

ВЛИЯНИЕ ОБЕЗЖИРИВАНИЯ НА ЭКСТРАКЦИЮ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ РУДБЕКИИ ШЕРШАВОЙ ЦВЕТКОВ

Р.И. Лукашов, канд. фарм. наук, доцент, зав. кафедрой фармацевтической химии, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь
r_lukashov@mail.ru

Н.С. Гурина, доктор биол. наук, профессор, декан фармацевтического факультета, Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Предварительное обезжиривание рудбекии шершавой цветков при помощи малополярных растворителей повышает экстракцию фенольных соединений. Подобраны следующие параметры обезжиривания, обеспечивающие наибольший выход фенольных соединений: обезжиривающий агент – петролейный эфир; продолжительность – 2 ч; соотношение сырья и агента – 1 к 5; кратность – однократное. Обезжиренное сырье содержит остаточные растворители в количестве меньшем, чем фармакопейные нормы. Обезжиривание значимо не влияет на качественный состав основных фенольных соединений. После отгонки петролейного эфира из липофильных извлечений, образовавшихся после обезжиривания, и растворения твердого маслянистого остатка в подсолнечном масле получены масляные экстракты, в которых содержание каротиноидов значимо не отличалось от исходного.

Ключевые слова: рудбекии шершавой цветки, фенольные соединения, обезжиривание, повышение экстракции, каротиноиды, липофильные извлечения, масляные экстракты

Повышение эффективности экстракции биологически активных веществ (БАВ) – одна из важных научно-практических задач совре-

менного фармацевтического производства фитопрепаратов [1]. Получение экстракционных лекарственных форм (настойки, экстракты и др.) должно быть обеспечено применением способов, позволяющих увеличить выход БАВ в готовый продукт и повысить истощаемость сырья, что лежит в основе рационального природопользования [2,3]. Одним из вариантов повышения эффективности экстракции БАВ может являться предварительная обработка сырья с использованием химических факторов, например, обезжиривание сырья [4].

Обезжиривание предполагает использование малополярного агента для обработки сырья с последующим его удалением. В результате обезжиривания получают липофильное извлечение (побочный продукт), содержащее липофильные БАВ (например, каротиноиды, хлорофиллы) [5]. Использование такого подхода позволяет рационально использовать одно и то же сырье для получения нескольких групп БАВ (например, основной группы – фенольные соединения (ФС) и каротиноиды – БАВ, содержащиеся в побочном продукте) и, соответственно, увеличить степень его истощения, что достигается путем повышения степени экстракции основной группы БАВ.

Рудбекии шершавой цветки являются новым лекарственным растительным сырьем (ЛРС), включенным в Государственную

фармакопею Республики Беларусь (ГФ РБ), для которого стандартизацию проводят по ФС [6]. Однако цветки богаты каротиноидами [7], которые обладают ценными фармакологическими свойствами, поэтому **целью** работы является оценка возможности использования обезжиривания рудбекии шершавой цветков для повышения эффективности экстракции ФС и обоснование возможности использования полученного в ходе обезжиривания липофильного извлечения как источника каротиноидов.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние обезжиривания рудбекии шершавой цветков на экстракцию ФС.
2. Экспериментально подобрать параметры обезжиривания, обеспечивающие максимальный выход ФС.
3. Сравнить качественный состав основных ФС обезжиренного и нативного (необработанного) сырья.
4. Определить содержание каротиноидов в липофильном извлечении, твердом маслянистом остатке и масляных экстрактах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись рудбекии шершавой цветки, заготовленные от культивируемых форм в ботаническом саду БГМУ в д. Новое Поле в фазу массового цветения в июле – августе в 2020, 2021 и 2022 годах и высушенные воздушно-теневым способом. При расчете критерия Кохрейна ($g=4$; $v=2$) получили: $G_{\text{табл}}=0,8709$ и $G_{\text{эксп}}=0,5901$, т. е. результаты, полученные для сырья, собранного в разные годы, можно объединить для формирования объединенного среднего.

Изучали влияние следующих параметров обезжиривания на экстракцию ФС: природа обезжирающего агента (вязкость, относительная плотность, температура кипения, диэлектрическая постоянная), соотношение

«сырье: обезжирающий агент» (г:мл) (1:5, 1:10, 1:25, 1:50 и 1:100), продолжительность (1–4 ч) и кратность обезжиривания (одно-, двух- и трехкратное). Подбор факторов осуществляли последовательно, на каждой последующей стадии учитывали параметр, подобранный на предыдущей стадии. Механическое перемешивание при обезжиривании осуществляли при помощи орбитального шейкера KS 130 basic Package (IKA, Германия) при 240 об/мин.

В качестве обезжирающих агентов использовали органические растворители (все – х.ч., ОДО «ХимХром», Республика Беларусь): гексан, гептан, петролейный эфир 40–70, диэтиловый эфир, бензол, о-ксилол, толуол, дихлорэтан, дихлорметан и хлороформ.

После проведения обезжиривания липофильное извлечение отфильтровывали, сырье с фильтра отжимали и оставляли до пяти дней при комнатной температуре под вытяжкой для естественного улетучивания обезжирающего агента.

Количественное спектрофотометрическое определение суммы ФС в пересчете на патулитрин проводили по методике частной фармакопейной статьи «Рудбекии шершавой цветки» 07/2016: РБ0099 из ГФ РБ на спектрофотометре Solar PB 2201 (ЗАО «Солар», Республика Беларусь).

Расчет содержания суммы ФС в пересчете на патулитрин в необработанном и обезжиренном сырье производили по формуле:

$$X = \frac{C \cdot 500}{m},$$

где X – содержание (массовая доля) суммы ФС в пересчете на патулитрин, %; C – содержание ФС в пересчете на патулитрин по градуировочному графику, мг/мл; m – масса навески испытуемого сырья, г [6].

Расчет содержания ФС проводили на массу навески необработанного сырья (до обезжи-

ривания), т. е. потерю липофильных веществ при обезжикивании при расчете содержания в обезжиренных рудбекии шершавой цветках не учитывали. Таким способом получали сопоставимые значения содержания ФС для необработанного и обезжиренного ЛРС, что позволяет говорить о повышении экстракции или выхода БАВ из обезжиренного сырья в сравнении с нативным. Учитывая, что во всех экспериментах использованы навески одинаковой массы, одни и те же параметры экстракции (коэффициент пересчета для всех проб один и тот же), расчет концентрации ФС в полученных экстрактах отдельно не представлен (но был произведен при расчете содержания ФС в пересчете на массу навески), т. к. содержание (массовая доля) фактически отражает значения концентрации, однако использует для этого иные единицы измерения, а именно %, а не мг/мл.

Качественный состав основных ФС устанавливали методом ВЭЖХ. После выполнения экстракции извлечение фильтровали через бумажный фильтр. Полученный фильтрат центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 мин. на центрифуге Sigma 3-16L (Sigma-Aldrich). Надосадочную жидкость использовали для инъектирования в хроматограф.

Анализ проводили на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 с насосом LPG-3400SD на четыре растворителя и устройством для вакуумной дегазации элюента, автосамплером WPS-3000 TLS с термостатом, термостатом для колонок TSS-3000SD с краном переключения, диодно-матричным детектором DAD3000 и флуоресцентным детектором FLD3000. Обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью компьютерной программы Chromeleon 7. Идентификацию ФС проводили путем сопоставления времен удерживания и спектров поглощения веществ в извлечении со стандартными образцами кверцетина 3-О-диглюкозида, патулетина 3-О-галактозида, патулитрина, мирицетина, кверцетагетина, патулетина и хлорогеновой

кислоты (все – Sigma-Aldrich). Относительное содержание ФС рассчитывали методом внутренней нормализации.

В липофильных извлечениях определяли содержание суммы каротиноидов. Для оценки возможности использования этих извлечений как источников указанной группы БАВ провели удаление петролейного эфира путем отгонки при температуре 70°C в роторном испарителе RV 3 eco с баней HB eco (IKA) и повторное определение каротиноидов, также установили их содержание в твердом маслянистом остатке – плотной массе желто-оранжевого цвета с каплями жирного масла.

Для оценки возможности получения из данного остатка масляных экстрактов вводили масло подсолнечное в объеме, эквивалентном первоначальному объему извлечения, и контролировали полноту растворения визуально и путем определения содержания каротиноидов. Процесс растворения проводили при комнатной температуре в течение 1 ч при механическом перемешивании на орбитальном шейкере KS 130 basic Package (IKA) при 240 об/мин.

Содержание суммы каротиноидов определяли методом прямой спектрофотометрии при длине волны 442 нм [8] на спектрофотометре Solar серии PB2201 (ЗАО «Солар», Республика Беларусь).

Оценку содержания остаточных количеств органических растворителей в обезжиренном сырье выполняли методом газовой хроматографии. Во флакон емкостью 20 мл помещали 1,0 мл тестовой смеси, которая включала 25 стандартных легколетучих веществ, и 8,0 мл воды, закрывали пробкой, закатывали металлическим колпачком и помещали в парофазную приставку на 15 мин. Условия пробоподготовки в приставке: температура нагрева пробы – 90°C; стабилизация бани – 1 мин.; время нагрева образца – 15 мин.; миксер – 1 мин. (мощность встряхивания – 1); вторая стабилизация образца – 1 мин.; установка

давления – 0,4 мин.; давление – 15 psi; стабилизация давления – 0,4 мин.; наполнение петли – 0,3 мин.; стабилизация петли – 0,3 мин.; время инжекции – 0,4 мин.; температура петли – 100°C; температура линии – 105°C. Парогазовая фаза автоматически вводилась в газовый хроматограф.

В аналогичных условиях выдерживали исследуемые пробы (1,0 г обезжиренного или нативного сырья и 8,0 мл воды), после чего пробы охлаждали до комнатной температуры и вводили в хроматограф.

Использовали газовый хроматограф с массспектрометрическим детектором Agilent Technologies 7890B (США), колонку кварцевую капиллярную 30 м × 0,25 мм, $\Delta F = 0,25$ мкм с неподвижной жидкой фазой 100% полидиметилсилоксаном (HP-1), детектор – масс-селективный MSD 5977B, тип «квадруполь» (температура 280°C), интервал сканируемых масс – 40–300 m/z. Условия хроматографического анализа: температура термостата колонки (начальная температура – 35–40°C – 6 мин.; программирование температуры – 10°C/мин до 100°C, выдержка 1 мин при 100°C, подъем температуры 15°C/мин до 180–200°C, выдержка 7 мин. при температуре 180–200°C); температура инжектора – 280°C, Transfer Line – 300°C; объем вводимой газовой пробы – 0,2–1,0 мл;

газ-носитель – гелий со скоростью 1,0–2,0 мл/мин; деление потока в инжекторе – 1:10–1:20.

Идентификацию остаточных органических растворителей проводили путем сопоставления времен удержания веществ исследуемых проб и веществ тестовой смеси. Расчет содержания растворителей проведен методом одного стандарта.

Статистическую обработку проводили при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016 (пакет «Анализ данных»). Каждое испытание выполняли три раза ($n=3$; $p=0,95$). Результаты представляли в виде $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{X}}$, где \bar{X} – среднее значение выборки; $\Delta_{\bar{X}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины. Сравнение двух групп значений проводили при помощи *t*-критерия Стьюдента. Влияние параметров на выход БАВ оценивали при помощи дисперсионного анализа. Значения статистически значимо различались при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1–4 представлены результаты изучения влияния природы обезжиривающего агента, продолжительности обезжиривания,

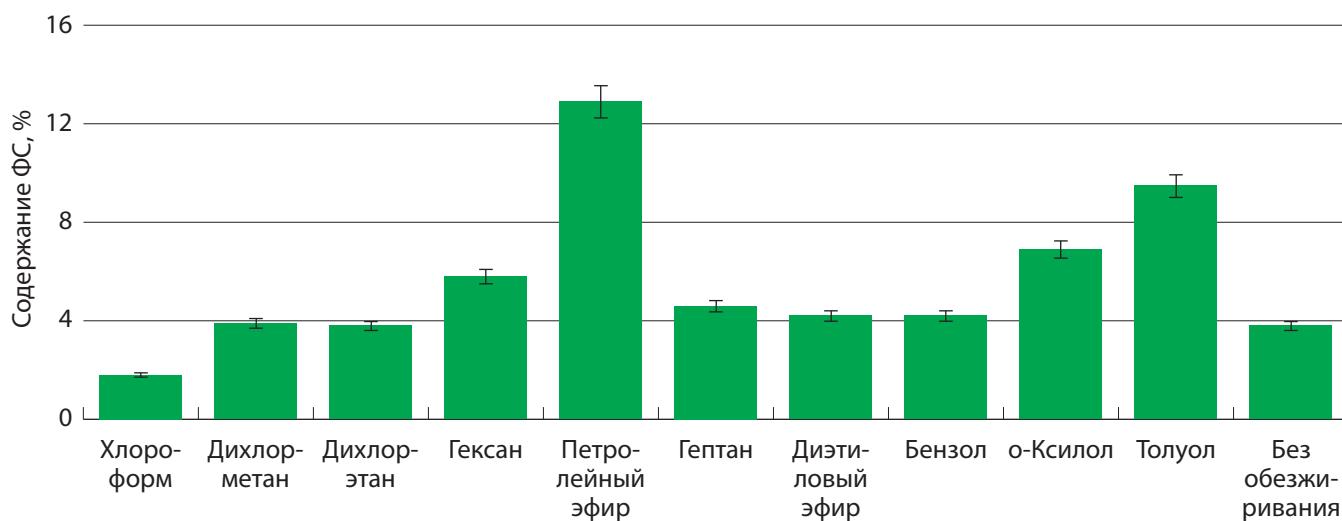


РИС. 1. Зависимость содержания ФС от природы обезжиривающего агента

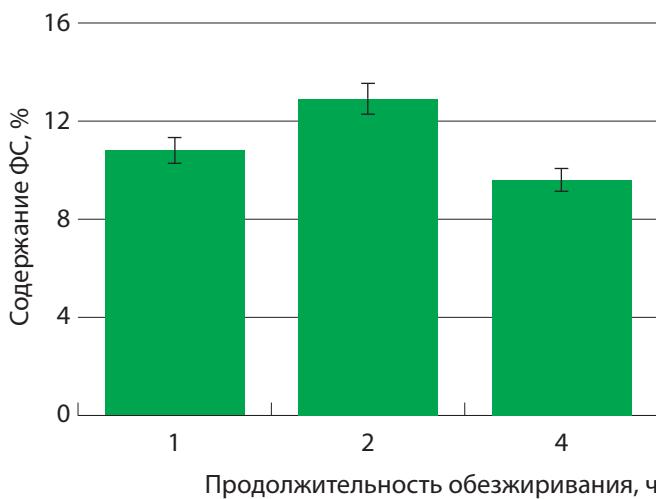


РИС. 2. Зависимость содержания ФС от продолжительности предварительного обезжиривания

соотношения сырья и обезжиривающего агента и кратности обезжиривания соответственно на экстракцию ФС из рудbekии шершавой цветков.

При предварительном обезжиривании рудbekии шершавой цветков гексаном, петролейным эфиром, гептаном, ксилолом и толуолом содержание ФС значимо увеличивалось в 1,53 ($p=0,039$); 3,40 ($p=0,0055$); 1,21 ($p=0,045$); 1,82 ($p=0,010$) и 2,50 ($p=0,0079$) раза соответственно по сравнению с ЛРС, которое не подвергалось обезжириванию (нативное сырье).

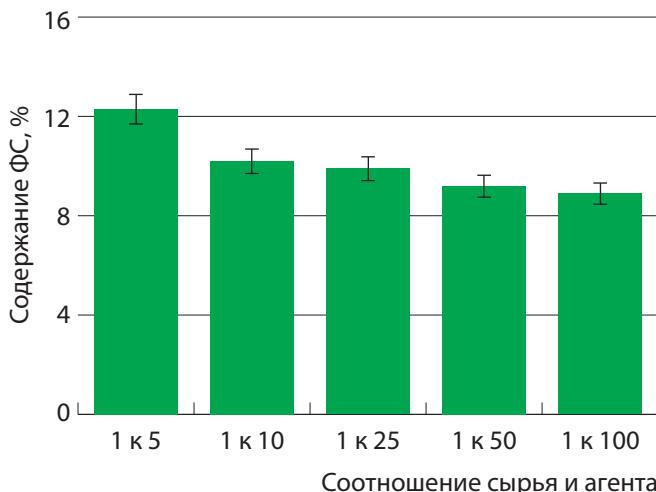


РИС. 2. Зависимость содержания ФС от продолжительности предварительного обезжиривания

Обезжиривание дихлорметаном, диэтиловым эфиром и бензолом не значимо повышало экстракцию ФС на 2,6% (отн.) ($p=0,29$), 10,5% (отн.) ($p=0,098$) и 10,1% (отн.) ($p=0,13$) соответственно. При этом результаты, полученные для петролейного эфира, значимо ($p=0,012$) больше по сравнению с толуолом на 35,8% (отн.) – рис. 1.

Содержание ФС в сырье, которое предварительно обезжирено петролейным эфиром в течение 2 ч, на 19,4% (отн.) ($p=0,045$) больше, чем при обезжиривании в течение 1 ч (рис. 2). Дальнейшее увеличение продолжительности обезжиривания (до 4 ч) приводило к снижению содержания на 33,4% (отн.) ($p=0,028$).

Содержание ФС при соотношении сырья и обезжиривающего агента к 1 к 5 на 20,6% (отн.) ($p=0,040$) больше по сравнению с соотношением 1 к 10 (рис. 3). Дальнейшее увеличение соотношения сырья и обезжиривающего агента за счет увеличения объема прибавляемого агента приводило к снижению выхода ФС ($r=-0,7615$).

Выявлено, что однократное обезжиривание увеличивало в 2,0 раза ($p=0,0062$) и на 39,5% (отн.) ($p=0,029$) экстракцию ФС по сравнению с дву- и трехкратным обезжириванием соответственно (рис. 4).

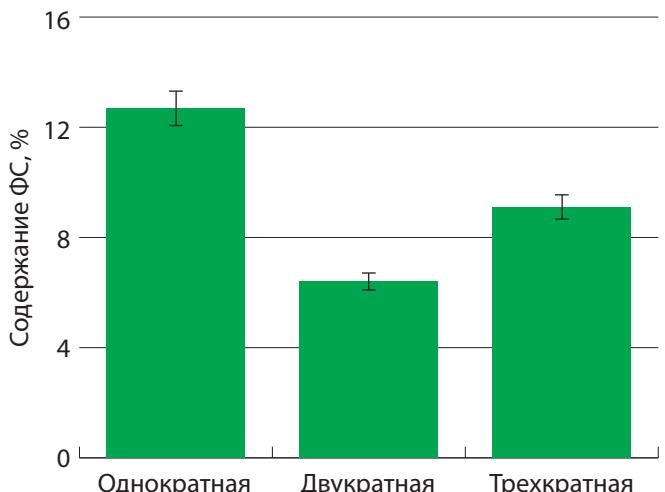


РИС. 4. Зависимость содержания ФС от кратности предварительного обезжиривания

При проведении дисперсионного анализа влияния параметров обезжикивания на экстракцию ФС установлено, что вязкость ($p=1,9 \cdot 10^{-3}$), относительная плотность ($p=2,9 \cdot 10^{-3}$), температура кипения ($p=4,2 \cdot 10^{-3}$) обезжикивающего агента, соотношение сырья и обезжикивающего агента ($p=2,9 \cdot 10^{-3}$), продолжительность ($p=3,1 \cdot 10^{-3}$) и кратность обезжикивания ($p=7,4 \cdot 10^{-3}$) статистически значимо ($p<0,05$) влияли на экстракцию ФС. Диэлектрическая постоянная ($p=0,083$) не влияла на процесс экстракции ФС статистически значимо.

На основе экспериментально подобранных параметров предложен следующий способ обезжикивания рудбекии шершавой цветков: отвешивают 100 г измельченного ЛРС с размером частиц 2000 мкм и менее, помещают в плотно закрывающуюся или укупоренную емкость, добавляют 500 мл петролейного эфира, плотно закрывают или укупоривают и помещают на механическую мешалку или перемешивают иным способом при комнатной температуре в течение 2 ч. Далее проводят фильтрацию и отжим сырья, обезжикиренное ЛРС после фильтрования и отжима оставляют до 5 сут. под вытяжкой для естественного удаления остатков обезжикивающего агента. Затем обезжикиренное ЛРС используют для экстракции ФС.

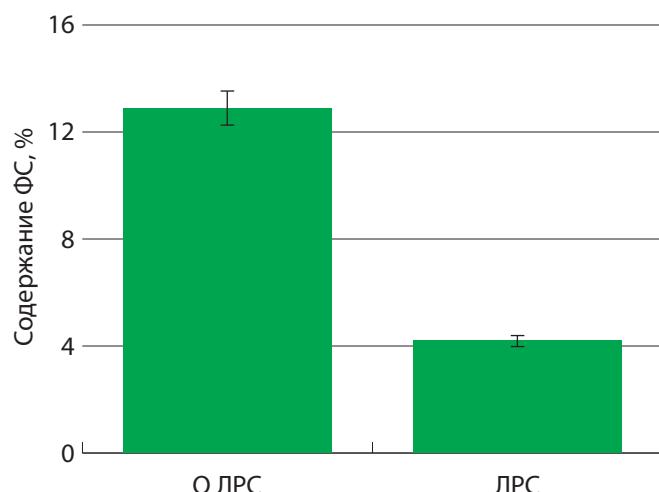


Рис. 5. Содержание ФС в обезжикированных рудбекии шершавой цветках (О ЛРС) и нативных цветках (ЛРС)

При использовании предложенного способа обезжикивания выход ФС возрастал в три раза ($p=2,6 \cdot 10^{-4}$) по сравнению с ЛРС, которое не прошло предварительную обработку (рис. 5).

Также оценили влияние обезжикивания на качественный состав извлекаемых ФС (табл. 1).

Относительное содержание ФС в обезжикированных и нативных цветках практически одинаково, что указывает на то, что обезжикивание не влияло на качественный состав извлекаемых ФС.

Таблица 1

КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ ФС ОБЕЗЖИРЕНИХ И НАТИВНЫХ РУДБЕКИИ ШЕРШАВОЙ ЦВЕТКОВ

Название ФС	Обезжикиренное ЛРС, %	ЛРС, %	Значение p
Кверцетина 3-О-диглюкозид	14,5±1,8	14,9 ±1,3	0,29
Патулетина 3-О-галактозид	14,1±1,0	13,9±1,0	0,24
Патулитрин	25,0±1,7	25,0±1,5	0,60
Мирицетин	19,2±1,3	19,0±1,2	0,59
Кверцетагетин	10,1±1,0	9,6±1,0	0,18
Патулетин	9,6±1,3	10,6±1,0	0,14
Хлорогеновая кислота	8,0±1,0	7,1±1,0	0,56

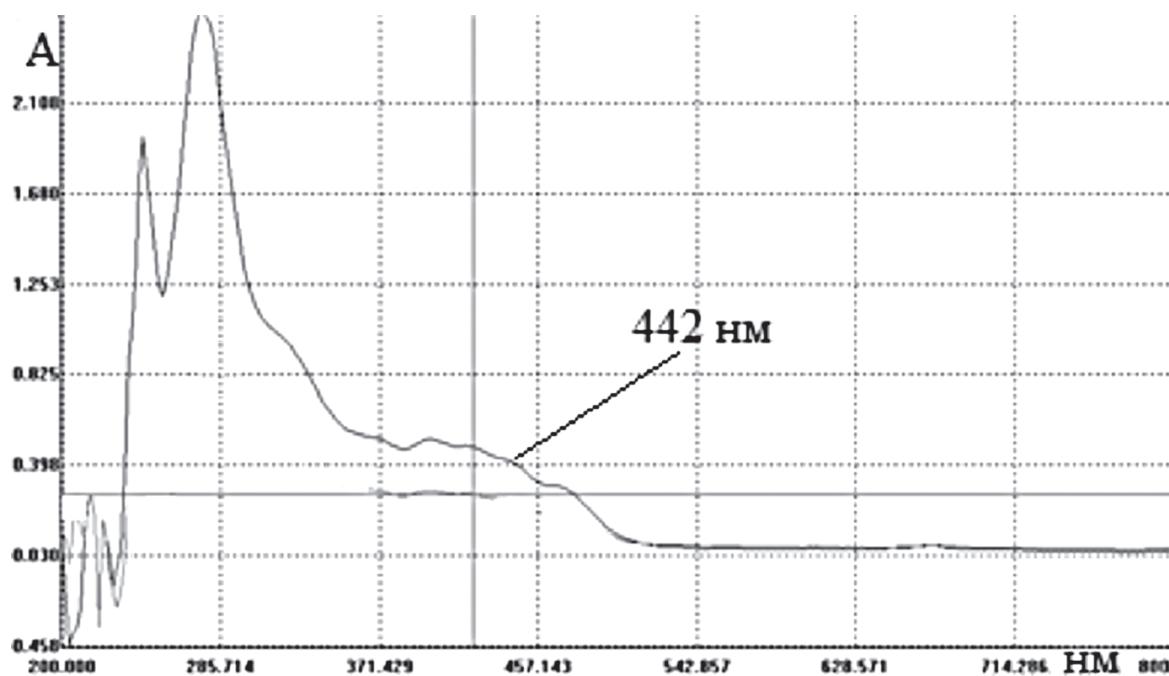


РИС. 6. Спектр поглощения липофильного извлечения из рудбекии шершавой цветков

В результате газохроматографического анализа в обезжиренных цветках идентифицированы пентан (класс 3: малоопасные растворители) и гексан (класс 2: растворители, использование которых нужно ограничивать), их содержание в сырье составило 0,013% (предел 0,5%) и 0,016% (предел 0,028%). Таким образом, рассчитанное содержание указанных

растворителей не превышало предельные значения из ГФ РБ [9].

Для липофильных извлечений на спектрах поглощения отмечен характерный для каротиноидов максимум поглощения при 422 нм (рис. 6).

На рис. 7 представлено содержание каротиноидов в липофильном извлечении

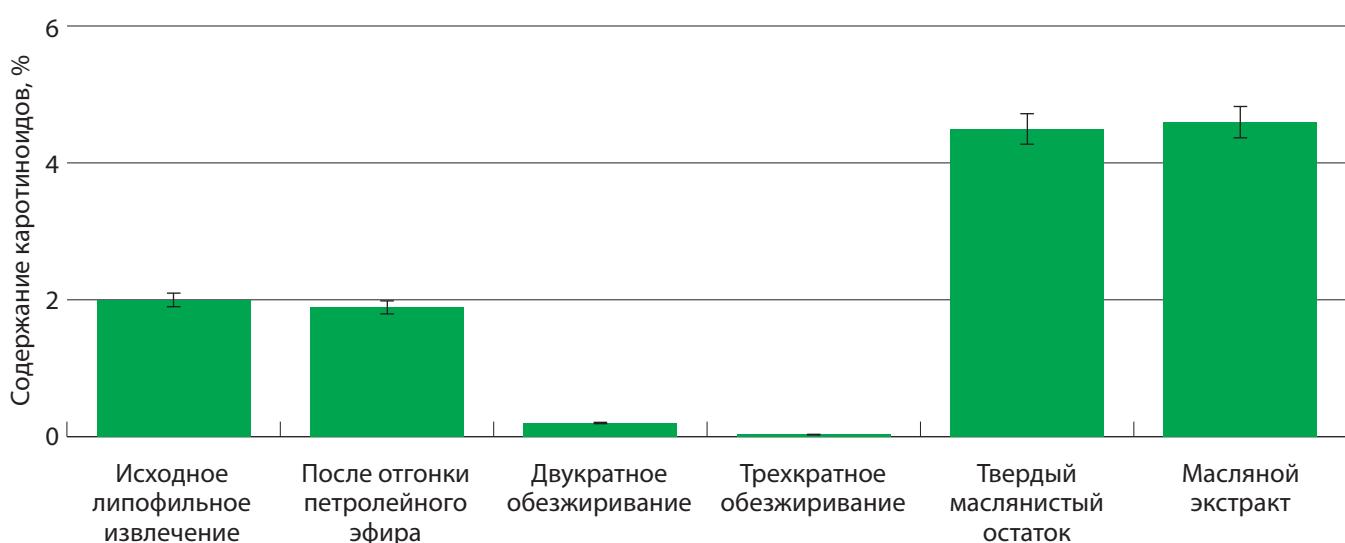


РИС. 7. Содержание каротиноидов в липофильном извлечении при одно-, дву- и трехкратном обезжиривании, до и после отгонки петролейного эфира, а также в твердых маслянистых остатках и масляных экстрактах

при различной кратности обезжикивания, до и после отгонки петролейного эфира, а также в твердом маслянистом остатке и масляном экстракте.

Отгонка петролейного эфира не влияла на содержание каротиноидов ($p=0,48$). Двух и трехкратное обезжикивание снижало содержание каротиноидов в десять и более раз. Содержание каротиноидов в твердом маслянистом остатке и масляном экстракте сопоставимо ($p=0,39$), что говорит о возможности получения из остатка масляного экстракта.

ВЫВОДЫ

Предварительное обезжикивание гексаном, петролейным эфиром, гептаном, ксилом и толуолом рудбекии шершавой цветков статистически значимо увеличивает экстракцию ФС. Наибольший выход ФС наблюдали при обезжикивании петролейным эфиром. Вязкость, относительная плотность, температура кипения обезжикирующего агента, соотношение сырья и обезжикирующего агента, продолжительность и кратность обезжикивания статистически значимо влияли на экстракцию ФС.

Подобраны следующие параметры проведения обезжикивания данного ЛРС: обезжикирующий агент – петролейный эфир; продолжительность – 2 ч; соотношение сырья и агента – 1 к 5; кратность – однократное. Обезжикинное сырье содержит пентан и гексан в количестве меньшем, чем фармакопейные нормы на данные остаточные растворители.

Относительное содержание основных ФС, относящихся к флавоноидам и гидроксикоричным кислотам, в обезжикинном и нативном сырье рудбекии статистически значимо не различается.

Липофильные извлечения могут быть использованы для получения масляных экстрак-

тов после отгонки петролейного эфира и растворения полученного твердого маслянистого остатка в подсолнечном масле, т. к. данные операции значимо не влияют на содержание каротиноидов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Белокуров С.С., Наркевич И.А., Флисюк Е.В., Каухова И.Е., Ароян М.В. Современные методы экстрагирования лекарственного растительного сырья (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2019. – Т. 53, №6. – С. 48–53.
2. Сайбель О.Л. Принцип комплексного использования растительного сырья как инструмент ресурсосберегающих технологий получения лечебных и профилактических средств // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – №12(24). – С. 3–10.
3. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Правдинцева О.Е., Браславский В.Б., Куркина А.В. Создание ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – №12. – С. 737–740.
4. Лукашов Р.И. Обезжикивание календулы цветков как способ повышения экстракции флавоноидов // Вестник фармации. – 2022. – №1(95). – С. 48–56.
5. Зилфикаров И.Н., Челомбитько В.А., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами / Под редакцией Челомбитько В.А. – Пятигорск, 2007. – 244 с.
6. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). В 2 т. Т. 2: Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья // Под общ.

- ред. Марченко С.И. – Молодечно: Победа, 2016. – 1368 с.
7. Дойко И.В. Влияние спектральных режимов облучения на биохимический состав экологически чистой биомассы *Echinacea purpurea* L. и *Rudbeckia hirta* L. в условиях светокультуры и ее использование в качестве функциональной добавки: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Красноярск, Красноярский гос. аграрный ун-т, 2003. – 16 с.
8. Тринеева О.В., Сливкин А.И., Сафонова Е.Ф. Определение гидроксикоричных кислот, каротиноидов и хлорофилла в листьях крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.) // Химия растительного сырья. – 2015. – №3. – С. 105–110.
9. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II). В 2-х т. Т. 1: Общие методы контроля качества лекарственных средств // Под общ. ред. Шерякова А.А. – Молодечно: Победа, 2012. – 1220 с.

EFFECT OF DEFATTING ON THE PHENOLIC COMPOUNDS EXTRACTION FROM RUDBECKIA HIRTA FLOWERS

R.I. Lukashov, N.S. Gurina

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

Pre-treatment defatting of Rudbeckia hirta flowers using low-polar solvents increases the extraction of phenolic compounds. The following defatting parameters were selected to ensure the highest yield of phenolic compounds: defatting agent – petroleum ether; duration – 2 hours; medicinal plant raw material and agent ratio – 1 to 5; multiplicity – single. The defatting medicinal plant raw material contains residual solvents in quantities lower than pharmacopoeial standards. Defatting does not significantly affect the qualitative composition of the main phenolic compounds. After distilling off petroleum ether from lipophilic extracts formed after defatting and dissolving the solid oily residue in sunflower oil, oil extracts were obtained in which the carotenoid content did not change significantly from the initial level.

Keywords: Rudbeckia hirta flowers, phenolic compounds, defatting, extraction enhancement, carotenoids, lipophilic extracts, oil extracts