

ЭКСТРАКЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВА ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ «РАСТОРОПША ПЯТНИСТАЯ»

Н.В. Никитченко^{1,2}, И.А. Платонов^{1,2}, Л.А. Онучак², Ю.И. Арутюнов²

¹Самарский государственный аэрокосмический университет им. С.П. Королёва
(национальный исследовательский университет)
443086, г. Самара, Московское шоссе, д. 34
navinita@mail.ru

²Самарский государственный университет
443011, г. Самара, ул. Ак. Павлова, д. 1

Поступила в редакцию 2 марта 2012 г.

Разработана методика определения качества лекарственного растительного сырья «расторопша пятнистая», основанная на извлечении биологически активных веществ методом жидкостной экстракции под давлением, с последующим хроматографическим анализом экстракта.

Ключевые слова: биологически активные вещества, контроль качества сырья, расторопша пятнистая, жидкостная экстракция под давлением, субкритическая вода, обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Никитченко Наталья Викторовна – младший научный сотрудник НОЦ «Хроматография» Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П. Королёва, аспирант Самарского государственного университета.

Область научных интересов: хроматографический анализ сложных объектов, методы пробоподготовки, экстракция суб- и сверхкритическими экстрагентами.

Соавтор 6 опубликованных работ.

Платонов Игорь Артемьевич – заведующий кафедрой химии Самарского государственного аэрокосмического университета им. С.П. Королёва, доцент кафедры физической химии и хроматографии Самарского государственного университета, доктор технических наук.

Область научных интересов: разработка аналитических схем контроля, методы пробоподготовки, приборостроение, разработка капиллярных колонок, газовая и жидкостная хроматография.

Автор/соавтор более 55 опубликованных работ.

Онучак Людмила Артёмовна – заведующая кафедрой физической химии и хроматографии Самарского государственного университета, доктор химических наук.

Область научных интересов: хроматографический анализ сложных объектов, газовая хроматография, жидкие кристаллы, идентификация неизвестных веществ, разработка композиционных сорбентов для капиллярных колонок.

Автор/соавтор более 200 опубликованных работ.

Арутюнов Юрий Иванович – доцент кафедры физической химии и хроматографии Самарского государственного университета, кандидат технических наук.

Область научных интересов: метрологический контроль качества результатов, хроматографический анализ сложных объектов, газовая хроматография, идентификация неизвестных веществ.

Автор/соавтор более 150 опубликованных работ.

Введение

Одним из требований контроля качества лекарственного растительного сырья является количественное определение биологически активных веществ (БАВ). Наиболее часто для этих целей применяют хроматографические методы, что требует проведения соответствующей пробопод-

готовки. Определение малолетучих полярных БАВ методом газовой хроматографии невозможно без дериватизации [1]. Основным методом определения этих соединений является обращённо-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (ОФ ВЭЖХ); поэтому требуется проведение процедуры экстракции аналитов из растительного сырья.

Отметим, что близкие проблемы возникают и при переработке растительного сырья для извлечения БАВ в промышленных масштабах. Поэтому новые достижения в области экстракции веществ из растительного сырья с целью последующего химического анализа представляют существенный интерес для фармацевтической промышленности, и, наоборот, знания о новых процедурах экстракции, внедряемых в промышленное производство, могут оказаться полезными при разработке методик химического анализа.

Экстракция БАВ – главная, наиболее трудоёмкая и продолжительная стадия промышленной переработки сырья. На большинстве заводов извлечение БАВ ведётся малоэффективными, трудоёмкими и длительными методами, занимающими от 6 до 28 часов для одной партии сырья [2]. Эффективность современного производства лекарственных препаратов неразрывно связана с разработкой и внедрением новых технологических процессов, позволяющих рационально использовать перерабатываемое сырьё.

Сравнительно новым методом экстракции является жидкостная экстракция под давлением (ЖЭД), где в качестве экстрагентов используются как органические растворители, так и вода, находящиеся при этом в субкритическом состоянии. Использование данного метода значительно ускоряет подготовку проб к анализу и находит широкое применение в пищевой, фармацевтической, химической промышленности, а также в эколого-аналитическом контроле [3-5]. Следует также отметить, что применение воды, находящейся в субкритическом состоянии, вместо токсичных органических растворителей соответствует принципам современной «зелёной химии» [6].

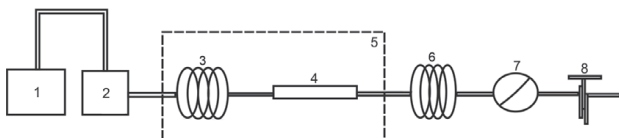


Рис. 1. Схема установки для жидкостной экстракции под давлением: 1 – сосуд с экстрагентом; 2 – насос высокого давления; 3 – капилляр предварительного нагрева экстрагента; 4 – экстрактор; 5 – термостат; 6 – охлаждаемый капилляр; 7 – манометр; 8 – регулятор давления

Одними из наиболее востребованных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний печени различной этиологии являются гепатопротекторы, содержащиеся в лекарственном растении «расторопша пятнистая». Для производства биологически активных добавок и лекарственных препаратов используют зрелые плоды растения, из которых получают экстракты. Химический состав, эффективность лечебного действия, а также качество фармпрепарата на основе лекарственных растений зависят от технологии извлечения и получения биологически активных веществ в виде экстрактов [7]. Следовательно, необходимы методики контроля качества фармпрепаратов по содержанию основных БАВ.

С учётом изложенного, целью данного исследования являлась разработка методики контроля качества растительного сырья «расторопша пятнистая». Методика включает извлечение БАВ различными растворителями и последующее определение аналитов методом ОФ ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Экстракцию БАВ из плодов расторопши пятнистой проводили при условиях, представленных в табл. 1.

Эксперименты по изучению процесса жидкостной экстракции под давлением в динамическом (проточном) режиме проводили с использованием установки, схема которой представлена на рис. 1. В данной установке экстрагент из сосуда 1 подаётся в насос высокого давления 2, обеспечивающий расход F_c в системе от 0.1 до 10.0 см³/мин при давлении P до 40.0 МПа. Из насоса 2 экстрагент поступает в капилляр предварительного нагрева экстрагента 3 и экстрактор 4, помещённые в термостат 5. Экстрактор 4 выполнен в виде колонки из нержавеющей стали длиной 250 мм и внутренним диаметром 10 мм. На выходе из экстрактора 4 установлен капилляр 6, охлаждаемый до температуры $T = 20$ °С. Для контроля давления в системе установлен образцовый манометр 7 и регулятор давления 8.

Для экстракции в проточном режиме брали навеску 11.4 г (насыпной объём экстрактора при зернении лузги 0.1-0.5 мм) измельчённого лекар-

Таблица 1

Условия проведения экстракции БАВ из расторопши пятнистой

Экстрагент	Режим экстракции	Диапазон температур, °С	Давление, МПа
Вода	Статика	100	0.1
Этанол	Статика	100	
Этанол	Динамика	105 – 150	12.5
Субкритическая вода	Динамика	105 – 250	
Вода:этанол (90:10)	Динамика	105, 200	
Вода:этанол (50:50)	Динамика	105	

ственного сырья, заполняли им экстракционную ячейку и устанавливали необходимые температуру, давление, расход элюента в системе. Систему выдерживали в статическом режиме в течение 15 мин, после чего процесс экстракции проводили в динамическом режиме в течение 40-60 мин при расходе подвижной фазы 1-2.5 см³/мин, отбирая фракции по 5 см³ с последующим их анализом методом ОФ ВЭЖХ.

Кроме того, для оценки эффективности экстракции были получены стандартные водные экстракты, приготовленные в соответствии с требованиями фармакопейной статьи [8] и спиртовые экстракты, полученные согласно [9].

Качественный и количественный анализ полученных экстрактов проводили в варианте ОФ ВЭЖХ в изокритическом режиме со спектрофотометрическим детектированием при длине волны $\lambda = 289$ нм. Разделение осуществляли на колонке фирмы Phenomenex (США) (250 мм×4.6 мм) с сорбентом C_{18} ($d_p = 5$ мкм). В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила с 0.01 М водным раствором фосфатного буфера в объёмном соотношении 35:65 (рН = 3).

Результаты и их обсуждение

На рис. 2 - рис. 4 представлены экстракционные кривые силибина, наглядно демонстрирующие процесс динамической экстракции, а также позволяющие оценить время экстракции и объём затраченного экстрагента для максимального извлечения БАВ, что даёт возможность оптимизации процесса экстракции. Аналогичные зависимости были получены и для других изученных компонентов (таксифолина, силикристина и силидианина).

Как видно из данных рисунков, выходные кривые «концентрация-время» имеют вид асимметричного пика с размытым задним фронтом с максимумом на начальных участках экстракционной кривой. Чем выше температура в системе, тем меньший объём экстрагента содержит основную долю извлекаемых аналитов. Экспериментальные данные, полученные при использовании субкритической воды в диапазоне температур 200-250 °С, сопоставимы с результатами, полученными при экстракции этиловым спиртом в диапазоне температур 105-125 °С, а также с экстракцией водно-этанольными смесями в объёмном соотношении 90:10 при $T = 200$ °С и 50:50 при $T = 105$ °С.

В табл. 2 представлены данные по количественному извлечению исследованных БАВ при использовании различных экстрагентов в проточном и статическом режимах при различных температурах.

Как видно из табл. 2, при одинаковом объёме затраченного экстрагента (300 см³) суммарное количество извлекаемых БАВ водно-этанольными смесями и этанолом в статическом и динамическом режимах в интервале температур 105-200 °С сопоставимо. Однако при экстракции в динамическом

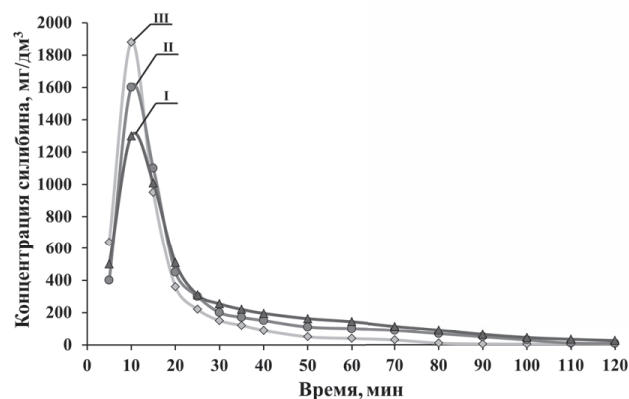


Рис. 2. Экстракционные кривые силибина, полученные в режиме динамической экстракции этанолом при $F_c = 1$ см³/мин, давлении 12.5 МПа и температуре, °С: I – 105, II – 125, III – 150

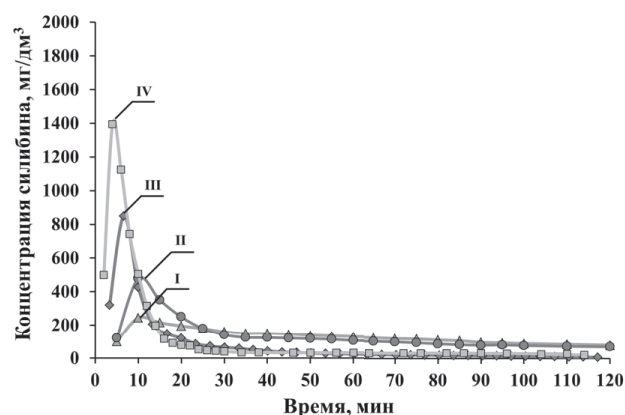


Рис. 3. Экстракционные кривые силибина, полученные в режиме динамической экстракции субкритической водой при давлении 12.5 МПа при $F_c = 1$ см³/мин (температура T , °С: I – 105, II – 150), $F_c = 1.5$ см³/мин и $T = 200$ °С (III), $F_c = 2.5$ см³/мин и $T = 250$ °С (IV)

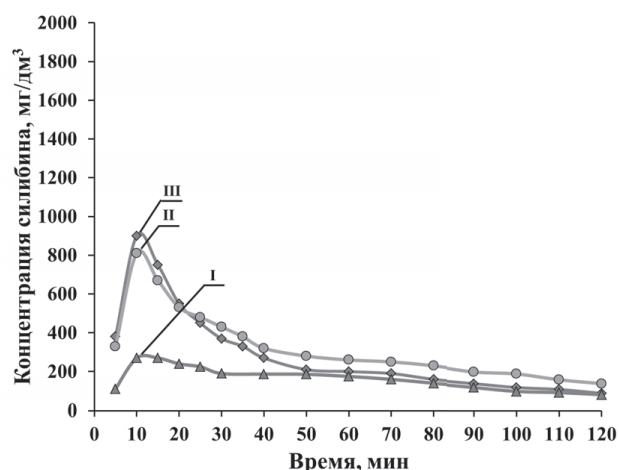


Рис. 4. Экстракционные кривые силибина, полученные в режиме динамической экстракции водно-этанольными смесями при $F_c = 1$ см³/мин, давлении 12.5 МПа в соотношениях: I – 90:10 при $T = 105$ °С; II – 50:50 при $T = 105$ °С; III – 90:10 при $T = 200$ °С

Таблица 2

Количество извлечённых БАВ при различных условиях экстракции при одинаковом объёме экстрагента в расчёте на 1 грамм исходного сырья

Условия экстракции		Количество БАВ (мг/г сырья)				
Экстрагент / режим / P, МПа	T, °C	Таксифолин	Силикристин	Силидианин	Силибин	Сумма БАВ
Этанол / динамика / 12.5	105	4.4	17.6	3.4	5.4	30.8
	125	4.5	17.8	3.7	6.0	32.0
	150	4.7	18.0	3.9	6.9	33.5
Субкритическая вода / динамика / 12.5	105	3.9	17.1	2.4	3.5	26.9
	150	4.2	17.8	3.3	4.7	30.0
	200	3.7	17.6	3.6	5.9	30.8
	250	3.6	17.5	3.7	6.1	30.9
Вода:этанол / динамика / 12.5	105**	4.3	17.4	3.2	5.1	30.0
	105***	4.2	17.2	2.8	4.0	28.2
	200***	4.4	17.7	3.8	6.2	32.1
Традиционная экстракция этанолом*	Кипящая водяная баня	3.5	16.7	4.1	6.8	31.1
Традиционная экстракция водой*	Кипящая водяная баня)	2.5	7.6	1.7	1.6	13.4

Примечания: * – при атмосферном давлении; ** – соотношение вода: этанол = 50:50; *** – соотношение вода: этанол = 90:10.

режиме при температурах 200-250 °C 90 %-ое извлечение БАВ достигается уже в течение 20-30 минут, а при статической экстракции временные затраты увеличиваются в 4-5 раз.

При использовании воды в субкритическом состоянии в качестве экстрагента значительное увеличение доли экстрагируемых веществ наблюдается с ростом температуры. Следует отметить и тот факт, что максимальное извлечение силибина и силидианина при экстракции субкритической водой (ЭСВ) наблюдается при 250 °C, а для таксифолина и силикристина оно достигается при температуре 150 °C. Это связано с тем, что эти вещества менее термически стабильны, чем силибин и силидианин, и они претерпевают частичную деструкцию при температуре выше 150 °C. Экспериментальные данные по ЭСВ, полученные при температуре 250 °C и давлении 12.5 МПа сопоставимы с экстракцией этанолом как в динамических, так и в статических условиях. Добавление 10 % об. этилового спирта в воду в качестве модификатора при проведении жидкостной экстракции под давлением увеличивает количественный выход исследуемых компонентов не более чем на 10%.

Из данных табл. 2 также видно, что суммарное количество извлекаемых компонентов динамическим методом ЭСВ при 105 °C и давлении 12.5 МПа в 2 раза выше по сравнению со статической экстракцией водой при температуре 100 °C при атмосферном давлении. Данный факт можно объяснить изменением физико-химических свойств воды в субкритическом

состоянии [10], а также тем, что в динамическом режиме, благодаря постоянной подаче новых порций чистой воды, обеспечиваются наиболее оптимальные условия по количественному извлечению целевых компонентов из сложной матрицы. Несмотря на то, что эффективность ЭСВ при извлечении таксифолина, силикристина, силидианина и силибина из расторопши пятнистой при 250 °C и давлении 12.5 МПа сопоставима со спиртовой экстракцией, используя метод ЭСВ, можно получать новые биологически доступные формы гепатопротекторных соединений, не содержащие следов токсичных примесей, присутствующих в органическом экстрагенте. Более того, проведение экстракции в динамических условиях позволяет существенно сократить время проведения пробоподготовки по сравнению с традиционной экстракцией на водяной бане – с 1.5-2 часов до 20 минут, а использование субкритической воды позволяет получить водный экстракт, удобный для последующего ОФ ВЭЖХ определения флаволигнанов.

Заключение

Результаты количественного извлечения БАВ показали, что экстракция субкритической водой не уступает экстракции этанолом и водно-этанольными смесями. Таким образом, для контроля качества лекарственного растительного сырья «расторопша пятнистая» целесообразно использовать методику, которая включает подготовку проб с использованием динамической экстракции субкритической водой

при программировании температуры от 150 °С до 250 °С при давлении 12.5 МПа в течение 20 минут с последующим определением БАВ в полученном экстракте методом ОФ ВЭЖХ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии / М.В. Кочетова и [др.] // Успехи химии. 2007. Т. 76, Вып. 1. С. 88-100.
2. Зилфикаров И.Н., Челомбитко В.А., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск: 2007. 243 с.
3. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano. Chemical and functional characterization / Rodriguez-Meizoso I. et al. // J. Pharm. and Biomed. Anal. 2006. V. 41. P. 1560-1565.
4. Herrero M., Cifuentes A. Sub- and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: plants, food by-products, algae and microalgae // Food Chemistry. 2006. V. 98. P. 136-148.
5. Morales-Munoz S., Luque-Garcia J.L., de Castro L.M.D. Pressurized hot water extraction with on-line fluorescence monitoring: A comparison of the static, dynamic, and static-dynamic modes for the removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from environmental solid samples // Analytical Chemistry. 2002. V. 74. P. 4213-4219.
6. Галкин А.А., Лунин В.В. Вода в суб- и сверхкритическом состояниях - универсальная среда для осуществления химических реакций // Успехи химии. 2005. Т. 74, Вып. 1. С. 24.
7. Куркин В.А. Фармакогнозия. // Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 2-е издание. Самара: Изд-во ООО «Форт», 2007. 1239 с.
8. Государственная фармакопея СССР. XI издание. Москва: Медицина, 1991. Выпуск 2. С. 147-148.
9. Куркин В.А., Лебедев А.А., Авдеева Е.В. Способ получения экстракта расторопши пятнистой. Патент РФ №2102999 от 07.09.1996. // Бюл. изобр. № 10 от 27.01.1998.
10. Uematsu M., Franck E.U. Static Dielectric Constant of Water and Steam // J. Phys. Chem. Ref. Data. 1980. V. 9, № 4. P. 1291-1306..

EXTRACTION-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF QUALITY OF MEDICINAL PLANT «MILK THISTLE»

N.V.Nikitichenko^{1,2}, I.A.Platonov^{1,2}, L.A.Onuchak², Yu.I.Arutyunov²

¹ Samara State Aerospace University named after academician S.P. Korolyov (national research university)
443086, Samara, Moskovskoye sh., 34

navinita@mail.ru

²Samara State University
443011, Samar, Ac. Pavlov st., 1

The technique of determining the quality of medicinal plant «Milk Thistle», based on the extraction of biologically active substances by pressured liquid extraction, followed by chromatographic analysis of the extract is developed.

Keywords: biologically active substances, quality control of raw materials, Milk Thistle, pressured liquid extraction, subcritical water, reversed-phase high performance liquid chromatography