

УДК 543, 542.6

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЭКСТРАГЕНТАМИ В СУБКРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ ИЗ ЦВЕТКОВ РОМАШКИ АПТЕЧНОЙ (*CHAMOMILLA RECUTITA R.*), ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В САМАРСКОЙ ОБЛАСТИ

**¹Л. В. Павлова*, ¹И. А. Платонов, ²В. А. Куркин, ²П. В. Афанасьева,
¹Е. А. Новикова, ¹И. М. Муханова**

¹Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный национальный исследовательский университет им. академика С.П. Королева», Самара, Россия

²ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, Самара, Россия

*lora-pavlova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.07.17 г.

Методами УФ-спектроскопии, газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и гравиметрии изучены экстракты биологически активных соединений (БАС) из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, полученные с использованием субкритической воды, а также водных растворов этанола различной концентрации при 150 и 200 °C и 5 МПа. Проведена идентификация БАС полученных экстрактов с применением реакционной газовой хроматографии.

Ключевые слова: цветки ромашки аптечной, экстракция, субкритическая вода, 7-метоксикумарин, лютеолин, апигенин, дериватизация.

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения используются в основном для получения экстрактов, эфирных масел, реже в виде измельченного сырья [1]. Ромашка аптечная — хорошо известное растение; ее цветки широко применяются в народной медицине в качестве противовоспалительного, антимикробного и спазмолитического средства, эффект которого обеспечивается комплексом биологически активных соединений (БАС) [1]. В настоящее время экстракты из цветков ромашки аптечной производятся в промышленных масштабах [2]. В качестве экстрагентов используются 1,2-пропиленгликоль, водно-этанольно-глицериновые смеси, а также сверхкритический (СК) CO₂. Наибольшее содержание БАС ромашки аптечной характерно для экстракта, полученного с использованием СК-CO₂ при 250 атм и 50 °C [2]. Применение активно развивающегося в последнее время метода извлечения БАС с помощью воды и водно-этанольных смесей в субкритическом состоянии (при температуре от 100 до 374 °C и повышенном давлении) к цветкам ромашки аптечной позволит расширить спектр лекарственных препаратов на ее основе. Согласно [3] по данным анализа методом тонкослойной хроматографии экстракт ромашки аптечной (*Matricaria recutita / German chamomile*), полученный с исполь-

Извлечение биологически активных соединений из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, экстрагентами в субкритическом состоянии

зованием субкритической воды, по своему составу соответствует метанольному экстракту из данного растительного сырья, следовательно, эти технологии имеют сопоставимую эффективность извлечения БАС. При этом безопасность субкритических водных экстрактов несопоставимо выше по сравнению с метанольными. По имеющимся данным, компонентный состав БАС растения зависит от климатических условий произрастания [4, 5].

Цель данной работы заключалась в оценке эффективности извлечения БАС цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, водой и водно-этанольными смесями в субкритическом состоянии, а также в проведении качественного и количественного анализа полученных экстрактов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовались цветки ромашки аптечной, выращенной в г. Самаре в Ботаническом саду.

Приготовление экстрактов

В работе проводилось сравнение эффективности извлечения БАС цветков ромашки аптечной традиционными способами согласно Государственной фармакопее XI [6] и при экстракции водой и водно-этанольными смесями в субкритических условиях (таблица 1). Соотношение «сырье : экстрагент» во всех случаях было одинаковым: $1,30 \pm 0,05$ г сухого растительного сырья на 55 мл экстрагента. Влажность сырья, определенная гравиметрическим методом (сушка до постоянного веса при 105 ± 2 °C), составляла 5 %.

Приготовление отвара (экстракция водой) осуществлялось следующим образом: цветки ромашки аптечной помещали в термостойкий стеклянный стакан, добавляли 55 мл горячей дистиллированной воды, накрывали крышкой и нагревали на кипящей водяной бане при температуре 95 °C и давлении 0,1 МПа в течение 15 мин; затем в течение 50 мин охлаждали до комнатной температуры и отфильтровывали. Полученный экстракт доводили дистиллированной водой до объема 55 мл.

Спиртовые настойки ромашки аптечной получали следующим образом. Образец цветков ромашки аптечной настаивали при 25 ± 5 °C и атмосферном давлении

Таблица 1

Условия проведения экстракции БАС из цветков ромашки аптечной

Экстрагент	Режим экстрагирования	Температуры экстракции, °C	Давление, МПа	Условное обозначение экстракта
Вода	Статический	95	0,1	ЭВ 95 °C
Вода	Динамический	150, 200	5	ЭДВ 150, 200 °C
Вода:этанол = 50:50*	Статический	25	0,1	ЭЭ 50 % 25 °C
Вода:этанол = 30:70*	Статический	25	0,1	ЭЭ 70 % 25 °C
Вода:этанол = 90:10*	Динамический	150, 200	5	ЭДЭ 10 % 150, 200 °C
Вода:этанол = 50:50*	Динамический	150, 200	5	ЭДЭ 50 % 150, 200 °C
Вода:этанол = 30:70*	Динамический	150, 200	5	ЭДЭ 70 % 150, 200 °C

* Соотношение компонентов в составе экстрагента дано в % об.

в статическом режиме с периодической заменой 1 раз в 2 дня полученного экстракта на новую порцию экстрагента (50 % и 70 % раствор этанола в воде; здесь и далее указаны объемные концентрации). Объединенные порции экстрактов отстаивали при температуре 7 ± 2 °С до получения прозрачной жидкости в течение 2 суток, затем фильтровали. Объем экстракта составил 55 мл.

Экстракция в субкритических условиях проводилась на установке, представленной в публикации [7]. Для заполнения экстракционного сосуда навеску растворительного сырья с размером частиц 0,5 мм [8, 9] смешивали с гранулами карбида кремния размером 2×3 мм в соотношении 1 : 1 по объему. Экстрактор помещали в термостат, подавали в систему экстрагент и герметизировали после заполнения. Систему выдерживали в статическом режиме при $14,0 \pm 0,1$ МПа в течение 15 мин для опрессовки системы. Затем систему разгерметизировали и устанавливали температуру 150 или 200 °С с точностью 1 °С и давление $5,0 \pm 0,1$ МПа. Процесс экстракции проводили в динамическом режиме при скорости потока экстрагента 1,7 мл/мин в течение 40 мин. Экстракт отбирали фракциями по 5 мл.

Анализ экстрактов

Для исследования полученных экстрактов методом УФ-спектроскопии использовался спектрофотометр СФ-46. Спектр снимался в диапазоне длин волн 190—700 нм. Пробы готовились следующим образом: 20 мкл полученных экстрактов разводили в 10 мл 70 % раствора этанола в воде.

Анализ экстрактов методом ВЭЖХ проводили на хроматографе Biotronik со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 190$ —700 нм; детектирование осуществляли на длине волны 340 нм [10]). Разделение проводили с использованием колонки Luna C 18 («Phenomenex», США) $250\text{ mm} \times 3\text{ mm} \times 5\text{ мкм}$. В качестве подвижной фазы использовали смесь ацетонитрила (элюент А) и 0,01 М фосфатного буферного раствора pH = 3 (элюент Б). Для его приготовления 100 мл 0,1 М буферного раствора разбавляли водой до объема 1000 мл и добавляли концентрированную ортофосфорную кислоту до достижения pH = 3. Исходный 0,1 М фосфатный буферный раствор готовили растворением 13,8 г NaH₂PO₄ · H₂O в 900 мл бидистилированной воды, раствор тщательно перемешивали и доводили до объема 1000 мл.

Готовую подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане.

Режим элюирования — градиентный, трехступенчатый: элюент А 20 % — 27 мин, подъем до 40 % за 7 мин; А 40 % — 21 мин, подъем до 60 % за 7 мин; А 60 % — 30 мин.

Анализ экстрактов методом ГХ-МС проводили на газовом хроматографе Agilent 7890 GC, совмещенном с масс-селективным детектором с ионизацией электронным ударом 5975 С производства «Agilent Technologies». Разделение осуществляли на кварцевой капиллярной колонке с неподвижной фазой на основе сополимера 5 % дифенила и 95 % диметилсилоксана HP-5MS $30\text{ m} \times 0,25\text{ m} \times 0,25\text{ мкм}$ фирмы «Agilent». Режим анализа методом ГХ-МС выбирался в зависимости от типа пробы:

— анализ экстрактов; температура термостата колонок: изотерма 40 °С в течение 5 мин, нагрев до 80 °С со скоростью 2 °С/мин, нагрев до 150 °С со скоростью 7 °С/мин, изотерма 5 мин, нагрев до 280 °С со скоростью 10 °С/мин, изотерма 5 мин; температура испарителя 270 °С; поток газа-носителя 1 мл/мин; сброс 1 : 20; объем вводимой жидкой пробы 1 мкл; задержка на выход растворителя 5 мин; диапазон сканирования 45—500 а.е.м.;

— анализ экстрактов после дериватизации; температура термостата колонок: изотерма 50 °С в течение 5 мин, нагрев до 100 °С со скоростью 15 °С/мин, изотерма 1 мин,

Извлечение биологически активных соединений из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, экстрагентами в субкритическом состоянии

нагрев до 300 °С со скоростью 8 °С/мин, изотерма 20 мин; температура испарителя 280 °С; поток газа-носителя 1,2 мл/мин; сброс 1 : 20; объем вводимой жидкой пробы 1 мкл; задержка на выход растворителя 3 мин; диапазон сканирования 45—650 а.е.м.

В обоих случаях температуры источника ионов, квадруполя и переходной камеры были 150, 230 и 280 °С соответственно. Идентификация веществ осуществлялась путем сравнения полученных масс-спектров с библиотечными спектрами WILEY 8 и NIST 11, а также по полученным индексам удерживания.

Экстракция хлороформом: в пробирку со шлифом помещали 3 мл экстракта, добавляли 0,2 мл концентрированной соляной кислоты до рН = 3 и 2 мл хлороформа и встряхивали в течение 5 мин. Полученный экстракт отделяли в делильной воронке. Оставшийся субкритический экстракт ромашки аптечной доводили 5 М раствором NaOH до рН = 8. Затем проводили дополнительную экстракцию 2 мл хлороформа. Хлороформные экстракты высушивали раздельно безводным Na₂SO₄, упаривали досуха и проводили дериватизацию N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамидом (БСТФА) по методике, описанной в работе [11].

Дериватизация [11]: к сухому остатку хлороформных экстрактов добавляли 40 мкл дериватизирующего агента — БСТФА («Chromatographie Service GmbH», Germany), а затем 40 мкл сухого ацетонитрила. Флакон герметично укупоривали и помещали в термостат при 80 °С на 30 мин. После охлаждения 1 мкл полученной смеси вводили в испаритель хроматомасс-спектрометра.

Определение сухого остатка проводили гравиметрическим методом: выпаривали каждую фракцию полученных экстрактов (5 мл) в выпарительных чашках на водяной бане до сухого остатка, далее высушивали чашки с упаренным экстрактом до постоянной массы при 105 ± 2 °С. Абсолютное содержание сухого остатка, мг, рассчитывали как сумму весов всех фракций.

Относительное количество сухого остатка, %, рассчитывали по формуле

$$\frac{\sum_{i=1}^n m_i}{m_{pc}} \cdot 100,$$

где m_i — масса сухого остатка в каждой фракции, г; m_{pc} — масса растительного сырья, г; n — число фракций.

Концентрации компонентов рассчитывали по уравнениям аппроксимации, полученным при построении градуировочной зависимости методом абсолютной градуировки с использованием чистых веществ, любезно предоставленных профессором В.А. Куркиным (кафедра фармакогнозии с ботаникой СамГМУ).

Общий выход БАС, мг, в процессе экстракции рассчитывали по формуле

$$5 \cdot \sum_{i=1}^n C_i,$$

где C_i — концентрация БАС в каждой фракции, рассчитанная по уравнению аппроксимации, мг/мл; 5 — объем каждой фракции, мл.

Массу извлекаемых летучих органических соединений (ЛОС) (в мг на 1 г растительного сырья) определяли по формуле

$$a = \frac{5 \cdot \sum_{i=1}^n C_i}{m_{pc}}.$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Экстракты цветков ромашки аптечной, приготовленные традиционными способами (ЭВ 95 °C и ЭЭ 50 %, 70 % 25 °C)*, имели бледно-желтый цвет и характерный запах ромашки.

Внешний вид экстрактов цветков ромашки аптечной, полученных в субкритических условиях, различался в зависимости от типа экстрагента и условий проведения процесса извлечения (рис. 1, см. цв. вкладку). Первые две фракции экстрактов, полученных в среде субкритической воды в динамическом режиме, были прозрачные, а последующие — мутные. Мутность объясняется образованием коллоидных растворов при переходе полученных экстрактов из субкритических в нормальные условия, когда вещества, не растворимые в воде в нормальных условиях, образуют коллоидные частицы.

В ЭДЭ** 70 % 150, 200 °C наблюдается взвесь зеленого цвета. Физическое состояние экстрактов ЭДЭ 50 % 150, 200 °C изменяется в ходе процесса: после пропускания через сырье 10 мл экстрагента они желеобразные, далее после увеличения объема экстрагента до 25 мл — жидкое.

Оценка эффективности экстракции проводилась по выходу сухого остатка, числу и интенсивности зон поглощения на УФ-спектре, а также по числу и концентрации компонентов в полученных экстрактах при анализе методами ГХ-МС и ВЭЖХ-УФ.

В таблице 2 представлены данные об абсолютном и относительном содержании сухого остатка в полученных экстрактах, из которых видно, что на количество

Таблица 2

Содержание сухого остатка в экстрактах цветков ромашки аптечной и выход лютеолина и апигенина в полученных экстрактах

Экстрагент	Абсолютное содержание сухого остатка, г	Относительное содержание сухого остатка, %	Масса извлеченных БАС, мг	
			Лютеолин	Апигенин
ЭДВ 150 °C	0,60±0,01	45	2,0	0,7
ЭДВ 200 °C	0,77±0,02	58	2,4	1,1
ЭДЭ 10 % 150 °C	0,70±0,02	53	1,4	1,4
ЭДЭ 10 % 200 °C	1,05±0,03	78	2,3	2,3
ЭДЭ 50 % 150 °C	0,89±0,02	67	2,2	1,1
ЭДЭ 50 % 200 °C	1,02±0,03	76	2,0	0,5
ЭДЭ 70 % 150 °C	0,75±0,02	56	1,8	0,2
ЭДЭ 70 % 200 °C	1,01±0,03	76	1,6	0,4
ЭВ 95 °C	0,28±0,01	21	0,01	0,01
ЭЭ 50 % 25 °C	0,43±0,01	32	0,02	0,01
ЭЭ 70 % 25 °C	0,42±0,01	32	0,03	0,004

* ЭВ — экстракт водный; ЭЭ — экстракт этанольный.

** ЭДЭ — экстракция докритическим этанолом.

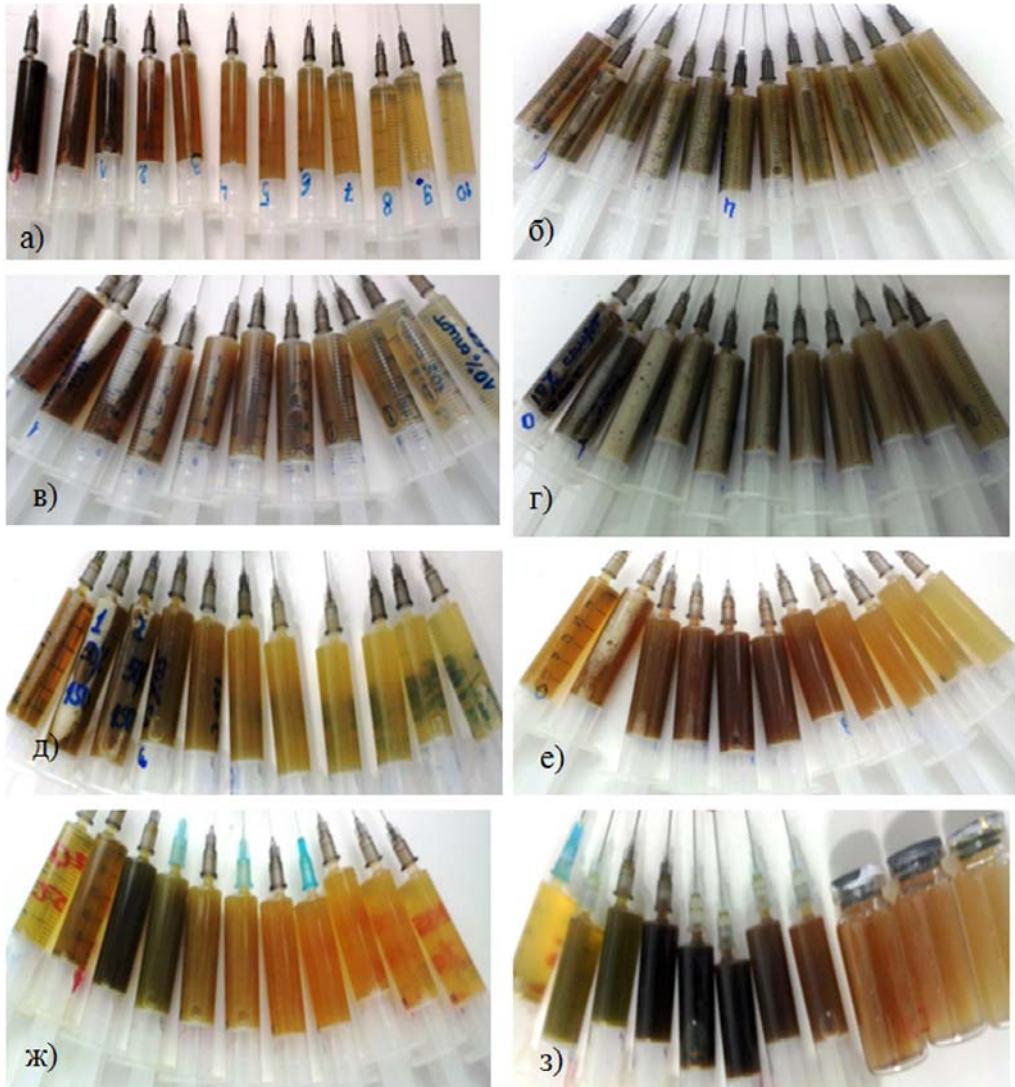


Рис. 1. Внешний вид экстрактов цветков ромашки аптечной:

а — ЭДВ 150 °C; *б* — ЭДВ 200 °C; *в* — ЭДЭ 10 % 150 °C; *г* — ЭДЭ 10 % 200 °C; *д* — ЭДЭ 50 % 150 °C; *е* — ЭДЭ 50 % 200 °C; *ж* — ЭДЭ 70 % 150 °C; *з* — ЭДЭ 70 % 200 °C

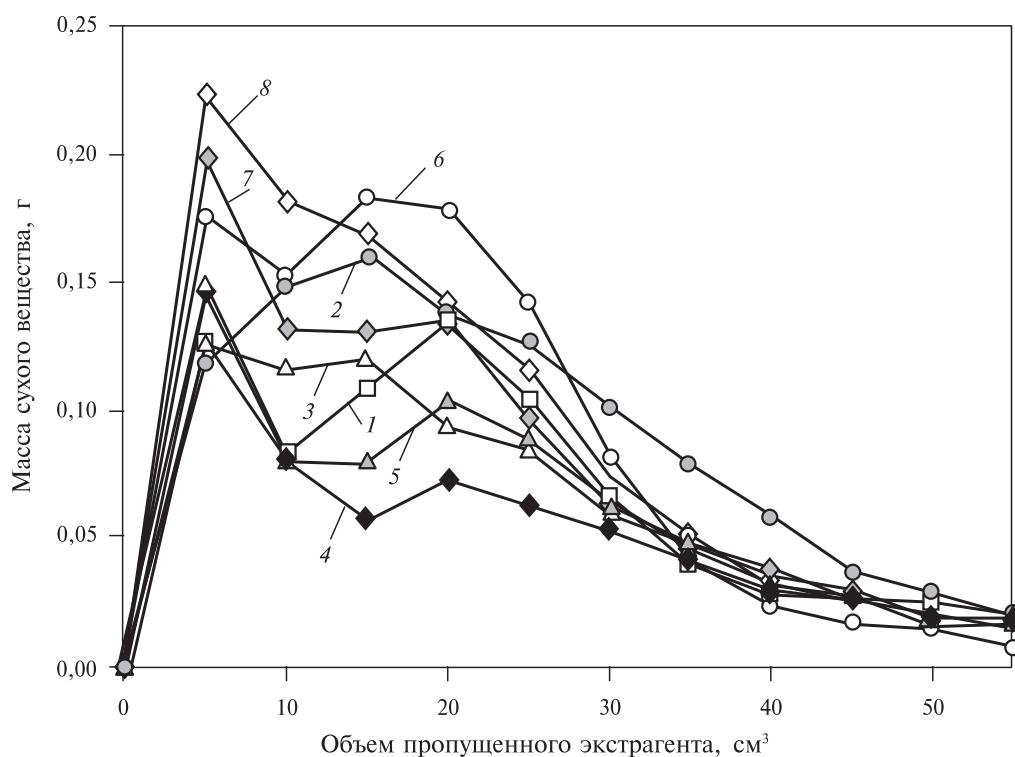


Рис. 2. Кривые извлечения нелетучих БАС:
1 – ЭДВ 200 °C; 2 – ЭДЭ 70 % 200 °C; 3 – ЭДЭ 70 % 150 °C; 4 – ЭДВ 150 °C; 5 – ЭДЭ 10 % 150 °C;
6 – ЭДЭ 50 % 200 °C; 7 – ЭДЭ 50 % 150 °C; 8 – ЭДЭ 10 % 200 °C

извлекаемых нелетучих веществ оказывают существенное влияние температура и тип экстрагента. С ростом температуры наблюдается увеличение доли нелетучих БАС для всех экстрактов. За счет того, что в субкритических условиях вода меняет свои физико-химические свойства, ЭДВ 200 °C сопоставим по количеству извлекаемых нелетучих БАС с ЭДЭ 50 %, 70 % 150 °C. Максимальное извлечение нелетучих БАС из цветков ромашки аптечной наблюдается при экстрагировании 10 % раствором этанола при 200 °C, а дальнейшее увеличение концентрации этанола в экстрагенте практически не влияет на общее количество извлекаемых БАС (см. таблицу 2). Определение доли извлекаемых нелетучих веществ от общей массы сырья показало, что при субкритической экстракции она составляет до 80 % массы сырья, загруженного в экстрактор; при традиционных видах экстракции извлекается только 32 % его массы. Такая разница говорит о том, что при повышенных температуре и давлении, вероятно, разрушаются клеточные структуры, удерживающие вещества при нормальных условиях.

Сравнение результатов анализа сухого остатка каждой фракции полученных экстрактов (рис. 2) показало, что практическое полное извлечение нелетучих БАС наблюдается уже после прохождения 50 мл экстрагента. Этот факт показывает возможность существенного сокращения объема экстрагента, необходимого для извлечения БАС при данной технологии, и, как следствие, времени экстракции. Наличие двух максимумов на динамических кривых говорит о том, что извлече-

*ЭДВ – Экстракт докритической водой.

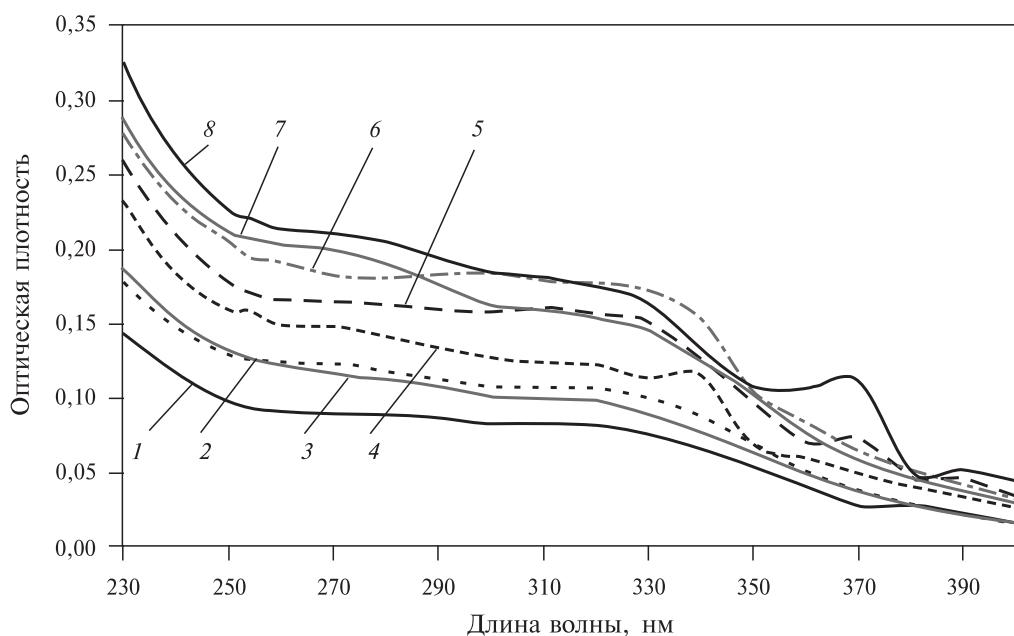


Рис. 3. УФ-спектры экстрактов цветков ромашки аптечной:
1 — ЭДВ 150 °C; 2 — ЭДЭ 10 % 150 °C; 3 — ЭДВ 200 °C; 4 — ЭДЭ 70 % 200 °C; 5 — ЭДЭ 50 % 150 °C;
6 — ЭДЭ 70 % 150 °C; 7 — ЭДЭ 50 % 200 °C; 8 — ЭЭ 10 % 200 °C

ние веществ из матрицы протекает неравномерно. Вероятно, это связано с изменением качественного состава извлекаемых БАС в процессе экстракции.

УФ-спектры полученных экстрактов (рис. 3) имеют характерные для растительных экстрактов зоны поглощения при 254, 280, 340, 370, 390 нм [12, 13]. Поглощение в области 370 и 390 нм наблюдается только для экстрактов, полученных с помощью 50 % раствора этанола в воде, а поглощение в области 340 нм — только для экстрактов, полученных с помощью 70 % раствора этанола в воде. Поглощение в этой области соответствует различным формам кумарина: основной — при 340 нм и окисленной — при 370 нм [14]. Поглощение в области 250—290 нм свидетельствует о присутствии соединений ароматического ряда, в области 200 нм — пятичленных лактонов и фтороглюциновых производных ароматических соединений. А широкие полосы поглощения с максимумами в области 300—350 нм являются характерными для различных групп флавоноидов [12]. УФ-спектры ЭДВ 150 °C, ЭДВ 200 °C и ЭДЭ 10 % 150 °C не отличаются специфичностью. Наиболее интенсивное поглощение наблюдается для ЭЭ 50 % 200 °C.

Для оценки эффективности извлечения БАС ромашки был проведен анализ полученных экстрактов методом ВЭЖХ. Исходя из данных УФ-спектроскопии, наиболее интенсивное поглощение происходит при длинах волн 254, 330—340 нм. Учитывая специфичность поглощения экстрактов ромашки аптечной в области 330—340 нм, а также литературные данные [10], детектирование осуществлялось при длине волны 340 нм. На рис. 4 представлена хроматограмма, полученная при ВЭЖХ анализе ЭДВ 200 °C. Хроматограммы полученных субкритических экстрактов, как и УФ-спектры, демонстрируют примерное совпадение компонентного состава нелетучих БАС экстрактов цветков ромашки аптечной. При анализе методом ВЭЖХ экстрактов, полученных традиционными способами, наблюдается зна-

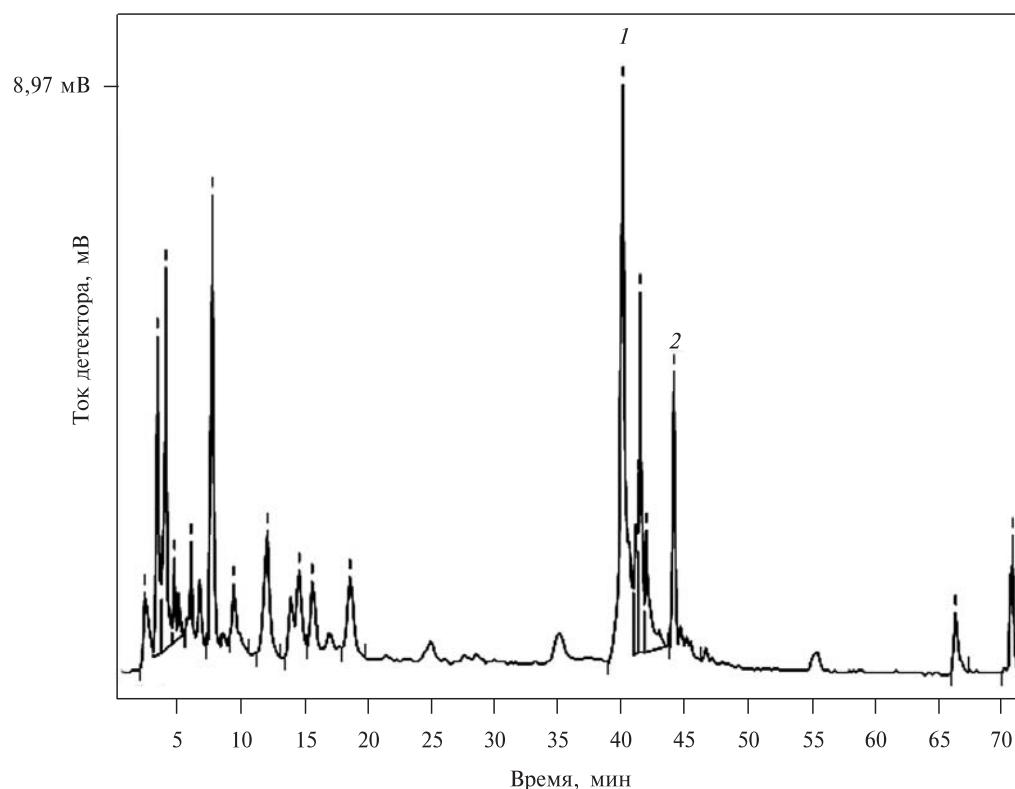


Рис. 4. Хроматограмма, полученная при ВЭЖХ анализе ЭДВ 200 °C (пик 1 — лютеолин, пик 2 — апигенин)

чительно меньшее число детектируемых компонентов, а также низкая интенсивность пиков, что говорит о меньшей эффективности извлечения БАС.

Обзор литературных источников показал, что характерными соединениями цветков ромашки аптечной являются кверцетин, рутин, а также лютеолин, апигенин и их гликозиды [1, 10, 15—17]. ВЭЖХ анализ экстрактов ромашки аптечной с добавлением стандартных растворов кверцетина и рутина выявил отсутствие данных веществ во всех видах полученных экстрактов. Идентификация лютеолина и апигенина проводилась также методом добавки раствора стандартного образца к пробе.

Количественный анализ лютеолина и апигенина, проведенный методом абсолютной градуировки, показал, что извлечение лютеолина и апигенина традиционными методами на два порядка ниже, чем при повышенных температуре и давлении. Содержание лютеолина максимально в ЭДВ 200 °C, апигенина — в ЭДЭ 10 % 200 °C (таблица 2). Кроме этого, из представленных данных видно, что температура при повышенном давлении является лишь фактором изменения свойств растворителя, но ее рост не приводит к деструкции компонентов. При использовании субкритической воды и 10 % раствора этанола в воде в качестве экстрагентов при повышении температуры экстракции со 150 до 200 °C количество извлекаемых лютеолина и апигенина увеличивается, в то время как при использовании в качестве экстрагента 50 % и 70 % водно-этанольной смеси прослеживается обратная тенденция. Помимо этого, нужно отметить, что количество извлекаемого лютеолина при добавлении в воду 10 % этанола падает при 150 °C, но повышается

при 200 °C. Для апигенина этой зависимости не наблюдается, и при модификации воды 10 % этанола извлечение увеличивается. При экстракции 70 % раствором этанола в воде при повышенных температуре и давлении с увеличением температуры количество извлекаемого лютеолина уменьшается, а апигенина увеличивается. Все это говорит о сильном влиянии на извлечение БАС ромашки свойств растворителя, изменяющихся при повышенных температурах и давлении и при модификации этанолом.

Исходя из данных таблицы 2, наилучшим экстрагентом для одновременного извлечения и лютеолина, и апигенина является 10 % раствор этанола в воде при температуре 200 °C, при этом лютеолин извлекается на 95 % от максимального содержания в ЭДВ 200 °C.

Для изучения качественного и количественного состава ЛОС полученные экстракты были проанализированы методом ГХ-МС. На рис. 5 представлены фрагменты хроматограмм полученных экстрактов, по которым видно, что компонентный состав экстрактов практически идентичен, наблюдается отличие только в интенсивности пиков компонентов в разных экстрактах. При экстракции при

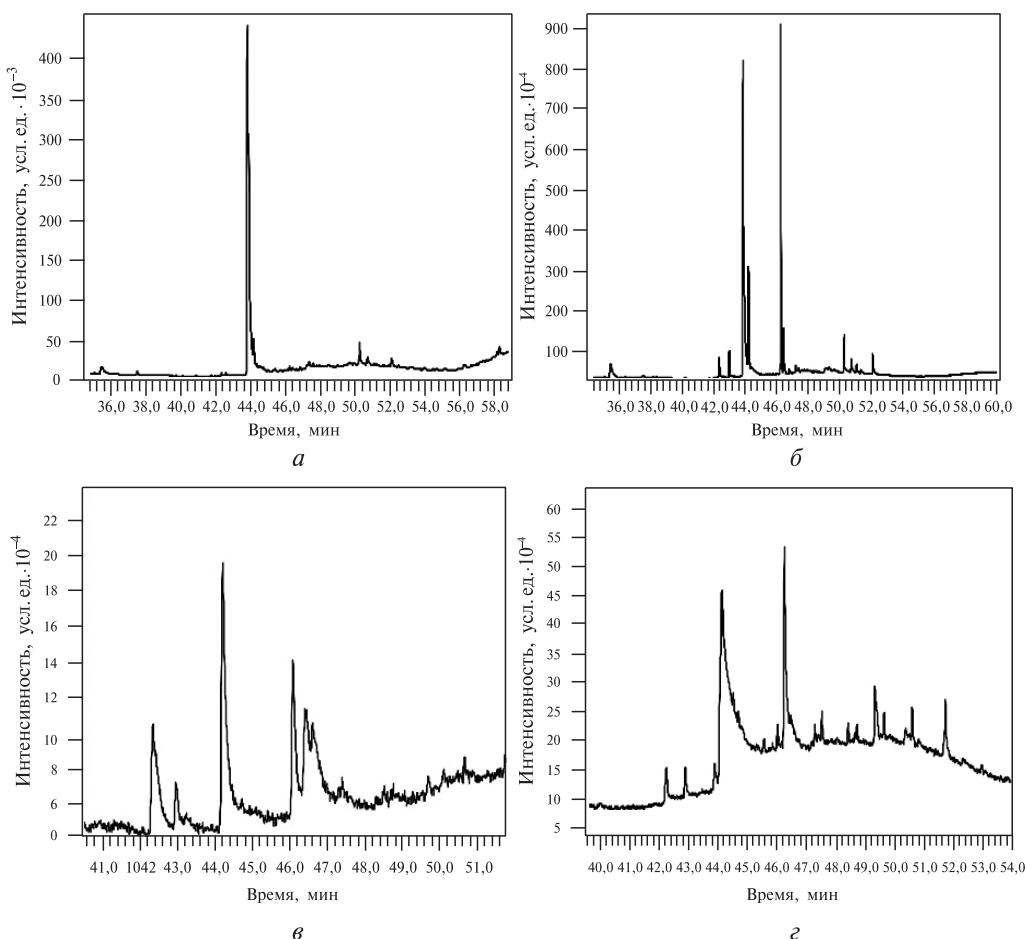


Рис. 5. ГХ-МС хроматограммы экстрактов цветков ромашки аптечной:

a – ЭДВ 150 °C; *б* – ЭЭ 50 % 150 °C; *в* – ЭВ 95 °C; *г* – ЭЭ 50 % 25 °C

Извлечение биологически активных соединений из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, экстрагентами в субкритическом состоянии

повышенных давления и температуре наблюдаются более интенсивные пики, а также извлекается большее число компонентов, чем при традиционных способах экстракции. На хроматограммах экстрактов (рис. 5) наиболее интенсивные пики соответствуют 7-метоксикумарину (айапанину), хамазулену и бисаболол оксиду А.

Идентификация компонентов полученных экстрактов цветков ромашки аптечной являлась одной из основных задач эксперимента, поскольку качественный состав (см. таблицу 3) определяет фармакологические свойства экстрактов. Повышение температуры экстракции незначительно влияет на качественный состав, а модификация воды 50 и 70 % этанола увеличивает число извлекаемых ЛОС. Такие соединения как стигмастерол, β -ситостерол, β -амирин, бетулин и 3 β -О-циннамоил лупеол появляются в ЭЭ 50 % 150 °C, ЭЭ 50 % 200 °C, ЭЭ 70 % 150 °C, ЭЭ 70 % 200 °C, β -фарнезен встречается только в ЭЭ 10 % 200 °C, ЭЭ 50 % 150 °C, ЭЭ 50 % 200 °C, ЭЭ 70 % 150 °C, ЭЭ 70 % 200 °C, а гермакрены D и B — только в экстрактах, полученных с помощью 50 % водно-этанольной смеси при повышенных температуре и давлении.

Количественный анализ основных ЛОС полученных экстрактов показал, что существенное влияние на извлечение целевых компонентов оказывает содержание этанола в экстрагенте. При этом содержание компонентов в ЭДВ сопоставимо с ЭЭ 50, 70 % 25 °C за счет изменения свойств воды при повышенных температуре и давлении. Также обнаружено существенное влияние температуры на выход ЛОС ромашки аптечной (таблица 4). При экстракции водой и 50 и 70 % водно-этанольными растворами при повышенных температуре и давлении количество извлекаемых ЛОС существенно уменьшается с ростом температуры со 150 до 200 °C. В работе [18] говорится о термодеструкции ЛОС ромашки аптечной при проведении экстракции при повышенных температуре и давлении, и оптимальной температурой процесса выбрана температура 150 °C; однако в этой работе в качестве экстрагента использовалась только субкритическая вода. Поскольку при использовании в качестве экстрагента 10 % водно-этанольной смеси зависимость приобретает обратный характер и количество извлекаемых ЛОС увеличивается при 200 °C, уменьшение извлечения ЛОС цветков ромашки аптечной при повышении температуры процесса до 200 °C является скорее следствием изменения свойств растворителя, чем результатом деструкции при повышенной температуре.

Динамический процесс извлечения БАС из растительного сырья позволяет регулировать компонентный состав экстрактов. Изучение динамики извлечения летучих и нелетучих компонентов экстрактов ромашки аптечной показало, что максимум содержания в докритических экстрактах веществ, по которым проводился количественный анализ (7-метоксикумарин, хамазулен, бисаболол оксид А, лютеолин и апигенин), детектируется после прохождения 5—10 мл экстрагента в зависимости от его типа. Однако оценка площадей пиков матрикарина, тритерпеновых сапонинов (β -амирин, бетулин и 3 β -O-циннамоил лупеол), фитостеринов (стигмастерол, β -ситостерол), а также ряда не идентифицированных нелетучих компонентов показала, что данные компоненты отсутствуют в первых 5 мл получаемого экстракта, а максимум их извлечения приходится на период прохождения 20—25 мл экстрагента. Практически полное извлечение этих соединений наблюдается после прохождения 30 мл экстрагента, т. е. на 18 минуте процесса динамической экстракции при повышенных температуре и давлении, тогда как извлечение биологически активных соединений традиционными способами занимает от нескольких часов до нескольких дней.

Таблица 3

ЛОС, содержащиеся в экстрактах цветков ромашки аптечной

Время удерживания	Идентифицированный компонент экстракта цветков ромашки аптечной	Присутствие ЛОС в экстрактах									
		ЭДВ 150 °	ЭДВ 200 °C	ЭДЭ 150 °C	ЭДЭ 200 °C	ЭДЭ 150 °C	ЭДЭ 200 °C	ЭДЭ 150 °C	ЭДЭ 200 °C	ЭВ 95 °C	ЭВ 25 °C
36.19	кумарин	—	—	—	+	—	—	—	—	—	—
36.27	β-фарнезен	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—
36.99	гермакрен D	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
37.44	гермакрен В	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—
42.27	бисаболол оксид В	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42.92	бисаболол оксид	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
43.86	7-метоксикумарин	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
43.89	хамазулен	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+
44.16	бисаболол оксид А	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46.26	ен-ин-дициклоэфир	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
46.44	ен-ин-дициклоэфир - изомер	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
47.21	гексадекановая кислота	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—
47.55	этилпексадеканоат	—	—	—	+	+	+	—	—	+	—
48.86	фитол	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
49.12	9,12-октадекандиеновая кислота	—	—	—	—	+	—	—	—	—	—

Окончание таблицы 3

Время удерживания	Идентифицированный компонент экстракта цветков ромашки аптечной	Присутствие ЛОС в экстрактах										
		ЭДВ 150 °	ЭДВ 200 °C	ЭДЭ 10 % 150 °C	ЭДЭ 50 % 200 °C	ЭДЭ 50 % 150 °C	ЭДЭ 70 % 200 °C	ЭДЭ 70 % 150 °C	ЭВ 95 °C	ЭВ 25 °C	ЭЭ 50 % 25 °C	ЭЭ 70 % 25 °C
49.35	этилоктадекандиеноат	—	—	—	+	+	+	+	—	+	+	+
49.64	этилоктадеканоат	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—
50.36	2(1Н)октагидро-4а- фенилнафталенон	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+
52.22	матрикарин	+	—	—	+	+	+	—	—	—	—	+
65.73	стигмастерол	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—
67.25	β-ситостерол	—	—	—	+	+	+	—	—	—	—	—
68.15	β-амирин	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
72.35	бетулин	—	—	—	—	+	+	—	—	—	—	—
72.77	3β-О-циннамоил лупенол	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—

Таблица 4

Масса ЛОС, извлекаемых из цветков ромашки аптечной

ЛОС	Содержание ЛОС, мг/г										
	ЭДВ 150 °C	ЭДВ 200 °C	ЭЭ 10 % 150 °C	ЭЭ 10 % 200 °C	ЭЭ 50 % 150 °C	ЭЭ 50 % 200 °C	ЭЭ 70 % 150 °C	ЭЭ 70 % 200 °C	ЭВ 95 °C	ЭЭ 50 % 25 °C	ЭЭ 70 % 25 °C
хамазулен	0,16	0,06	0,08	0,16	0,23	0,17	0,16	0,19	—	0,14	0,12
бисаболол оксид А	0,18	0,07	0,10	0,14	0,29	0,22	0,26	0,20	0,07	0,12	0,11
7- метоксикумарин	2,02	0,75	0,80	1,80	3,00	2,40	3,80	3,20	—	0,80	1,80

Для идентификации нелетучих БАС методом ГХ-МС была проведена дериватизация сухих остатков хлороформных извлечений полученных экстрактов с помощью БСТФА. При этом были идентифицированы компоненты, представленные в таблице 5, среди которых углеводы, флавоноиды, спирты, кислоты и аминокислоты. После проведения экстракции хлороформом и дальнейшей дериватизации в экстрактах также были обнаружены и соединения, представленные в таблице 3. Подавляющее большинство идентифицированных соединений относится к органическим кислотам. Отмечено присутствие в экстрактах большого числа оксикислот, двухосновных кислот, которые раньше не описывались в качестве компонентов цветков ромашки аптечной [1, 10, 13, 15–17, 19, 20]. Обнаружено, что в цветках ромашки аптечной содержатся жирные кислоты и их эфиры, которые идентифицированы во всех субкритических экстрактах, кроме ЭДВ 150 °C. Углеводный состав экстрактов различается, но при этом не прослеживается четкой тенденции влияния температуры и состава экстрагентов на их извлечение.

Желеобразная консистенция ЭДЭ 50 и 70 % свидетельствует о наличии высокомолекулярных углеводных компонентов, которые присутствуют в цветках ромашки аптечной в виде слизей [1]. В условиях субкритической экстракции водно-этанольными смесями слизи растворяются в экстрагенте, а при переводе экстрактов в нормальные условия (25 °C; 101,3 кПа) истинный раствор переходит в желеобразный коллоид. Экстракция хлороформом не предполагает извлечение углеводной фракции, однако углеводы попадают в хлороформ с водой, которая не удаляется обработкой экстракта сульфатом натрия, поэтому констатировать факт полной качественной идентификации углеводной составляющей нельзя. Содержание D-рибофуранозы и рибозы как компонента клеточного ядра [1] свидетельствует о процессах разрушения растительных клеток в условиях субкритической экстракции. В цветках ромашки аптечной обнаружены фенольные соединения — природные антиоксиданты [21]. Водно-этанольными растворами фенолы извлекаются при всех изученных температурах экстракции, а субкритической водой — только при 200 °C, однако инозитол был обнаружен во всех экстрактах. Из флавоноидов в экстрактах были идентифицированы только лютеолин и 3,5,7-флавонол, вероятно из-за того, что флавоноиды плохо подвергаются процессу дериватизации, поэтому апигенин, обнаруженный при ВЭЖХ анализе, не был идентифицирован при ГХ-МС анализе. Установлено, что кумарины присутствуют в субкритических экстрактах цветков ромашки аптечной и в гликозидной форме. Исходя из таблицы 4, можно сказать, что при 150 °C вода не полностью извлекает компоненты

Извлечение биологически активных соединений из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, экстрагентами в субкритическом состоянии

Таблица 5

Наличие нелетучих органических соединений в экстрактах цветков ромашки аптечной

Компонент	ЭДВ 150 °C	ЭДВ 200 °C	ЭЭ 10 % 150 °C	ЭЭ 10 % 200 °C	ЭЭ 50 % 150 °C	ЭЭ 50 % 200 °C	ЭЭ 70 % 150 °C	ЭЭ 70 % 200 °C
Углеводы								
D-эритрофuranоза	+	+	+	+	+	+	+	+
D-фруктофuranоза	+	+	+	—	—	—	—	—
мальтоза	+	+	+	+	+	+	+	+
α-глюкопираноза	+	+	—	—	—	—	—	—
манноза	+	+	—	—	+	—	+	—
галактопираноза	—	+	—	+	—	+	—	—
глюкоза	—	+	—	—	—	—	—	—
сахароза	+	+	+	+	+	+	+	+
D-рибофuranоза	+	+	+	+	+	+	+	+
D-рибоза	+	+	+	+	+	+	+	+
галактоза	—	—	+	+	+	+	+	+
D,L-арабинопираноза	—	—	+	+	+	+	+	+
β-D-ксилопираноза	—	—	—	+	+	—	—	—
Спирты								
1,5-ангидро-D-сорбитол	—	—	—	—	+	+	—	—
глицерин	+	+	+	+	—	—	—	—
1-октин-3-ол	—	+	+	+	+	+	+	+
фарнезол	+	+	+	+	+	+	+	+
Кислоты								
бутановая	+	+	+	+	+	+	+	+
бензойная	+	+	+	+	+	+	+	+
бензилуксусная	+	+	+	+	+	+	+	+
валерьяновая	+	+	+	+	+	+	+	+
ванилинпропионовая	+	+	+	+	+	+	+	+
винная	—	+	+	+	+	+	+	+
4-гидроксибензойная	+	+	+	+	+	+	+	+
2-гидроксибутановая	+	+	+	+	+	+	+	+
4-гидроксибутановая	+	+	—	—	+	—	—	—
3-гидроксизобутановая	+	+	+	+	+	+	+	+

Продолжение таблицы 5

Компонент	ЭДВ 150 °C	ЭДВ 200 °C	ЭЭ 10 % 150 °C	ЭЭ 10 % 200 °C	ЭЭ 50 % 150 °C	ЭЭ 50 % 200 °C	ЭЭ 70 % 150 °C	ЭЭ 70 % 200 °C
2-гидроксизогексановая	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -гидроксикоричная	—	+	+	+	+	+	+	+
3-гидроксигексановая	—	+	+	+	+	+	+	+
2-гидроксигептановая	—	+	+	+	+	+	+	+
3-гидроксипропановая	+	+	+	+	+	+	+	+
9-гексадециновая	—	+	+	+	+	+	+	+
пентандиовая	+	+	+	+	+	+	+	+
2,3-дигидроксипропановая	+	+	+	+	+	+	+	+
2-изопропил-2-гидроксибутандиовая	+	+	+	+	+	+	+	+
каприловая	—	+	+	+	+	+	+	+
каприновая	—	+	+	+	+	+	+	+
2-кетовалерьяновая	+	+	+	+	+	+	+	+
кофейная	+	+	+	+	+	+	+	+
лимонная	+	+	+	+	+	+	+	+
линолевая	—	+	+	+	+	+	+	+
миристиновая	—	+	+	+	+	+	+	+
3 -метилфуран-2-карбоновая	—	+	+	+	+	+	+	+
2-метоксиуксусная	+	+	+	+	+	+	+	+
молочная	+	+	+	+	+	+	+	+
малоновая	+	+	+	+	+	+	+	+
олеиновая	—	+	+	+	+	+	+	+
пальмитиновая	—	+	+	+	+	+	+	+
пеларгоновая	—	+	+	+	+	+	+	+
пропановая	—	+	+	+	+	+	+	+
протокатеховая	—	+	+	+	+	+	+	+
себациновая	—	+	+	+	+	+	+	+
стеариновая	—	+	+	+	+	+	+	+
сукциновая	—	+	+	+	+	+	+	+
тетроновая	—	+	+	+	+	+	+	+

Извлечение биологически активных соединений из цветков ромашки аптечной, произрастающей в Самарской области, экстрагентами в субкритическом состоянии

Окончание таблицы 5

Компонент	ЭДВ 150 °C	ЭДВ 200 °C	ЭЭ 10 % 150 °C	ЭЭ 10 % 200 °C	ЭЭ 50 % 150 °C	ЭЭ 50 % 200 °C	ЭЭ 70 % 150 °C	ЭЭ 70 % 200 °C
феруловая	—	+	+	+	+	+	+	+
фумаровая	—	+	+	+	+	+	+	+
хинная	—	+	—	—	—	—	—	—
этилмалоновая	—	—	+	—	+	—	+	—
Эфиры								
2,2-диметилсукцинат	—	+	+	+	+	+	+	+
этиллиносеат	—	+	+	+	+	+	+	+
этилолеат	—	+	+	+	+	+	+	+
этилпальмитат	—	+	+	+	+	+	+	+
Аминокислота								
L-пролин	—	—	—	+	+	—	—	—
Флавоноиды								
лютеолин	+	+	+	+	+	+	+	+
3,5,7-флавонол	+	+	+	+	+	+	+	+
Фенолы								
2-фенилэтанол	—	+	+	+	+	+	+	+
4-фенилбутан-2-ол	—	+	+	+	+	+	+	+
изоэвгенол	—	+	+	+	+	+	+	+
инозитол	+	+	+	+	+	+	+	+
метоксибензол	—	+	+	+	+	+	+	+
3-гидроксибутилбензол	—	+	+	+	+	+	+	+
гидроксиметилбензол	—	+	+	+	+	+	+	+
гидроксиэтилбензол	—	+	+	+	+	+	+	+
<i>n</i> -крезол	—	+	+	+	+	+	+	+
2-гидрокси-4-метоксиацетофенон	—	+	+	+	+	+	+	+
4-гидроксиацетофенон	—	+	+	+	+	+	+	+
Кумарины								
умбеллиферон	+	+	+	+	+	+	+	+
6,7-дигидроксикумарин β -D-глюкопиранозид	+	+	+	+	+	+	+	+

цветков ромашки аптечной, наилучшее извлечение нелетучих компонентов водой происходит при 200 °C, а водно-этанольными смесями — и при 150, и при 200 °C.

Соединения, обнаруженные в экстрактах цветков ромашки аптечной, объясняют широкий спектр ее фармакологических свойств, включающих противовоспалительные, акарицидные, иммуномодулирующие, противодиабетические, антиканцерогенные, противозадорные, противоаллергические, солнцезащитные, ранозаживляющие, противогрибковые, репеллентные, противовирусные, противомикробные, успокаивающие, атиоксидантные [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экстракция цветков ромашки аптечной в субкритических условиях в динамическом режиме позволяет более эффективно извлекать биологически активные соединения и более экономична по времени, что делает ее перспективной альтернативой традиционным способам экстракции при производстве лекарственных средств.

Применение субкритической воды при 200 °C и 5 МПа оправдано, если целевыми продуктами являются нелетучие БАС. По данным анализа сухого остатка, оптимальным для извлечения при этих условиях лютеолина и апигенина (относится к основным нелетучим БАС цветков ромашки аптечной) является использование 10 % раствора этанола в воде.

Методом ГХ-МС в полученных экстрактах идентифицировано около 90 компонентов. Основными летучими органическими соединениями являются 7-метоксикумарин, бисаболол оксид А и хамазулен. Максимальное извлечение ЛОС цветков ромашки аптечной при 5 МПа происходит при 150 °C с использованием 50 % раствора этанола в воде.

Дериватизация нелетучих БАС позволила выявить в полученных экстрактах фенольные кислоты, оксиленолы, кумарины, терпеноиды, глицерин и иные соединения, что позволяет говорить о широте спектра биологического действия субкритических экстрактов цветков ромашки аптечной.

В условиях наших экспериментов практически полное извлечение летучих компонентов происходит после пропускания через экстрактор 30 мл экстрагента. Повышение температуры процесса субкритической экстракции не приводит к деструкции компонентов, а является фактором изменения экстракционных свойств растворителя.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках государственного задания на выполнение работ (проект № 4.6875.2017/8.9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куркин В.А. Фармакогнозия. 2-е изд., перераб. и доп. Самара: Офорт, 2007. 1239 с.
2. Малащенко Н.Л. Дис. ... канд. техн. наук. Краснодар, 2015. 147 с.
3. Патент GB WO 2010034971. 2008.
4. Szoke E., Maday E., Marczal G., Lemberkovics E. ISHS Acta Horticulturae 597: International Conference on Medicinal and Aromatic Plants. Part II. 2003. P. 275.
5. Pirzad A., Alyari H., Shakiba M.R., Zehtab-Salmasi S., Mohammadi A. J. of Agronomy. 2006. Vol. 5. No. 3. P. 451.
6. Фармакопея СССР. Изд. 11. Вып. 2. М.: Медицина, 1989. 216 с.
7. Pavlova L.V., Platonov I.A., Nikitchenko N.V., Novikova E.A. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2015. Vol. 9. Is. 8. P. 1109.

Оценка эффективности извлечения биологически активных соединений экстрагентами в субкритическом состоянии из цветков ромашки аптечной (*chamomilla recutita R.*), произрастающей в Самарской области

8. Eikani M.H., Golmohammad F., Rowshanzamir S. J. of Food Engineering. 2007. Vol. 80. P. 735.
9. Eikani M.H., Golmohammad F., Mirza M., Rowshanzamir S. J. of Food Process Eng. 2007. Vol. 30. P. 255.
10. Hagh G., Hatami A., Safaei A., Mehran M. Research in Pharmaceutical Sciences. 2014. Vol. 9. No. 1. P. 31.
11. Верниковская Н.А. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. Краснодар, 2011. 23 с.
12. Платонов И.А., Павлова Л.В., Новикова Е.А., Никитченко Н.В., Рощупкина И.Ю. Физикохимия поверхности и защита материалов. 2014. Т. 50. № 6. С. 633.
13. Dmitruk A.F., Lesishina Yu.O., Volodchenko I.I. Russian Journal of Physical Chemistry B. 2012. Vol. 6. Is. 7. P. 813–817
14. Паталаха И.С., Кирпиченок М.А., Гордеева Н.А., Грандберг И.И. Известия ТСХА. 1989. № 5. С. 157.
15. Gupta V., Mittal P., Bansal P., Khokra S.L., Kaushik Dh. Int. J. of Pharmaceutical Sciences and Drug Research. 2010. Vol. 2. No. 1. P. 12.
16. Первшина Г.Г., Ефремов А.А., Гордиенко Г.П., Агафонова Е.А. Химия растительного сырья. 2002. № 3. С. 21.
17. Svehliková V., Bennett R.N., Mellon F.A., Needs P.W., Piacente S., Kroon P.A., Bao Y. Phitochemistry. 2004. Vol. 65. No. 16. P. 2323.
18. Khajenoori M., Haghghi Asl A., Noori Bidgoli H. IJE TRANSACTIONS B: Applications. 2013. Vol. 26. No. 5. P. 489.
19. Кузьменко А.Н. Автореф. дис. ... канд. хим. наук. М., 2004. 25 с.
20. Темердашев З.А. и др. Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. № 11. Т. 77. С. 22.
21. Сорокина И.В., Крысин А.П., Хлебникова Т.Б., Кобрин В.С., Попова Л.Н. Роль фенольных антиоксидантов в повышении устойчивости органических систем к свободно-радикальному окислению: Аналит. обзор. Сер. Экология. Вып. 46. Новосибирск: СО РАН ГПНТБ, Новосиб. ин-т орган. химии, 1997. 68 с.

EVALUATION OF EFFICIENCY OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS SUBCRITICAL EXTRACTION FROM THE CHAMOMILE FLOWERS (*CHAMOMILLA RECUTITA R.*) GROWING IN THE SAMARA REGION

**¹L.V. Pavlova, ¹I.A. Platonov, ²V.A. Kurkin, ²P.V. Afanasyeva,
¹E.A. Novikova, ¹I.M. Muhanova**

¹*Samara University, Samara, Russia*

²*Samara State Medical University, Samara, Russia*

UV-spectroscopy, gas chromatography / mass spectrometry, high efficiency liquid chromatography and gravimetry methods were employed to study the extracts of biologically active substances (BAS) from the flowers of chamomile growing in the Samara region. The extracts were obtained using the subcritical water and aqueous solutions of ethanol at 150 and 200 °C and 5 MPa. The BAS in the extracts were identified using a reactive gas chromatography.

Key words: chamomile flowers, extraction, subcritical water, 7-methoxycoumarin, luteolin, apigenin, derivatization.