

Рекомендована д.ф.н., професором П.Д.Пашневим

УДК 615.322 : 615.451.16 : 54.061 : 543.544.2

ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ЗРІДЖЕНОГАЗОВИХ ЕКСТРАКТАХ ІЗ СУЦВІТЬ ЛИПИ

Д.В.Дем'яненко

Національний фармацевтичний університет

Методом тонкошарової хроматографії досліджено якісний склад фенольних сполук, одержаних із суцвіть липи надкритичним CO₂ та зрідженими фреонами-22, 32, 410А і сумішшю останнього з аміаком. Показано, що фреони-32 та 410А виявляють селективність до середньополярних БАР суцвіть липи, зокрема деяких похідних флавоноїдів, кумаринів та оксикоричних кислот. Фреон-22 екстрагував із вихідної сировини лише незначну кількість глікозидів кумаринів. В аміачно-фреонових витяжках, одержаних зі шроту після попередньої екстракції фреоном-410А, були виявлені похідні кумаринів та оксикоричні кислоти, які відрізнялися від тих, що містилися у фреонових екстрактах. Встановлено також, що надкритичний CO₂ навіть при температурі 60°C та тиску 400 атм не виявив здатності екстрагувати фенольні сполуки із суцвіть липи.

Останнім часом в Україні спостерігаються досить негативні для фармацевтичної галузі тенденції: постійне домінування імпорتنих фітопрепаратів на ринку та майже повне знищення вітчизняного виробництва очищених екстрактів та субстанцій рослинного походження, технології яких були розроблені ще при Радянському Союзі. Натомість більшість із вищезазначених засобів (близько 80%) зараз закуповується в іноземних виробників, про що свідчать офіційні дані стосовно зареєстрованих на цей час фітохімічних лікарських засобів у вигляді вихідних субстанцій [1, 6].

З огляду на це, відновлення української фітохімії є вкрай важливим для розвитку фармацевтичного виробництва в цілому. Очевидно, що цей процес має здійснюватися за двох умов: впровадження у промислове виробництво максимально можливого асортименту лікарської рослинної сировини (ЛРС), принаймні фармакопейної, та застосування нових, удосконалених методів екстрагування ЛРС і очищення витяжок [3, 4].

Яскравим прикладом є перспективність розробки технологій виділення біологічно активних речовин (БАР) із суцвіть липи [1], які внесені до більшості фармакопей розвинених країн, зокрема

до ЕР та ДФУ [5, 11], але при цьому в усьому світі не виробляється жодного стандартизованого препарату з цієї ЛРС.

Згідно з даними [7] сировинна база вищевказаної сировини в Україні є величезною. Так, у 1960 р. було заготовлено близько 300 тонн цієї ЛРС; враховуючи те, що тривалість життя дерева липи становить декілька століть, ці дані можна з достатньою достовірністю екстраполювати й на теперішній час.

Як відомо, основними фармакологічно активними інгредієнтами в суцвіттях липи є ліпофільні сполуки, переважно компоненти ефірних олій та терпеноїди, а також фенольні речовини, які є більш полярними, — флавоноїди, оксикоричні кислоти та похідні кумаринів [9, 16]. Перша група БАР виявляє переважно антимікробний, спазмолітичний та фунгіцидний ефекти [12, 13], друга — седативний, гепатопротекторний та антиоксидантний [10, 14, 17, 18].

Раніше в результаті наших досліджень разом зі співавторами [8] була виявлена досить висока противиразкова дія фенольного комплексу, одержаного спирто-водною екстракцією зі шроту суцвіть липи після попередньої обробки зрідженим дифторхлорметаном (хладоном-22), причому активність зазначеної субстанції помітно перевищувала відповідні показники референс-препаратів альтану та олії обліпихи.

Проте недоліками традиційної спирто-водної екстракції є тривалість у часі, енергоємність, підвищені температури при випарюванні та значна ціна етилового спирту.

Фізико-хімічні властивості зріджених газів дозволяють вважати їх найбільш перспективними екстрагентами рослинних БАР, хоча до теперішнього часу для одержання ліпофільних сполук у промисловості використовувалися лише деякі з них: CO₂, фреони-12 та 22 [2]. Зараз світовою промисловістю виробляється величезний асортимент холодоагентів, зокрема фреонів, які значно відрізняються один від одного полярністю, розчинювальною здатністю та селективністю відносно певних груп БАР.

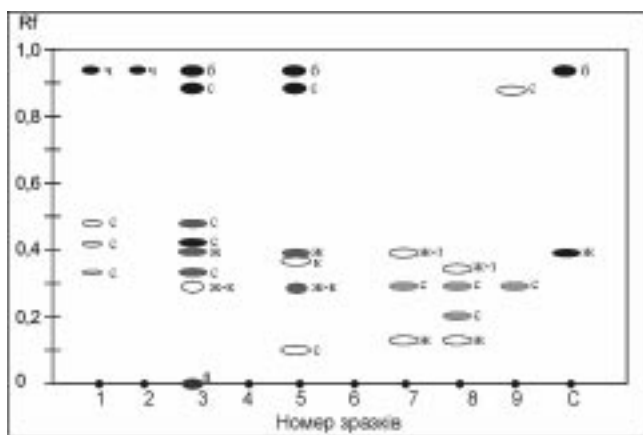


Рис. 1. Схема тонкошарової хроматограми БАР суцвіть липи, одержаних різними зрідженими газами (система А): ступінь заливки плям відповідає інтенсивності їх флуоресценції; кольори флуоресценції позначені таким чином: ч — червоний, с — синій, б — блакитний, ж — жовтий, с-з — синьо-зелений, ж-к — жовто-коричневий, ж-з — жовто-зелений, к — коричневий.

Враховуючи вищевикладене, в даній роботі було досліджено методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) якісний склад екстрактів, одержаних із суцвіть липи різними зрідженими газами і надкритичним CO_2 , з метою виявлення придатності останніх для екстрагування фенольних сполук.

Експериментальна частина

Вихідною сировиною були суцвіття липи серцелистої *Tilia cordata*, заготовлені в Рівненській області у 2008 р. Ступінь їх подрібнення складав 0,5-2,0 мм, вологість — 8,2-8,3%.

Екстрагування докритичними зрідженими газами та їх сумішами здійснювали в НФаУ на створеній нами дослідній установці.

Екстрагування надкритичним CO_2 (НК- CO_2) проводили на дослідно-промисловій установці УЕ-4-400, розробленій ТОВ “Техарм” (м. Львів).

Були одержані наступні зразки: №1 — ліпофільна витяжка із суцвіть липи, екстрагована дифторхлорметаном (фреоном-22); №2 — дифторхлорметанова витяжка зі шроту, одержаного після попередньої екстракції вихідної сировини тетрафторетаном (фреоном-134а); №3 — дифторметанова витяжка (фреоном-32) зі шроту суцвіть липи після одержання зразка №1; №4 — екстракт з вихідної сировини після її мацерації НК- CO_2 при температурі 60°C та тиску 400 атм протягом 120 хв; №5 — екстракт, виділений азеотропною сумішшю пентафторетану і дифторметану (фреоном-410А) зі шроту після одержання зразка №2.

Далі, здобувши зразок №5, шрот, що залишився, екстрагували сумішшю фреону — 410А та рідкого аміаку (1:1 мас.). Після випарювання розчинника кубовий залишок розчиняли у 70% етанолі. Спиртовий розчин переносили у ділільну лійку, розводили водою очищеною до концентрації спирту близько 50% та вичерпно екстрагували гексаном. Органічну фазу фільтрували та випа-

рювали насухо. Одержаний сухий залишок був зразком №7.

Аналогічно проводили послідовну рідинну екстракцію водно-спиртового шару хлороформом, а потім етилацетатом з наступним висушуванням органічних фаз та одержанням зразків №8 та №9 відповідно.

Водно-спиртовий маточник також випарювали та сушили до постійної ваги (зразок №6).

Наважки досліджуваних зразків масою по 50 мг розчиняли в 5,0 мл 70% етанолу, за виключенням екстрактів №1 та 2, для розчинення яких використовували суміш 96% спирту та ацетону (1:1).

Наважки стандартних зразків (С) рутину та кофейної кислоти по 10 мг розчиняли в 1,0 мл 96% етанолу.

По 5 мкл приготованих розчинів екстрактів та стандартних зразків наносили мікропіпеткою на лінію старту ТШХ — пластин “Silufol UV 254” та хроматографували на висоту 12 см у наступних системах розчинників:

- А — етилацетат — мурашина кислота — оцтова кислота — вода (100:11:11:26);
- В — толуол — діоксан — оцтова кислота (90:25:4);
- С — хлороформ — метанол — мурашина кислота (15:3:2).

Після проходження фронту мобільної фази на вищезазначену висоту пластини виймали з камер та сушили у струмі повітря, потім переглядали в УФ-світлі при довжині хвилі 366 нм. Хроматограми також обробляли парами 25% аміаку.

Результати та їх обговорення

Схема тонкошарової хроматограми зразків №1-9 у системі А відображена на рис. 1.

Як видно з одержаних даних, флавоноїдні глікозиди, що виявляються при хроматографуванні в даній системі розчинників, присутні лише в зразках №3 та №5, причому один з них відповідає рутину ($R_f \sim 0,38-0,39$) [16]. Фреон-22 екстрагує із вихідної сировини лише незначну кількість глікозидів кумаринів, які мають R_f в діапазоні 0,2-0,45 [16] (зразок №1). Повна відсутність цих сполук в об'єкті №2 вказує на те, що фреон 134а вилучив деякі з них на попередньому етапі екстракції.

Найбільш селективними до фенольних сполук виявилися фреон 32 та його азеотропна суміш з пентафторетаном (зразки №3 та №5 відповідно). В зазначених екстрактах були знайдені кофейна кислота з $R_f \sim 0,92$, скополетин з $R_f \sim 0,88$, рутин та глікозиди кумаринів, плями яких розташовані в нижній частині хроматограми [16].

Як видно з рис. 1, надкритичний CO_2 навіть при температурі 60°C та тиску 400 атм взагалі не екстрагує фенольні сполуки (зразок №4), хоча за даних умов НК- CO_2 теоретично має набувати достатньої полярності.

В екстрактах, одержаних зі шроту фреоно-аміачною сумішшю, виявлялися похідні кумаринів,

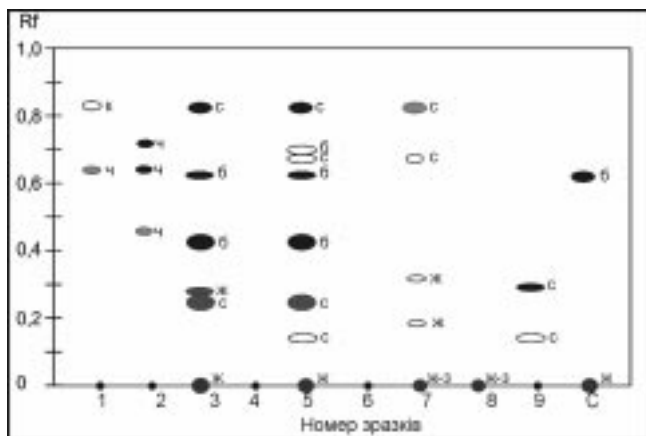


Рис. 2. Схема тонкошарової хроматограми БАР суцвіть липи, одержаних різними зрідженими газами (система В): ступінь заливки плям та кольори флуоресценції — аналогічно рис. 1.

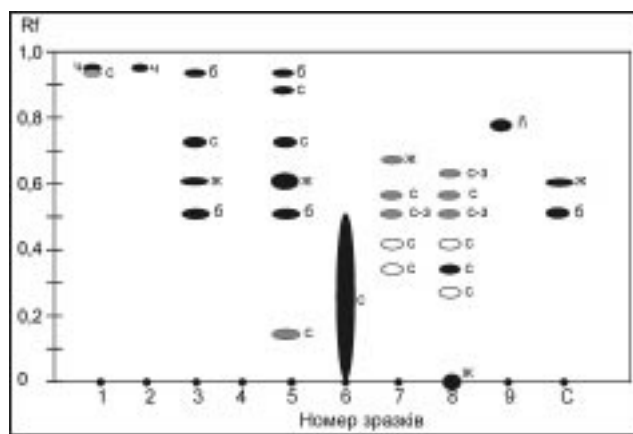


Рис. 3. Схема тонкошарової хроматограми БАР суцвіть липи, одержаних різними зрідженими газами (система С): ступінь заливки плям та кольори флуоресценції — аналогічно рис. 1.

зважаючи на їх розчинність у гексані, хлороформі та етилацетаті (зразки №7, 8, 9). Проте за значенням Rf та/або кольором флуоресценції вони відрізнялися від тих, що екстрагувалися фреонами. Цей факт свідчить про здатність фреоно-аміачних сумішей селективно витягувати сполуки, нерозчинні в інших зріджених газах.

Результати ТШХ-аналізу зразків №1-9 у системі В (рис. 2), яка використовується для розділення малополярних флавоноїдів, у тому числі агліконів [16], показали, що окремі сполуки вказаного класу екстрагувалися фреоном-32 і проявлялися у вигляді плями зі значенням Rf ~0,28 та яскравою жовтою флуоресценцією, яка посилювалася під дією парів аміаку. На лінії старту хроматограм зразків №3 та 5 спостерігалися дуже інтенсивні плями з жовтою флуоресценцією, а у зразків №7 та 8 — із жовто-зеленою. Крім того, на ТШХ екстрактів, одержаних фреонами-32 і 410А, виявлялися до 7 плям, що флуоресціювали відтінками від блакитного до синього та, ймовірно, відповідали оксикумаринам і фенольним кислотам.

Аміачно-фреонова суміш екстрагувала 2 похідних кумаринів, які переходили в гексанову фазу, та 2 фенолокіслоти, що розчинялися в етилацетаті. У дифторхлорметанових витяжках (фреоном-22) виявлялася 1 сполука у вигляді плями зі слабкою коричневою флуоресценцією та Rf ~0,82, яка може відповідати флавоноїдному аглікону.

Експериментальні дані ТШХ-аналізу зразків №1-9 у системі С (рис. 3), яка є придатною для розділення фенольних кислот [15], свідчать про наявність вказаного класу БАР переважно у зразках №3 та 5, на хроматограмах яких виявлялося до 5 плям із синьою та блакитною флуоресценцією, що посилювалася під впливом парів аміаку.

Гексанові та хлороформні витяжки з аміачно-фреонових екстрактів давали та ТШХ-пластинах відповідно 4 і 6 плям із синьою та синьо-зеленою

флуоресценцією, проте за значенням Rf вони відрізнялися від тих, що проявлялися на хроматограмах зразків №3 та 5. Отже, зазначені БАР, ймовірно, відносяться до похідних кумаринів, зважаючи на їх розчинність у неполярних органічних розчинниках.

У результаті ТШХ-аналізу спирто-водної фази, одержаної після очистки аміачно-фреонових екстрактів органічними розчинниками (зразок №6), була виявлена безперервна пляма з дуже інтенсивною синьою флуоресценцією, яка тягнулася від лінії старту до половини довжини пробігу. Вказану хроматографічну поведінку даного зразка можна пояснити присутністю значної кількості фенольних кислот в іонізованій формі, тобто у вигляді амонійних солей, які внаслідок високої полярності мають низьку рухомість на ТШХ-пластинах.

Таким чином, на основі одержаних експериментальних даних можна зробити загальний висновок про перспективність використання фреонів-32, 410А та їх сумішей із аміаком для екстрагування полярних БАР, зокрема фенольних сполук із лікарської сировини.

Екстракти, одержані вищезазначеними розчинниками, підлягали дедалі більш детальному якісному та кількісному аналізу методом вискоєфективної рідинної хроматографії з наступною хромато-мас-спектрометричною детекцією. Результати цих експериментів будуть відображені в наступних публікаціях.

ВИСНОВКИ

1. Методом тонкошарової хроматографії проведено дослідження якісного складу екстрактів, одержаних із суцвіть липи різними зрідженими газами, їх сумішами та надкритичним CO₂.

2. На основі експериментальних даних можна зробити висновок, що фреони-32 та 410А виявляють селективність до середньополярних БАР суцвіть липи, зокрема деяких похідних флавоноїдів, кумаринів та оксикоричних кислот. Фреон-22 экс-

трагував із вихідної сировини лише незначну кількість глікозидів кумаринів.

3. Встановлено, що надкритичний CO₂ навіть при температурі 60°C та тиску 400 атм взагалі не екстрагує фенольні сполуки із суцвіть липи.

4. В ам'ячно-фреонових витяжках, одержаних зі шроту після попередньої екстракції фреоном-410А, були виявлені похідні кумаринів та оксикоричні кислоти, які відрізнялися від тих, що містилися у фреонових екстрактах.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бреусова С.В. Розробка складу та технології сиропу на основі фенольного комплексу із суцвіть липи серцелистої: дис. ... канд. фармац. наук: 15.00.01. — Х., 2009. — 167 с.
2. Ветров П.П., Носовская Т.Д. // *Фармаком.* — 2001. — №2. — С. 1-2.
3. Гарник Т.П., Вихтинская И.Л., Исакова Т.И. // *Фітотерапія в Україні.* — 1998. — №1. — С. 10-15.
4. Георгиевский В.П., Дихтярев С.И., Губин Ю.И. и др. // *Фармаком.* — 1999. — №3/4. — С. 39-43.
5. *Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр".* — 1-е вид., доп.2. — Х.: Рірег, 2008. — 620 с.
6. *Довідник лікарських засобів, зареєстрованих в Україні станом на 01.02.2010 р. [Електронний ресурс].* — Режим доступу: http://www.pharma-center.kiev.ua/site/file_uploads/ua/dovidnik/dfinfo0910.exe.
7. Ивашин Д.С., Катина З.Ф., Рыбачук И.З. и др. *Лекарственные растения Украины.* — К.: Урожай, 1971. — 352 с.
8. Позднякова А.Ю., Куценко Т.О., Дем'яненко Д.В. // *Фармакол. та лікарська токсикол.* — 2009. — Т. 13, №6. — С. 28-31.
9. Barreiro Arcos M.I., Cremaschi G., Werner S. et al. // *Phytother. Res.* — 2006. — Vol. 20. — P. 34-40.
10. Coleta M., Campos M.G., Coirin M.D., Proenca de Cunha A. // *Pharmaco-psychiatry.* — 2001. — Vol. 34, №1. — P. 20-21.
11. *European Pharmacopoeia.* — 5-th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2005. — 1522 p.
12. Fitsiou I., Tzakou O., Hancianu M., Poiata A. // *J. Essential Oil Res.* — 2007. — Vol. 19. — P. 183-185.
13. Guerin J.C., Reveillere H.P. // *Ann. Pharm. Fr.* — 1984. — Vol. 8. — P. 553-559.
14. Matsuda H., Ninomiya K., Shimoda H., Yoshikawa M. // *Bioorg. Med. Chem.* — 2002. — Vol. 10, №1. — P. 707-712.
15. Rastija V., Mornar A., Jasprica J. et al. // *J. Planar Chromatogr.* — 2004. — Vol. 17. — P. 26-31.
16. Wagner H., Bladt S. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas.* — 2-nd ed. — Muenchen, 2001. — 384 p.
17. Wichtl M., Bisset N.G. *Herbal drug and phytopharmaceuticals.* — Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1994. — 572 p.
18. Yildirim A., Mavi A., Oktay M. // *J. Agric. Food Chem.* — 2000. — Vol. 48, №10. — P. 5030-5034.

УДК 615.322 : 615.451.16 : 54.061 : 543.544.2

ИССЛЕДОВАНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В СЖИЖЕНОГАЗОВЫХ ЭКСТРАКТАХ ИЗ СОЦВЕТИЙ ЛИПЫ

Д.В.Демьяненко

Методом тонкослойной хроматографии исследован качественный состав фенольных соединений, полученных из соцветий липы сверхкритическим CO₂ и сжиженными фреонами-22, 32, 410А, а также смесью последнего с аммиаком. Было показано, что фреоны-32 и 410А проявляют селективность к среднеполярным БАВ соцветий липы, в частности, к некоторым производным флавоноидов, кумаринов и оксикоричным кислотам. Фреон-22 экстрагировал из исходного сырья лишь незначительное количество гликозидов кумаринов. В аммиачно-фреоновых извлечениях, полученных из шроты после предварительной экстракции фреоном-410А, были выявлены производные кумаринов и оксикоричные кислоты, которые отличались от тех, что присутствовали во фреоновых экстрактах. Установлено также, что сверхкритический CO₂ даже при температуре 60°C и давлении 400 атм не обладал способностью экстрагировать фенольные соединения из соцветий липы.

UDC 615.322 : 615.451.16 : 54.061 : 543.544.2

STUDY OF THE QUALITATIVE COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN CONDENSED GAS EXTRACTS FROM LINDEN INFLORESCENCES

D.V.Demyanenko

The qualitative composition of phenolic compounds extracted from linden inflorescences with supercritical CO₂, condensed freons — R22, R32, R410A, as well as with the mixture of the latter with ammonia has been studied using the method of thin-layer chromatography. It has been shown that freons R32 and R410A were rather selective to semi-polar biologically active substances of linden inflorescences, in particular, to some derivatives of flavonoids, coumarines and to phenolic acids. Freon R22 extracted only slight amounts of coumarine glycosides from the plant raw material. In freon-ammonia extracts obtained from extraction cake after preliminary extraction with freon R410A the derivatives of coumarines and hydroxycinnamic acids differed from those presented in freon extracts have been revealed. It has been also found that supercritical CO₂ even at 60°C and pressure of 400 bar had no ability to extract phenolic compounds from linden inflorescences.