 0,039.$$
(6)

Знаки при окремих членах рівняння вказують на те, що усі його члени, крім електрофільності, сприяють переходу рамноліпідів в органічну фазу. Знак „мінус” при члені з E_T зрозумілий, тому що екстрагують сполуку з кислотною COOH -групу. Спрощене рівняння (7) характеризується майже незмінним значенням R:

$$\lg P = -1,519 + (4,271 \pm 0,685) f(n^2) + (0,29 \pm 0,205) f(\varepsilon) + (0,969 \pm 0,197) \cdot 10^{-3} B + (4,236 \pm 0,724) \cdot 10^{-3} V_M$$

$$R \ 0,956 \text{ і } s \pm 0,041.$$
(7)

Отже, вперше показано можливість застосування багатопараметрових рівнянь для узагальнення даних щодо екстракції біогенних поверхнево-активних речовин – рамноліпідів з біокомплексу, отриманого шляхом мікробного синтезу. Результати проведених досліджень мають значення для цілеспрямованого вибору оптимальних екстрагентів під час отримання нових біотехнологічних продуктів.

Експериментальна частина. Об'єкт досліджень – поверхнево-активні речовини – продукти біосинтезу бактеріального штаму *Pseudomonas species* PS-17 колекції мікроорганізмів ВФХГК ІнФОВ НАН України. Суспензію біокомплексу, що містить рамноліпідів, полісахариди і білки, виділяли із супернатанту культуральної рідини за рН 3.0. З виділеного пастоподібного осаду біокомплексу отримували рамноліпідів шляхом екстракції органічними розчинниками.

Властивості розчинників відповідали довідковим. Виділення рамноліпідів проводили шляхом одноразової екстракції 1 г вологого комплексу (70 % сухої речовини) 20 мл екстрагенту під час струшування з подальшим випарюванням екстракту під вакуумом (3 мм рт. ст.).

1. Преображенский Н.А., Генкин Э.И. *Химия органических лекарственных веществ* / ГХИ. – М.-Л., 1953. – С. 164, 208.
2. Шемякин М.М., Хохлов А.С. *Химия антибиотических веществ* / ГХИ – М.-Л., 1953. – С. 654.
3. Hansch C., Quinlan I., Lawrens G., *The LFER between partition coefficients and the aqueous solubility of organic compounds* – J. Org. Chem. – 1969. – Vol.33, №1. – P. 342–351.
4. Kamlet M. J., Doherty R. M., Veith G. D., Taft r. W., Abraham M. K. // *Environ. Sci. Technol.* – 1986. – V.20, №7. – P. 690–695.
5. Kamlet M. J., Doherty R. M., Taft W., Abraham M. K., Veith G. D. // *Environ. Sci. Technol.* – 1987. – V.21, № 2. – P. 149–155.
6. Макумпа Р.Г. // *ЖФХ.* – 1983. – Т.57, №10. – С.2579–2581.
7. Koppel I.A. Palm V.A. Chapter 3, *In Advances in Linear Free Energy Relationships*, Eds. Chapman N.B., Shorter J., Plenum Press. – London-New York, 1973. – P. 203–280.
8. Barton F.M. // *Chemical Reviews.* – 1975. – V. 75, №6. – P. 731–753
9. Osada S., Nakahara H., Yumota C., Mochida K. // *Chem. Pharm. Bull.* – 1985. – V.33, №11. – P. 4916, 4922.
10. Vasileva-Tankova E., Galabova D., Karpenko E. Shulga A.N. *Letters in Applied Microbiology.* – 2001. – V/33. – P. 280–284.
11. Пат. 20031212346 (2003). Україна // Бюлл. 12. – № 71792А.
12. Karpenko E., Lisova N., Scheglova N., Vildanova R., Pokynbroda T., Hamkalo Z. *The perspectives of using ecologically safe surfactants for agriculture.* – *Chemistry for Agriculture, Czech-Pol Traide*, 2005. –P. 786–792.
13. *Recommendations for Reporting the Results of Correlation analysis in Chemistry* // *Quant. Struct. – Act. Relat.* – 1985. – V. 4, №1. – P. 29.