

УДК 615.451.16

ПОЛИЭКСТРАКЦИЯ ТРАВЫ ЭХИНАЦЕИ СИСТЕМАМИ ЭКСТРАГЕНТОВ С ВОЗРАСТАЮЩЕЙ ПОЛЯРНОСТЬЮ

В. А. Вайнштейн^{1*}, И. Е. Каухова¹, П. С. Амелина¹, Ю. А. Колдашова¹, С. А. Минина¹, А. В. Иванова¹

Резюме. Разработан процесс экстрагирования травы эхинацеи (*Echinacea Moench*) последовательно рядом водно-спиртовых растворов с концентрацией спирта 70, 40 и 20%. Экстрагирование проводили в режиме вакуумного кипения с периодическими пульсациями вакуума. Такой режим обеспечил высокую скорость процесса и возможность извлечения как липофильных (производные хлорофилла, каротиноиды), так и гидрофильных (цикориевая кислота и ее производные) БАВ. Изучена кинетика извлечения БАВ на трех стадиях мацерации: цикориевая кислота извлекается полярным экстрагентом на всех стадиях экстрагирования; липофильные компоненты переходят в извлечение на стадии обработки спиртом 70%. Методом микропрепаративной тонкослойной хроматографии с элюированием и СФ-анализом элюатов определены группы извлекаемых БАВ. Проведено сравнение сухих экстрактов, получаемых экстрагированием водой, спиртом 24% и рядом экстрагентов с последовательно возрастающей полярностью. Установлено, что способ полиэкстракции позволяет получить продукт, содержащий наиболее широкий спектр БАВ эхинацеи.

Ключевые слова: природные иммуномодуляторы, трава эхинацеи, экстрагирование, УФ-спектроскопия, ТСХ, цикориевая кислота, эхинакозид.

POLYEXTRACTION OF HERBS OF ECHINACEA BY SYSTEMS OF EXTRACENTS WITH RISING POLARITY

V. A. Vainshtein^{1*}, I. E. Kauhova¹, P. S. Amelina¹, Yu. A. Koldashova¹, S. A. Minina¹, A. V. Ivanova¹

Abstract. The process of extracting the Echinacea herbs (*Echinacea Moench*) has been developed with a series of water-alcohol solutions with an alcohol concentration of 70%, 40%, 20%. Extraction was carried out in the vacuum boiling mode with periodic pulsations of the vacuum. Such a regime provided high speed of the process and the possibility of extracting both lipophilic (chlorophyll derivatives, carotenoids) and hydrophilic (chicory acid and its derivatives) BAS. The kinetics of BAS extraction at three stages of maceration was studied: chicory acid is extracted by the polar extractant at all stages of extracting; the lipophilic components pass into the extraction at the stage of treatment with an alcohol concentration of 70%. Method of micropreparative thin-layer chromatography with eluting and UV-analysis of the eluates was used to determine the groups of extractable BAS. A comparison of dry extracts obtained by water extraction, 24% alcohol extraction and extraction of a number of extractants with sequentially increasing polarity was made. It is established that the method of polyextraction allows to obtain a product containing the widest spectrum of BAS Echinacea.

Keywords: natural immunomodulators, herb echinacea, extraction, UV spectroscopy, TLC, chicory acid, echinacoside.

¹ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

¹ – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare, 14/A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:

E-mail: victor.vainshtein@pharminnotech.com

ВВЕДЕНИЕ

Эхинацея как лекарственное растительное сырье, известное эффективными иммуномодулирующим, противовоспалительным и противомикробным действиями, широко используется в фармацевтической и медицинской практике и представляет значительный интерес для научных исследований по созданию новых препаратов на ее основе [1–3, 10].

Достаточно широко известны и применяются в современной медицине препараты эхинацеи, в частности рода *Echinacea Moench*. Тем не менее постоянно возрастает интерес к разработке и использованию лекарственных препаратов и БАД на основе эхинацеи, что обусловлено широ-

ким спектром состава и лечебных свойств этого растения [1–3, 9, 10].

Фармакологическую активность эхинацеи определяют:

– **фенолкарбоновые кислоты и их производные:** цикориевая кислота (2,3-О-дикофеилвинная, далее **ЦК**) (рисунок 1), эхинакозид (гликозид 2,3-О-дикофеилвинной кислоты) (рисунок 2), кофейная, каффаровая и хлорогеновая кислоты (рисунок 3), цинарин;

– **флавоноиды:** лютеолин и лютеолин-7-гликозид, кемпферол и его 3-гликозид и 3-рутинозид, кверцетин и его 3-гликозид, 3-ксилозид, 3-арабинозид и другие;

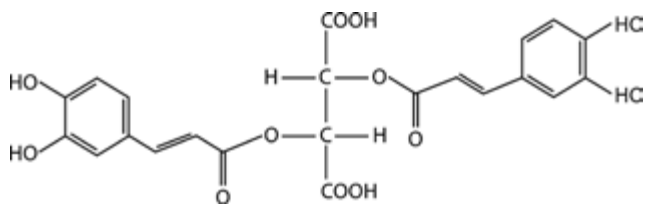


Рисунок 1. Структурная формула цикориевой кислоты

– **полисахариды и их олигомеры**, в частности инулин и фруктаны, содержание которых в корнях может достигать 5,9%;

– **ненасыщенные углеводороды (полиены)**, входящие в состав эфирного масла: эхинолон (10-Е-гидрокси-4,10-диметил-4,11-додекадиен-2-он), 1-пентадецен, 1,8Z-пентадекадиен;

– **алкиламиды ненасыщенных кислот**, в частности эхинацеин (изобутиламид додека-2E,6Z,8E,10E-тетраеновой кислоты), изобутиламиды додека-2E,4E,8Z,10E-тетраеновой и додека-2E,4E,8Z,10Z-тетраеновой кислот;

– **пигменты**, которые проявляют биологическую активность в комплексе с другими БАВ, в частности сумма хлорофиллов (далее СХ), а также некоторые каротиноиды.

Основным БАВ группы кофейных кислот эхинацеи является **цикориевая кислота (ЦК)**. Её максимальное количество содержится в эхинацее пурпурной и колеблется от 0,2 до 1,29%, причем соцветия и листья содержат ЦК больше, чем корни и стебли. Количество ЦК даже в пределах одного вида может варьироваться в зависимости от возраста растений, продолжительности их культивирования и фазы вегетации. **Эхинакозид** обладает бактерицидной активностью в отношении золотистого стафилококка, стрептококка, гипотензивными и анальгетическими свойствами. В конце 1980-х годов в Германии были запатентованы экстракты эхинацеи с содержанием цикориевой кислоты, обладающей иммуностимулирующими свойствами.

Биологическая активность отдельно взятых очищенных компонентов эхинацеи незначительна. Лечебный эффект суммарных извлечений эхинацеи – настоек, экстрактов, консервированного сока – более

высокий, чем у индивидуальных веществ. В наибольшей степени иммуномодулирующие, противовирусные, репаративные, противовоспалительные свойства проявляет суммарный (нативный) комплекс БАВ эхинацеи, близкий к природному составу растения, например сок травы эхинацеи [4, 7].

Выпускаемые из неё препараты представляют собой извлечения из всех частей как свежего, так и высушенного растения. На сегодняшний день зарегистрированы и выпускаются более десяти наименований различных лекарственных препаратов и биологически активных добавок на основе эхинацеи отечественных и зарубежных производителей [11].

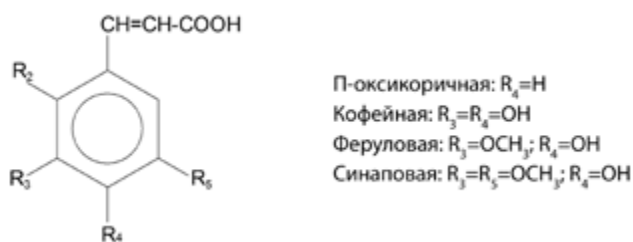


Рисунок 3. Структурные формулы оксикоричных (фенолкарбоновых) кислот и некоторых их производных

Создание суммарных (галеновых) препаратов является дополнением, а иногда альтернативой созданию индивидуальных, так как нативные комплексы БАВ обладают широким спектром действия и меньшей токсичностью для организма, являясь природным, естественным, сбалансированным состоянием действующих веществ [6, 11].

В технологии фитопрепаратов известны полиэкстракты (полифракционные экстракты) – суммарные препараты, полученные путем последовательного экстрагирования ЛРС несколькими системами экстрагентов, например с возрастающей полярностью. Из полученных извлечений получают полиэкстракт, обладающий широким спектром фармакологической активности.

Целью настоящего исследования является получение и характеристика полиэкстракта травы эхинацеи, содержащего широкий спектр БАВ, предназначенного для лечения и профилактики простудных заболеваний и вирусных инфекций.

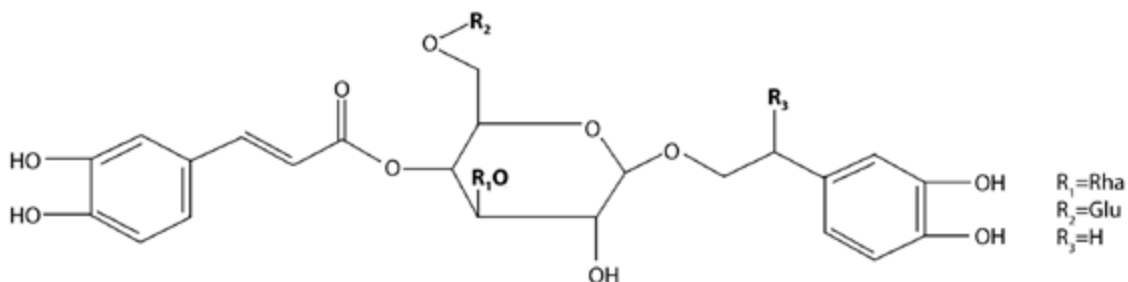


Рисунок 2. Структурная формула эхинакозида

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Приборы и оборудование

- спектрофотометр СФ-2000;
- весы аналитические Adventurer, диапазон измерений 0,1 мг – 210 г;
- весы препаративные Adventurer, диапазон измерений 0,01 – 510 г;
- роторно-вакуумный испаритель;
- эксикатор вакуумный;
- электроплитка с закрытым обогревом;
- водяная баня;
- сушильный шкаф ШС-80-01 СПУ;
- установка для проведения экстракции в режиме вакуумного кипения (колба с обратным холодильником и подводом вакуума, обогреваемая на водяной бане);
- комплект для ТСХ «Ленхром»: термостол для ТСХ, пластинки «Сорбфил» ПТСХ-АФ; камеры стеклянные, ультрафиолетовый кабинет-облучатель 254/365.

Основным материалом исследования в данной работе являлась трава эхинацеи сухая.

Реактивы

- спирт этиловый ректификованный (ГОСТ Р 5165252-2000);
- вода очищенная (ФС 42-2619-97);
- хлороформ (ГОСТ 3160-51);
- н-бутанол (ГОСТ 6006-78);
- уксусная кислота ледяная (х.ч., ГОСТ 61-75);
- ацетон (ГОСТ 2603-79);
- раствор аммиака водный (ч.д.а., ГОСТ 3760-79);
- серная кислота (ч.д.а., ГОСТ 4202-77);
- н-гексан (ГОСТ 5542-87);
- метанол;
- алюминия хлорид;
- квасцы железоммонийные;
- железо(+3) хлорное.

Физико-химические методы анализа. ТСХ (качественная, микропрепаративная с элюированием, обнаружение)

Качественный анализ сухого полиэкстракта эхинацеи (далее СПЭ) методом ТСХ.

Подготовка проб

Во флакон с герметичной пробкой емкостью 20 мл вносили навеску сухого экстракта массой около 0,1 г (точная навеска). Приливали 5,0 мл хлороформа, 10,0 мл воды, закрывали пробкой и перемешивали встряхиванием в течение 2 часов. Фазы разделяли отстаиванием. Нижнюю хлороформенную фазу (**раствор А**) использовали для анализа липофильной фракции, верхнюю водную (**раствор Б**) – для анализа оксикоричных кислот и полисахаридов.

Липофильная фракция

На пластину «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили в точку 40–50 мкл раствора А. Хроматографировали восходящим способом в заранее приготовленной и насыщенной камере в системе растворителей гексан : ацетон (7:3).

После прохождения фронта системы до 5–10 мм от края пластинки ее извлекали, отмечали линию фронта и подсушивали в вытяжном шкафу.

Пластинку просматривали в видимом свете и наблюдали шесть разделившихся пятен: три темно-зеленых (в области $R_f=0,4-0,65$, производные хлорофиллов разной полярности), из которых одно не сдвигалось со стартовой линии, два желто-зеленых и одно ярко-желтое. Для сдвига пятна со старта эту же пластину помещали в систему растворителей хлороформ : метанол : уксусная кислота (4:0,5:0,1) на 1–2 мин, вынимали и подсушивали в вытяжном шкафу (рисунки 9, 10, 11).

Микропрепаративная хроматография липофильной фракции с элюированием и спектроскопией элюатов

На линию старта пластины «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили полосой 400–500 мкл раствора А. Хроматографировали по методике, описанной выше. Получали пластинку с разделившимися шестью полосами. Нумеровали полосы на пластинке сверху вниз (рисунок 12). Вырезали каждую полосу по контуру, измельчали, помещали в отдельные флаконы, приливали по 5 мл спирта, перемешивали встряхиванием в течение часа. Полученные элюаты фильтровали через фильтр с величиной пор 0,45 мкм (Millipore), помещали в кварцевые кюветы толщиной 1 см. Записывали УФ-спектр в диапазоне от 250 до 700 нм на спектрофотометре СФ-2000 (рисунок 13). Полученные спектры соотносили с данными в литературе и делали выводы по составу липофильной фракции СПЭ.

Гидрофильная фракция

На пластину «Сорбфил» ПТСХ-АФ микрошприцем наносили в точку 5–10 мкл раствора Б. Хроматографировали восходящим способом в системе растворителей н-бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:1).

После прохождения фронта системы до 10–15 мм от края пластинки ее вынимали, отмечали линию фронта и подсушивали в вытяжном шкафу 15–20 минут (рисунок 14). Делали 3–4 одинаковых пробы для различных способов детекции. Пластинки просматривали в УФ-свете при 365 нм. На темном фоне наблюдали 2 голубых пятна: с $R_f=0,25-0,35$ (эхинакозид) и с $R_f=0,45-0,55$ (цикориевая кислота). Пластинку 1 окунали в 5% раствор хлорного железа в 50% спирте и подсушивали на воздухе. Наблюдали два темно-серых пятна с теми же значениями R_f , причем верхнее пятно (цикориевая кислота) имело более темный оттенок, чем нижнее (эхинакозид). Для пластинки 2 использовали обнаружение пятен в парах аммиака, наблюдали такие же пятна с теми же значениями R_f , бежево-розоватого оттенка. Интенсивность цвета верхних пятен была сильнее, чем нижних. Пятна на пластинке 3 обнаруживали с помощью серной кислоты: окунали в 30% раствор серной кислоты в 50% спирте, вынимали, ополаскивали водой и выдерживали в сушильном шкафу при 120 °С. Наблюдали темно-серое пятно с $R_f=0,45-0,55$ (цикориевая кислота), темно-серое пятно меньшей интенсивности с $R_f=0,25-0,35$ (эхинакозид) и черное продолговатое пятно в области с $R_f=0,01-0,25$ (полисахариды и олигосахариды).

Количественное определение оксикоричных кислот методом спектроскопии: а) в жидких извлечениях; б) в сухих экстрактах.

А) Определение оксикоричных кислот в жидких извлечениях (в пересчете на цикориевую кислоту). Во флаконы с пробками отбирали пробы жидких последовательных извлечений эхинацеи.

0,25 мл жидкого извлечения вносили в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили водой до метки, получая разбавление в 200 раз. Записывали УФ-спектры разведения в диапазоне от 250 до 350 нм. Полученные спектры имели максимум поглощения при 325 ± 5 нм и плечо в интервале от 295 до 310 нм (рисунок 4). Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны максимума в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту в жидком извлечении рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{цк}} = \frac{D \cdot V_2}{v \cdot 782},$$

где $C_{\text{цк}}$ – концентрация цикориевой кислоты в растворе, %; D – оптическая плотность при максимуме в области 325 нм; V_2 – объем разведенного раствора, мл; v – объем пробы раствора (фильтрованного), мл; 782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты в воде при 325 нм.

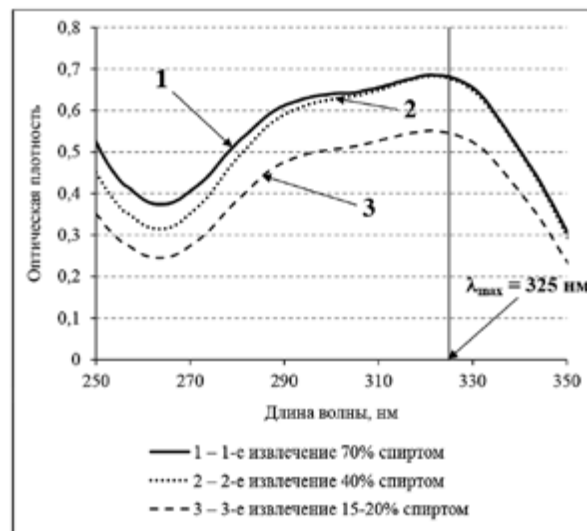


Рисунок 4. Электронные спектры цикориевой кислоты и эхинакозида в трех последовательных извлечениях эхинацеи пурпурной из раствора Б

Б) Определение оксикоричных кислот (цикориевой кислоты и эхинакозида) в сухих экстрактах. 0,5 мл раствора Б вносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили объем до метки водой очищенной.

Снимали УФ-спектр в диапазоне от 250 до 350 нм на спектрофотометре СФ-2000. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны максимума. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на цикориевую кислоту и сухой экстракт в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 10 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 0,5 \cdot 782 \cdot (100 - w)} = \frac{D \cdot 100000}{m \cdot 782 \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески экстракта, г; w – потеря в массе при высушивании испытуемого экстракта, %; 782 – удельный показатель поглощения цикориевой кислоты при 325 нм.

Количественное определение суммы хлорофиллов: а) в жидких извлечениях, б) в сухих экстрактах.

А) Определение суммы хлорофиллов в жидких экстрактах (в пересчете на феофитин). 0,5 мл жидкого извлечения вносили в мерную колбу объемом 10 мл, доводили спиртом до метки, получая разбавление в 20 раз. Записывали УФ-спектры разведения в диапазоне от 350 до 700 нм. Полученные спектры имели максимум поглощения при 410 ± 5 и 665 ± 5 нм (рисунок 5). Измеряли оптическую плотность полученного раствора при длине волны максимума 665 ± 5 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт.

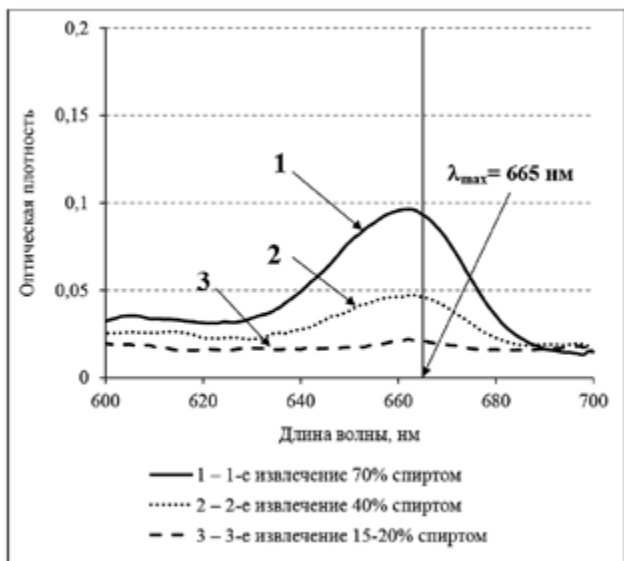


Рисунок 5. Электронные спектры поглощения в трех последовательных извлечениях эхинацеи пурпурной в спирте 95%, полученные из раствора А

Содержание суммы хлорофиллов в пересчете на феофитин в жидком извлечении рассчитывали по формуле:

$$C_{\text{хл}} = \frac{D \cdot V_1 \cdot 1000}{v \cdot 755},$$

где $C_{\text{хл}}$ – концентрация суммы хлорофиллов в растворе в пересчете на феофитин, мг%; D – оптическая плотность при максимуме в области 665 нм; V_1 – объем разведенного раствора, мл; v – объем пробы раствора (фильтрата после растворения навески и фильтрования раствора), мл; 755 – удельный показатель поглощения суммы хлорофиллов в спирте при 665 нм; 1000 – коэффициент пересчета в мг%.

Б) Определение суммы хлорофиллов в сухих экстрактах (в пересчете на феофитин). 1 мл раствора А вносили в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили объем до метки спиртом. Снимали УФ-спектр в диапазоне от 350 до 700 нм на спектрофотометре СФ-2000. Измеряли оптическую плотность раствора при длине волны максимума в области 665±5 нм. В качестве раствора сравнения использовали спирт. Содержание суммы хлорофиллов в пересчете на феофитин и сухой экстракт в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \cdot 5 \cdot 10 \cdot 100}{m \cdot 1 \cdot 755 \cdot (100 - w)} = \frac{D \cdot 5000}{m \cdot 755 \cdot (100 - w)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса навески экстракта, г; w – потеря в массе при высушивании испытуемого экстракта, %; 755 – коэффициент удельной экстинкции при длине волны максимума в области 665±5 нм (равен оптической плотности раствора феофитина А при концентрации 1% и толщине кюветы 1 см).

Определение доли сухого остатка в суммарной вытяжке травы эхинацеи после проведения трехступенчатой мацерации

В предварительно взвешенные 2 бюкса наливали по 10–15 мл раствора (точная навеска). Помещали в сушильный шкаф при 90 °С. Сушили до постоянной массы. Взвешивали после сушки и рассчитывали сухой остаток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экстрагирование осуществляли в режиме вакуумного кипения.

Для исследования процесса экстракции в режиме вакуумного кипения была собрана установка, представленная на рисунке 6.

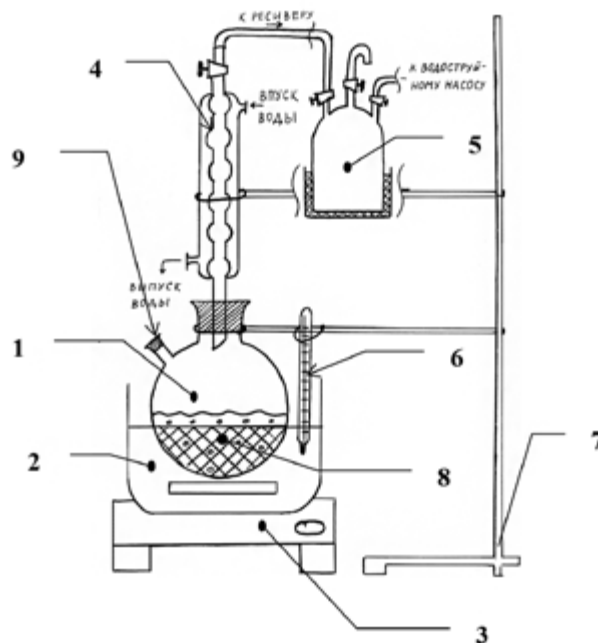


Рисунок 6. Установка для экстрагирования в режиме вакуумного кипения: 1 – колба-экстрактор; 2 – водяная баня; 3 – электроплитка; 4 – обратный холодильник; 5 – ресивер; 6 – термометр; 7 – штатив; 8 – экстрагируемое растительное сырье и экстрагент; 9 – тубус для отбора проб

Экстрактор представляет собой круглодонную колбу (1) вместимостью 1 л с тубусом для отбора проб (9). В качестве нагревателя использовали водяную баню (2) на плитке (3), температуру измеряли термометром (6). Вакуум создавали с помощью мембранного или водоструйного насоса, к которому через ресивер (5) подключен обратный холодильник (4).

Проводили экстракцию методом трехступенчатой мацерации с возрастанием полярности экстрагента (70, 40 и 15–20% этиловый спирт). Такая последовательность экстрагентов была выбрана для возможности извлечения как липофильной, так и гидрофильной фракций БАВ.

Таблица 1.

Загрузки, параметры и выходы полупродуктов в процессе экстракции эхинацеи в режиме вакуумного кипения

Методика проведения работы: собирали установку для вакуумного кипения, предварительно взвесив пустую колбу-экстрактор (1).

Проводили последовательно 3 мацерации со смесью экстрагента (таблица 1).

Первая мацерация: в колбу загружали 100 г сухого сырья травы эхинацеи, 500 г этилового спирта 70% (в соответствии с модулем экстракции 1:5 по массе), помещали на водяную баню. Нагревали баню до 60 °С и включали вакуум. Доводили вакуум до активного кипения в колбе, что обеспечивало эффективное перемешивание и обработку массы сырья парожидкостной смесью экстрагента при пониженной температуре (50–60 °С); в этих условиях достигается наиболее полное извлечение экстрактивных веществ, а также сохранность структуры и свойств извлекаемых БАВ.

Через 30 мин впускали воздух в систему и делали через тубус колбы первый отбор пробы (2 мл). Закрывали пробку и снова подавали вакуум. Температура в бане поддерживалась на уровне 50–60 °С, в колбе – бурное кипение. Таким образом, благодаря периодическому включению вакуума создавался режим вакуумной пульсации, позволяющий экстрагенту проникать в поры растительного сырья и лучше извлекать БАВ. При таком режиме не происходит измельчения сырья в процессе экстрагирования. Делали пять отборов для анализа (через 30, 60, 90, 120 и 150 мин от начала кипения). После окончания первой мацерации (спустя 150 мин от начала кипения) экстракт 1 сливали через сито капроновое № 69 в предварительно взвешенный флакон. Взвешивали и регистрировали массу и объем экстракта 1 и шрота влажного по разности массы колбы со шротом и пустой.

Вторая мацерация: рассчитывали необходимое количество добавляемого этилового спирта и воды для получения 40% экстрагента в соответствии с заданным модулем экстракции. Приливали через тубус рассчитанные количества спирта и воды. Включали нагрев, периодически включали вакуум. Дальнейшие операции с отборами проб выполняли, как в первой мацерации.

Третья мацерация: на основании массы влажного шрота и модуля экстракции к шроту прибавляли только рассчитанное количество воды (без спирта). Рассчитывали содержание спирта в третьем экстрагенте. Проводили процесс аналогично предыдущим с отборами проб.

Объединяли все три вытяжки, хранили в герметичном контейнере.

Доля сухого остатка суммарного извлечения составила в среднем $2,40 \pm 0,59\%$.

1 мацерация		
Загружено, г	Номер партии (варианта)	
	1.01	2.01
Экстрагент и модуль экстракции	70% спирт; 5:1 по массе	70% спирт; 5:1 по массе
Эхинацеи трава сухая	100	200
Этиловый спирт 95%	368	736
Вода	132	264
Итого	600	1200
Получено, г		
Вытяжка 1	210	527
Шрот влажный, в его составе	314	619
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	150	293
Вода	64	126
Потери	76	54
Итого	600	1200
2 мацерация		
Загружено, г		
Экстрагент и модуль экстракции	40% спирт; 6:1 по массе	40% спирт; 6:1 по массе
Шрот влажный, в его составе	314	619
Шрот сухой	100	200
Спирт	150	293
Вода	64	126
Этиловый спирт 95%	95	197
Вода	291	584
Итого	700	1400
Получено, г		
Вытяжка 2	298	583
Шрот влажный, в его составе	394	768
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	118	227
Вода	176	341
Потери	8	49
Итого	700	1400
3 мацерация		
Загружено, г		
Экстрагент и модуль экстракции	20% спирт; 6:1 по массе	16,2% спирт; 7:1 по массе
Шрот влажный, г; в его составе	394	768
Шрот сухой	100	200
Этиловый спирт	118	227
Вода	176	341
Вода	306	832
Итого	700	1600
Получено, г		
Вытяжка 3	220	830
Шрот влажный	410	720
Потери	70	50
Итого	700	1600
Объединение трех полученных извлечений		
Получено объединенного жидкого извлечения, г	700	1940

Кинетика процесса экстрагирования в режиме вакуумного кипения

Представляло интерес изучение характера извлечения гидрофильных и липофильных фракций в процессе трех экстракций с переменным составом экстрагента.

Для изучения кинетики использовали отборы извлечений, взятые в ходе проведения экстракции (таблица 1).

Результаты определения ЦК и СХ в пробах извлечений при изучении кинетики в режиме вакуумного кипения приведены на рисунках 7 и 8.

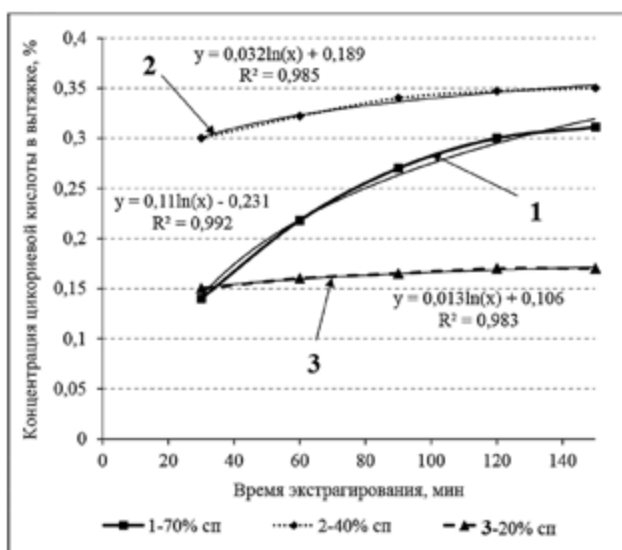


Рисунок 7. Кинетика извлечения цикориевой кислоты и эхинакозида при трех мацерациях в режиме вакуумного кипения

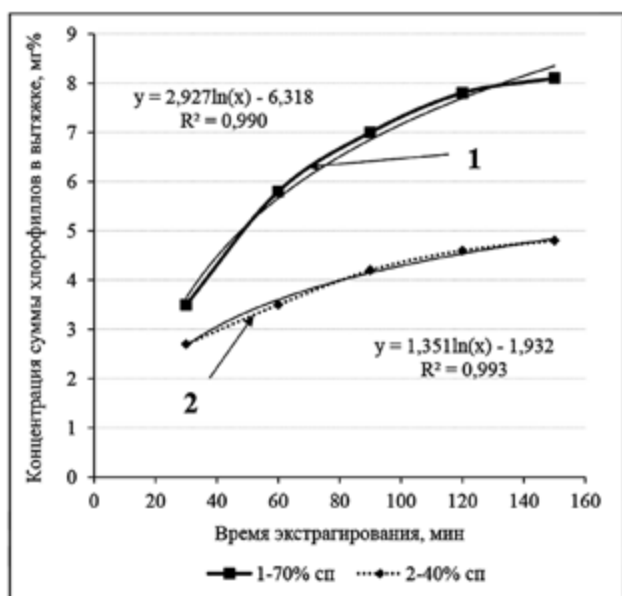


Рисунок 8. Кинетика извлечения суммы хлорофиллов при двух мацерациях в режиме вакуумного кипения

Как видно из полученных результатов, концентрация цикориевой кислоты и эхинакозида при экстрагировании 70% спиртом возрастает в течение 2,5 часов по логарифмическому закону (рисунок 7, кривая 1). При замене экстрагента на 40% спирт извлечение этой группы веществ происходит наиболее эффективно; при этом сказывается обработка шрота предыдущим экстрагентом (рисунок 7, кривая 2). Дальнейшее увеличение воды в экстрагенте (20% спирт) приводит к меньшим концентрациям экстрактивных веществ в извлечении, что связано также с постепенным истощением сырья (рисунок 7, кривая 3).

Липофильная сумма производных хлорофилла преимущественно извлекается 70% спиртом и значительно меньшая часть – 40% спиртом (рисунок 8). В 20% спирте СХ и близкие к ним по полярности вещества практически не обнаруживаются.

Установлено, что скорость извлечения цикориевой кислоты выше на первой мацерации, когда 70% этиловый спирт подается на свежее сырье (траву эхинацеи сухую) и вытяжка наиболее обогащена БАВ, в том числе цикориевой кислотой. Однако степень извлечения больше на второй мацерации 40% этиловым спиртом, в котором цикориевая кислота лучше растворима. Остаточное количество цикориевой кислоты извлекается ~20% спиртом на третьей мацерации.

Скорость и степень извлечения липофильной фракции максимальны на первой мацерации с 70% спиртом. На второй мацерации 40% спиртом хлорофиллы извлекаются незначительно, их обнаружение связано в основном с разбавлением влажного шрота следующей порцией экстрагента после 1-й мацерации.

Таким образом, способ последовательной экстракции рядом экстрагентов с возрастающей полярностью дает на первой мацерации максимальный выход по хлорофиллам, на второй – по фенолпропаноидам (цикориевой кислоте); третья мацерация позволяет извлечь, кроме цикориевой кислоты, значительную часть полисахаридов. При 4-й мацерации истощенно шрота водой извлекается остаток полисахаридов.

Поскольку практической целью исследования являлось получение сухого полиэкстракта, обогащенного как липофильными, так и гидрофильными БАВ эхинацеи, жидкие извлечения из трех мацераций перед последующей сушкой объединяли (таблица 1).

Для получения сухого полиэкстракта эхинацеи проводили упаривание и сушку объединенного жидкого извлечения эхинацеи.

Взвешенное объединенное извлечение помещали в колбу вакуум-роторного испарителя для удаления основной массы растворителя. Упаривание вели под вакуумом при температуре 50–60 °С до того момента, как вытяжка становилась густой. Отгон собирали в отдельную колбу и направляли на регенерацию спирта.

Сгущенную вытяжку сушили в сушильном шкафу при температуре 70 °С до очень вязкого, слаботекучего состояния.

Остаток досушивали в вакуум-сушильном шкафу или вакуум-эксикаторе до постоянной массы. Затем измельчали и просеивали сухой полиэкстракт.

Полученный сухой полиэкстракт эхинацеи представляет собой порошок зелено-бурого цвета, гигроскопичный, плохо сыпучий, с характерным запахом. Качественный состав суммарного сухого полиэкстракта показан на рисунке 9.

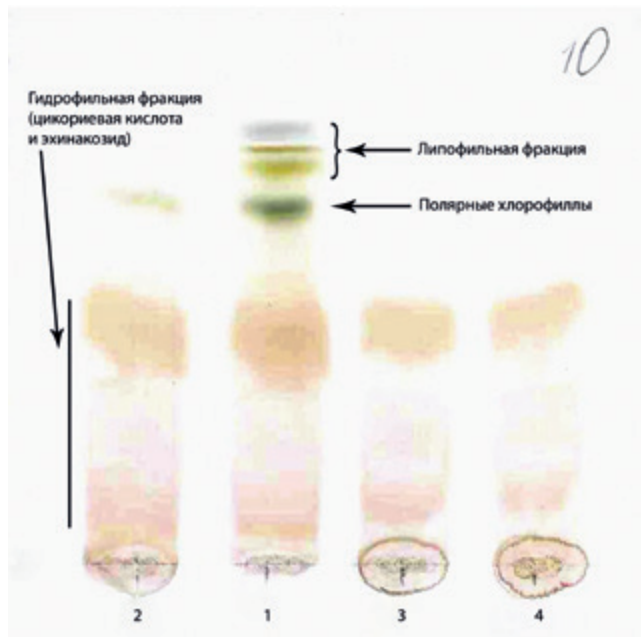


Рисунок 9. Тонкослойная хроматография четырех извлечений, полученных методом последовательной экстракции травы эхинацеи рядом экстрагентов с возрастающей полярностью. Хроматограмма в системе гексан : ацетон (7:3), дополнительно проявленная в системе бутанол : уксусная кислота : вода (4:1:1), обнаружение в парах аммиака.

1 – первое извлечение 70% спиртом; 2 – второе извлечение 40% спиртом; 3 – третье извлечение 15–17% спиртом; 4 – четвертое, остаточное, извлечение 5–10% спиртом

Сравнительная характеристика сухих экстрактов эхинацеи, полученных различными способами

В России зарегистрированы и выпускаются 2 вида сухих экстрактов эхинацеи (далее СЭЭ), предназначенные для производства готовых лекарственных форм экстракцией водой (СЭЭ-в) [12] и экстракцией 24% этиловым спиртом (СЭЭ-в/с) [8].

Представляло интерес сравнение составов и некоторых свойств разрабатываемого нами полиэкстракта с выпускаемыми экстрактами.

Качественную сравнительную характеристику проводили путем анализа сухих экстрактов методом ТСХ. Хроматограммы представлены на рисунках 10 и 11.

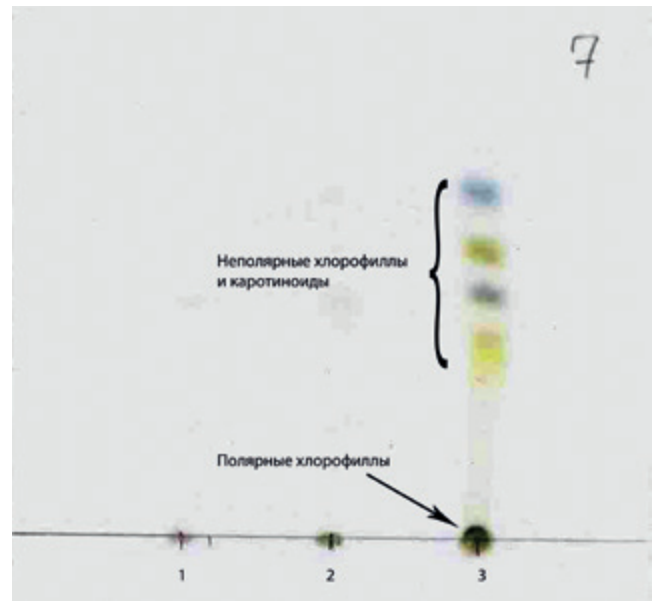


Рисунок 10. Хроматограмма, полученная в системе гексан : ацетон (7:3) с нанесенными на нее образцами трех СЭЭ с нагрузкой 50 мкл

1 – СЭЭ-в – экстракция горячей водой; 2 – СЭЭ-в/с – экстракция 24% этиловым спиртом; 3 – СПЭ – экстракция с возрастанием полярности экстрагента

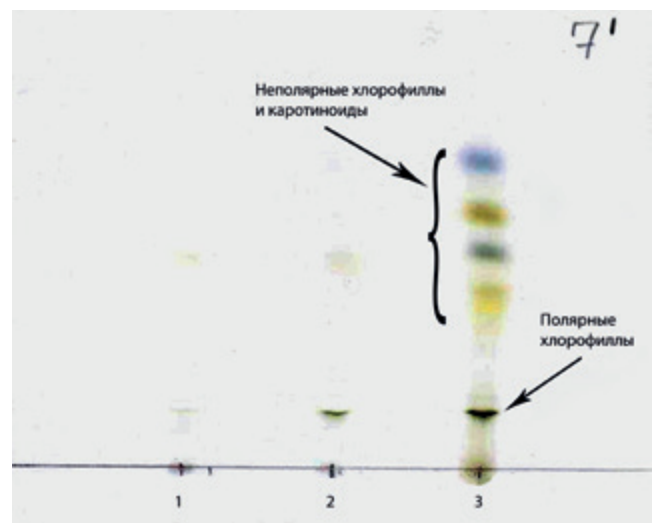


Рисунок 11. Хроматограмма, полученная в системе гексан : ацетон (7:3) и дополнительно помещенная в систему хлороформ : метанол : уксусная кислота (4:0,5:0,1) для сдвига стартовых (полярных) хлорофиллов. Обозначения те же, что на рисунке 10

Сухой полиэкстракт эхинацеи (образец 3, рисунки 10 и 11) содержит более широкий спектр липофильных веществ, причем в этой области могут находиться и минорные липофильные вещества, укладываемые по величине R_f между полярными и неполярными хлорофиллами и каротиноидами.

Липофильная фракция сухого экстракта эхинацеи, полученного экстракцией 24% этанолом, содержит незначительное количество только полярных произ-

водных хлорофилла (1 пятно), что позволяет предположить отсутствие фармакологических свойств, обусловленных липофильными БАВ эхинацеи. Сухой экстракт эхинацеи, полученный экстракцией водой, совсем не содержит хлорофиллов, то есть липофильной фракции БАВ.

Для анализа и частичной идентификации липофильной фракции СПЭ проведена микропрепаративная ТСХ с разделяющей системой гексан : ацетон (7:3) (рисунок 12) и последующим элюированием и спектроскопией элюатов (рисунок 13).

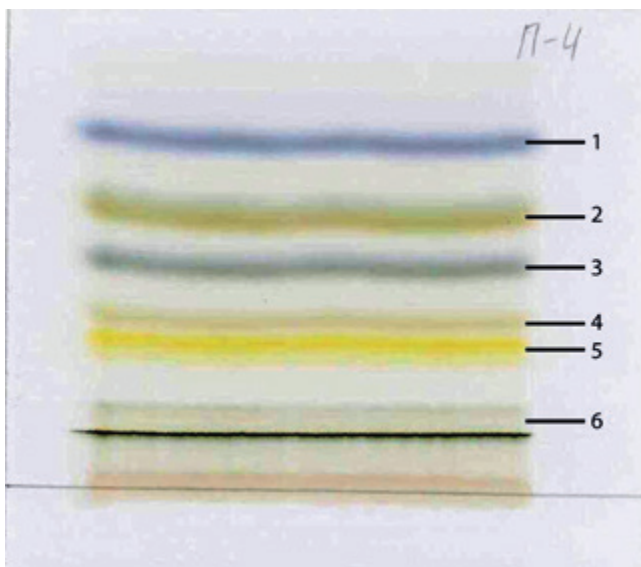


Рисунок 12. Микропрепаративная хроматограмма с разделившейся липофильной фракцией (6 полос) полиэкстракта эхинацеи для элюирования

Полученные спектры сопоставили с данными литературы. Установлено наличие неполярных и полярных производных хлорофиллов (пятна № 1, 2, 3, 6), а также каротиноидов (№ 5). Спектр, снятый с пятна № 4, не идентифицирован, вероятно, содержит следы хлорофиллов.

Проведен также качественный анализ группы полярных БАВ эхинацеи – фенилпропаноидов – в трех сухих экстрактах, полученных различными способами (рисунок 14).

Гидрофильная фракция всех сравниваемых СЭЭ содержит два пятна производных оксикоричных кислот, по-видимому, цикориевой кислоты и эхинакозида, видимых при проявлении аммиаком и серной кислотой. Сумма этих производных в пересчете на цикориевую кислоту в трех экстрактах примерно одинакова и составляет 7,2-7,6% от сухого экстракта.

При обнаружении серной кислотой на старте наблюдаются темные пятна полисахаридов, которых больше всего в СЭЭ, полученном экстракцией водой.

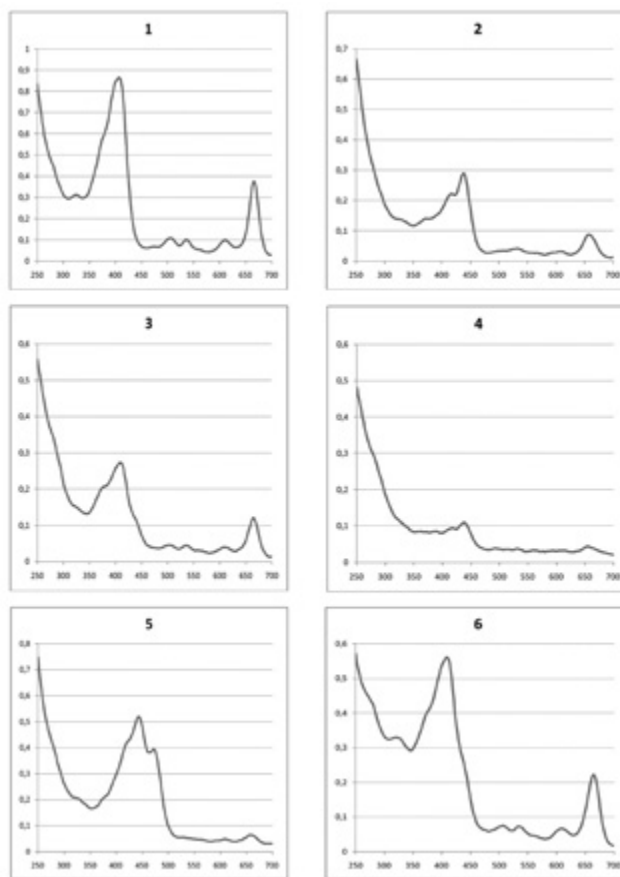


Рисунок 13. Электронные спектры элюатов полос на микропрепаративной хроматограмме (рисунок 12)

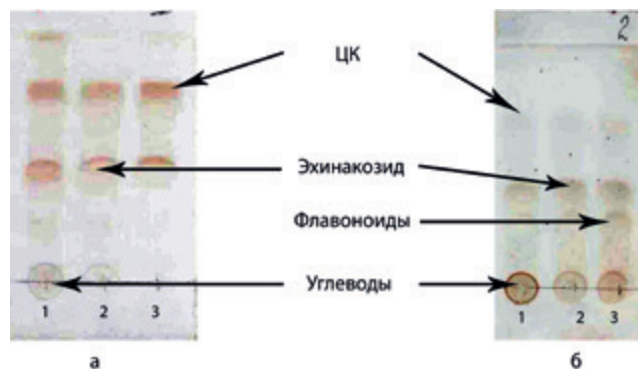


Рисунок 14. ТСХ образцов трех СЭЭ в системе н-бутанол : уксусная кислота : вода 4:1:1 (БУВ), нагрузка – по 5 мкл. Обнаружение в парах аммиака (а) и серной кислотой (б)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракция травы эхинацеи, проведенная методом трехступенчатой мацерации в режиме вакуумного кипения с возрастанием полярности экстрагента (70, 40 и 15–20% спирт), позволила получить полиэкстракт, содержащий гидрофильные и липофильные вещества, близкий по составу к нативному комплексу БАВ эхинацеи.

Конечный продукт – сухой полиэкстракт эхинацеи – отличается от выпускаемых промышленных аналогов наличием широкого спектра липофильных веществ, из которых частично идентифицированы полярные и неполярные производные хлорофиллов, а также каротиноиды.

Гидрофильная фракция трех сравниваемых экстрактов содержит по два характерных пятна производных оксикоричных кислот, вероятно, цикориевой кислоты и эхинакозида. Сумма этих производных в пересчете на цикориевую кислоту в трех экстрактах примерно одинакова и составляет 7,2–7,6% от сухого экстракта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдеева Е. В. Лекарственные растения, содержащие фенолпропаноиды, как источник получения гепатопротекторных и иммуномодулирующих препаратов. Автореферат. докт. дисс., Пятигорск, 2007. 276 с. [Avdeeva E. V. Lekarstvennyye rastenija, soderzhashhie fenilpropanoidy, kak istochnik poluchenija gepatoprotekturnyh i immunomodulirujushhih preparatov. Avtoreferat dokt. diss. [Medicinal plants containing phenylpropanoids as a source of hepatoprotective and immunomodulating drugs. Abstract of the doctoral dissertation.] Pyatigorsk, 2007. 276 p.]
2. Бакуридзе А. Д., Курцикидзе М. Ш., Писарев В. М., Махарадзе Р. В., Берашвили Д. Т. Иммуномодуляторы растительного происхождения (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1993. № 8. С. 43–46. [Bakuridze A. D., Kurcikidze M. Sh., Pisarev V. M., Maharadze R. V., Berashvili D. T. Immunomodulatory rastitel'nogo proishozhdenija (obzor) // Himiko-farmaceuticheskij zhurnal. [Immunomodulators of plant origin (review) // Chemical-Pharmaceutical journal.] 1993. № 8. P. 43–46.]
3. Бизунок Н. А. Эхинацея: ботаника, история, химия, фармакология // Медицинские новости. 2006. № 4. С. 19–26. [Bizunok N. A. Jehinaceja: botanika, istorija, himija, farmakologija // Medicinskie novosti. [Echinacea: botany, history, chemistry, pharmacology // Medical News.] 2006. № 4. P. 19–26.]
4. Вайнштейн, В. А., Каухова. И. Е. Двухфазная экстракция в получении лекарственных и косметических средств. СПб, 2010. 104 с. [Vajnshtejn, V. A., Kauhova. I. E. Dvuhfaznajekstrakcijavpolucheniiilekarstvennyhikosmeticheskisredstv. [Two-phase extraction in obtaining medicinal and cosmetic means.] St. Petersburg, 2010. 104 p.]
5. Вальчихина О. Ю., Демина Н. Б., Надер А. Корневище имбиря как перспективное растительное сырье для создания лекарственных средств // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2015. № 4. С. 62–70. [Val'chihina O. Ju., Demina N. B., Nader A. Kornevishhe imbirja kak per-spektivnoe rastitel'noe syr'e dlja sozdaniya lekarstvennyh sredstv // Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv [The ginger rhizome as a promising plant raw material for the creation of medicines // Drug development and registration.] 2015. № 4. P. 62–70.]
6. Косман В. М., Пожарицкая О. Н., Шиков А. Н., Макаров В. Г. Изучение состава биологически активных веществ сухих экстрактов эхинацеи узколистной и шалфея лекарственного // Химия растительного сырья. 2012. № 1. С.153–160. [Kosman V. M., Pozharickaja O. N., Shikov A. N., Makarov V. G. Izuchenie sostava biologicheskij aktivnyh veshhestv suhih jekstraktov jehinacei uzkolistnoj i shalfeja lekarstvennogo // Himija rastitel'nogo syr'ja [Study of the composition of biologically active substances of dry extracts of echinacea narrow-leaved and sage medicinal // Chemistry of plant raw material.] 2012. № 1. P. 153–160.]
7. Минина, С. А., Каухова И. Е. Химия и технология фитопрепаратов. М, 2009. 560 с. [Minina, S. A., Kauhova I. E. Himija i tehnologija fitopreparatov [Chemistry and technology of phytopreparations.] М, 2009. 560 p.]
8. Патент RU 2137490. Иммуностимулирующее средство эстифан и способ его получения / Качалина Т. В., Колхир В. К., Охоникова В. Ф., Сакович Г. С., Сенина Т. А., Сидорова Е. А., Стихин В. А.; патентообладатель Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений «ВИЛАР» РАСХН. – Заявл. 26.03.98; опубл. 20.09.99. [Patent RU 2137490. Immunostimulirujushhee sredstvo jestifan i sposob ego poluchenija [Patent RU 2137490. Immunostimulating means estifan and its obtaining method] / Kachalina T. V., Kolhir V. K., Ohonikova V. F., Sakovich G. S., Senina T. A., Sidorova E. A., Stihin V. A.; patentoobladatel' Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut lekarstvennyh i aromaticeskijh rastenij «VILAR» RASHN. – Zjavl. 26.03.98; opubl. 20.09.99.]
9. Самородов В. Н., Пospelов С. В., Моисеева Г. Ф., Серeda А. В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (Echinacea Moench.) и его фармакологические свойства (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. 1996. № 4. С. 32–37. [Samorodov V. N., Pospelov S. V., Moiseeva G. F., Sereda A. V. Fitohimicheskij sostav predstavitelej roda jehinaceja (Echinacea Moench.) i ego farmakologicheskie svojstva (obzor) // Himiko-farmaceuticheskijzhurnal. [Phytochemical composition of representatives of the genus Echinacea (Echinacea Moench.) and its pharmacological properties (review) // Chemical-Pharmaceutical journal.] 1996. № 4. P. 32–37.]
10. Серeda А. В., Моисеева Г. Ф. Биологически активные вещества и стандартизация лекарственных растений рода Echinacea // Фармаком. 1998. № 3. С. 13–23. [Sereda A. V., Moiseeva G. F. Biologicheskij aktivnye veshhestva i standartizacija lekarstvennyh rastenij roda Echinacea // Farmakom. [Biologically active substances and standardization of medicinal plants of the genus Echinacea // Pharmacom.] 1998. № 3. P. 13–23.]
11. Справочник лекарств РЛС. [Spravochnik lekarstv RLS. [Reference book of medicines RLS]. Availableat: <https://www.rlsnet.ru/> (accessed 14.01.18).]
12. Эхинацеи экстракт сухой (Echinacea extract siccum). Инструкция по применению. [Jehinacei jekstrakt suhoj (Echinacea extract siccum). Instrukcija po primeneniju. [Echinacea dry extract (Echinacea extract siccum). Instructions for use]. Available at: <http://www.rusmedserv.com/lekarstva/ehinatsei-ekstrakt-suhoy.html> (accessed 14.01.18).]