
УДК 543, 542.06

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ЛЕТУЧИХ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ЭВКАЛИПТА ПРУТОВИДНОГО (*EUCALYPTI VIMINALIS LABILL*) ЭКСТРАГЕНТАМИ В СУБКРИТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

Л. В. Павлова*, И. А. Платонов, Н. В. Никитченко, Е. А. Новикова

Самарский государственный аэрокосмический университет им. академика С.П. Королева
(национальный исследовательский университет) (СГАУ), Самара, Россия

*lora-pavlova@mail.ru

Поступила в редакцию 16.06.2014 г

Проведена экстракция биологически активных соединений из листьев эвкалипта прутовидного субкритической водой в интервале температур 120—200 °C при давлении 5 МПа, а также растворами этилового спирта в воде различной концентрации при 200 °C и 5 МПа. Полученные экстракты проанализированы методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Проведена идентификация обнаруженных летучих органических соединений. Установлено содержание в полученных экстрактах α -пинена, β -пинена, α -феландрена, п-цимени, 1,8-цинеола.

Ключевые слова: экстракция, субкритическая вода, эвкалипт прутовидный, 1,8-цинеол.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время создание фармпрепаратов на основе растительного сырья связано с разработкой и внедрением прогрессивных химико-технологических процессов, позволяющих комплексно и рационально использовать энергетические и материальные ресурсы. Поэтому поиск наиболее эффективных способов извлечения биологически активных соединений (БАС), а также оценка возможности вторичной переработки растительного сырья является актуальным направлением современной химической технологии [1]. Использование воды в субкритическом состоянии (перегретая вода под давлением при температурах от 100 до 374 °C) для извлечения БАС из растительного сырья приобретает все более широкое применение как более экологичный и экономичный метод по сравнению с экстракцией органическими растворителями [2]. Растворимость органических компонентов в перегретой воде достаточно высокая, что объясняется изменением физико-химических свойств воды в субкритическом состоянии: при повышении температуры и давления изменяются вязкость, диэлектрическая проницаемость и другие физико-химические параметры [3]; при этом вода становится сходной по свойствам с органическими растворителями. При проведении экстракции субкритической водой (ЭСВ) давление не оказывает существенного влияния на процесс экстракции БАС, его повышение обеспечивает нахождение перегретой воды в жидком состоянии [4]. Температура, как правило, является основным определяющим параметром, варьируя который можно управлять процессом экстракции [2, 4, 5].

Оценка эффективности извлечения летучих органических соединений эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis labill*) экстрагентами в субкритическом состоянии

В качестве объекта исследования был выбран эвкалипт прутовидный, поскольку фармакологические свойства данного растения хорошо известны. С древнейших времен эвкалипт используется в качестве бактерицидного, вяжущего, противовоспалительного, бронхолитического, антистрессового средства [6]. На основе экстрактов эвкалипта выпускаются мази, кремы, таблетированные средства, ингаляционные препараты, ленименты, пластыри [1, 7]. В последнее время данное растение вызывает новую волну научного интереса [1, 8–10]. Известна работа [1], в которой в качестве экстрагента использовался сверхкритический CO_2 , позволяющий эффективнее извлекать летучие органические соединения (ЛОС) эвкалипта прутовидного по сравнению с методом перегонки с водяным паром. Авторами [11] было предложено использование субкритической воды для извлечения ЛОС из эвкалипта шаровидного. Однако экстракция субкритической водой и водно-этанольными смесями при повышенных температуре и давлении ЛОС эвкалипта прутовидного до настоящего времени не проводилась.

Следует отметить и тот факт, что разработка противовоспалительных препаратов растительного происхождения является современным направлением получения новых лекарственных средств, которые обладают менее выраженными побочными эффектами и большей широтой терапевтического действия, чем синтетические противовоспалительные средства [7]. В дальнейшем после проведения клинических испытаний экстракты эвкалипта прутовидного, полученные в среде субкритической воды, можно будет рассматривать как новую форму лекарственного средства, обладающую большей биодоступностью по сравнению со спиртовыми экстрактами. Кроме того, употребление спиртовых экстрактов имеет возрастные ограничения.

Цель данной работы заключалась в разработке и оценке эффективности методики извлечения ЛОС из листьев эвкалипта прутовидного в среде субкритической воды при температурах 120, 160 и 200 °C и давлении 5 МПа, а также водно-этанольными растворами различного состава при 200 °C и 5 МПа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования использовали лекарственное растительное сырье «Листья эвкалипта прутовидного (*Eucalypti viminalis Labill*)» производства ПКФ «Фитофарм» ООО.

Экстракцию проводили двумя способами. Первый способ извлечения БАС заключался в экстракции субкритической водой в динамическом режиме при температурах 120 ± 1 °C, 160 ± 1 °C, 200 ± 1 °C и давлении $5,0 \pm 0,1$ МПа (в дальнейшем условия обозначаются как ЭСВ 120 °C, 160 °C, 200 °C, 5 МПа).

Для экстракции вторым способом в качестве экстрагента использовались 10 %, 50 % и 70 % растворы этанола в воде. Условия экстракции: температура 200 ± 1 °C, давление $5,0 \pm 0,1$ МПа; в дальнейшем условия обозначаются как ЭЭ 10 %, 50 %, 70 %, 200 °C, 5 МПа.

Во всех случаях соблюдалось одинаковое соотношение растительного сырья и экстрагента — $2,20 \pm 0,05$ г на 100 см³.

Эксперименты по экстракции субкритической водой проводили на оригинальной установке (рис. 1), разработанной коллективом авторов [12].

Принцип работы установки заключается в следующем. Дегазированная дистиллированная вода из сосуда 1 по капилляру 2 подается насосом высокого давления 3 в нагреваемый капилляр 4, а затем в экстрактор 5, заполненный расти-

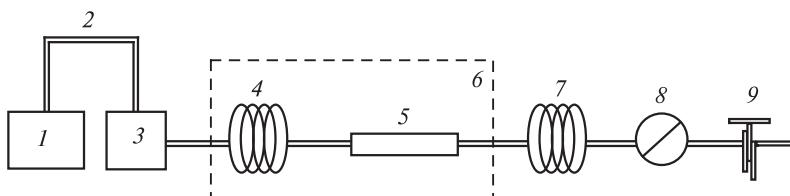


Рис. 1. Установка для экстракции при повышенном давлении и температуре:
1 — сосуд с водой; 2 — капилляр; 3 — насос высокого давления; 4 — нагреваемый капилляр; 5 — экстрактор; 6 — термостат; 7 — охлаждаемый капилляр; 8 — манометр; 9 — вентиль тонкой регулировки

тельным сырьем, смешанным с гранулами карбида кремния для предотвращения слеживания. Нагреваемый капилляр и экстрактор находятся в термостате 6. Полученный экстракт поступает в охлаждаемый капилляр 7. Давление регулируется с помощью вентиля тонкой регулировки 9 и контролируется с помощью манометра 8.

Для проведения ЭСВ исследуемое растительное сырье массой 2,2 г смешивали с гранулами карбида кремния размером $(2 \times 3) \pm 1$ мм до объема 20 см³, затем полученную пробу помещали в экстрактор. После подключения экстрактора, в систему подавали экстрагент, герметично закрывали экстрактор и выдерживали систему 20 минут при давлении $14,0 \pm 0,1$ МПа. После этого открывали вентиль тонкой регулировки, и экстрагент начинал поступать в систему. Одновременно запускали нагрев термостата, в котором находился обогреваемый капилляр и экстрактор. Давление поддерживали на уровне $5,0 \pm 0,1$ МПа, поток экстрагента составлял $1,7 \pm 0,1$ см³/мин. Экстракти при динамическом режиме отбирали с момента выхода системы на заданную температуру порциями по 5 см³.

Анализ полученных экстрактов осуществляли на газовом хроматографе Agilent 7890 GC, совмещенном с масс-селективным детектором с ионизацией электронным ударом 5975C производства Agilent Technologies, энергия ионизации — 70 эВ. Разделение проводили на кварцевой капиллярной колонке с малополярной неподвижной фазой HP-5ms (Agilent, США; 30 м × 0,25 мм, толщина пленки 0,25 мкм) при следующем режиме программирования температуры: изотерма 40 °C 5 мин, нагрев до 80 °C со скоростью 2 °C/мин, нагрев до 150 °C со скоростью 7 °C/мин, изотерма 5 мин, нагрев до 250 °C со скоростью 10 °C/мин, изотерма 5 мин, нагрев до 280 °C со скоростью 10 °C/мин, изотерма 5 мин. Температура испарителя 270 °C. Температура ионного источника 230 °C; температура квадруполя 150 °C; температура переходной линии 280 °C. В качестве газа-носителя использовали гелий. Поток газа в колонке 1 см³/мин; режим ввода — Split 1:20; объем вводимой пробы экстракта 1 мкл. Идентификация компонентов проводилась с использованием библиотеки спектров WILEY8 и NIST08. Диапазон сканирования 45—500 m/z.

Количественная оценка содержания ЛОС в экстракте проводилась методом абсолютной градуировки. Градуировочные растворы готовили растворением на вески чистых веществ α -пинена, β -пинена, 1,8-цинеола (Fluka) и α -феландрена (Sigma-Aldrich) в 70 % растворе этанола в воде. Также использовался готовый стандартный раствор п-цимена в метаноле (Restek, концентрация 2 мкг/см³).

Содержание ЛОС определяли в каждой фракции.

Количество извлекаемых ЛОС a , мкг/г растительного сырья рассчитывали по формуле

$$a = \frac{5 \sum_{i=1}^{20} C_i}{m_{pc}},$$

где C_i — концентрация компонента, найденная по градуировочному графику, мкг/см³; 5 — объем фракции, см³; 20 — количество фракций; m_{pc} — масса растительного сырья, г.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных экстрактов эвкалипта прутовидного выявил изменение качественного состава извлекаемых ЛОС в зависимости от использованного экстрагента и температуры экстракции. Идентификация ЛОС эвкалипта прутовидного осуществлялась на основе данных предыдущих исследований [13]. При проведении процесса экстракции субкритической водой при температурах 120 и 160 °С и давлении 5 МПа было обнаружено около 70 соединений. Повышение температуры процесса до 200 °С привело к повышению концентрации (оценка по площади пиков) ранее обнаруженных ЛОС и увеличению числа извлеченных ЛОС до 90 соединений (рис. 2). Среди них в составе экстракта появляются соединения, которые в обычных условиях в воде не растворимы: феруловая, хинная, пальмитиновая, стеариновая кислоты, фенольные соединения. Вероятно, увеличение числа детектируемых соединений является следствием повышения эффективности экстракции при повышении температуры, что подтверждается увеличением концентрации ранее обнаруженных ЛОС. Не исключено, что вещества, определяемые только в продуктах ЭСВ при 200 °С и 5 МПа, являются продуктами термического разложения. Однако вещества, концентрации которых уменьшились при повышении температуры экстракции со 160 до 200 °С, обнаружено не было. При анализе последовательных порций продуктов ЭСВ при 200 °С и 5 МПа установлено, что после прохождения 25 см³ субкритической воды (время экстракции 14 мин) в пробах определяется 2,4-дигидропиранон, который возможно является одним из продуктов термического разложения целлюлозы. После прохождения 30 см³ субкритической воды его количество (оценка по площади пика) возрастает, а затем постепенно уменьшается. Согласно обзору литературы [14] данное вещество обладает антимикробной и противовирусной активностью; не исключено, что оно является компонентом ЛОС, входящих в состав эвкалипта прутовидного.

Результаты, полученные при ЭСВ 200 °С и 5 МПа, были сопоставлены с данными экстракции сверхкритическим диоксидом углерода (СКЭ СО₂) листьев эвкалипта прутовидного [1]. В случае СКЭ СО₂ наиболее эффективно извлекаются монотерпены (26,3 %), сесквитерпены (47,1 %) и насыщенные углеводороды (24,5 %), содержание остальных классов соединений (сложных эфиров, органических кислот, тритерпенов, дитерпенов) составляет менее 2 %. В продуктах ЭСВ при 200 °С и 5 МПа содержание монотерпенов составляет около 20 %, сесквитерпенов — 6 %, сложных эфиров — 2 %. Кроме этого, при экстракции субкритической водой извлекаются пирановые (5 %), фурановые (12 %) и фенольные соединения (17 %), жирные кислоты (10 %), но не извлекаются насыщенные углеводороды. Таким образом, в отличие от СКЭ СО₂, при которой извлекаются в основном соединения терпеновой природы и насыщенные углеводороды, экстракция субкритической водой при 200 °С и 5 МПа позволяет извлечь более широкий спектр веществ разных классов.

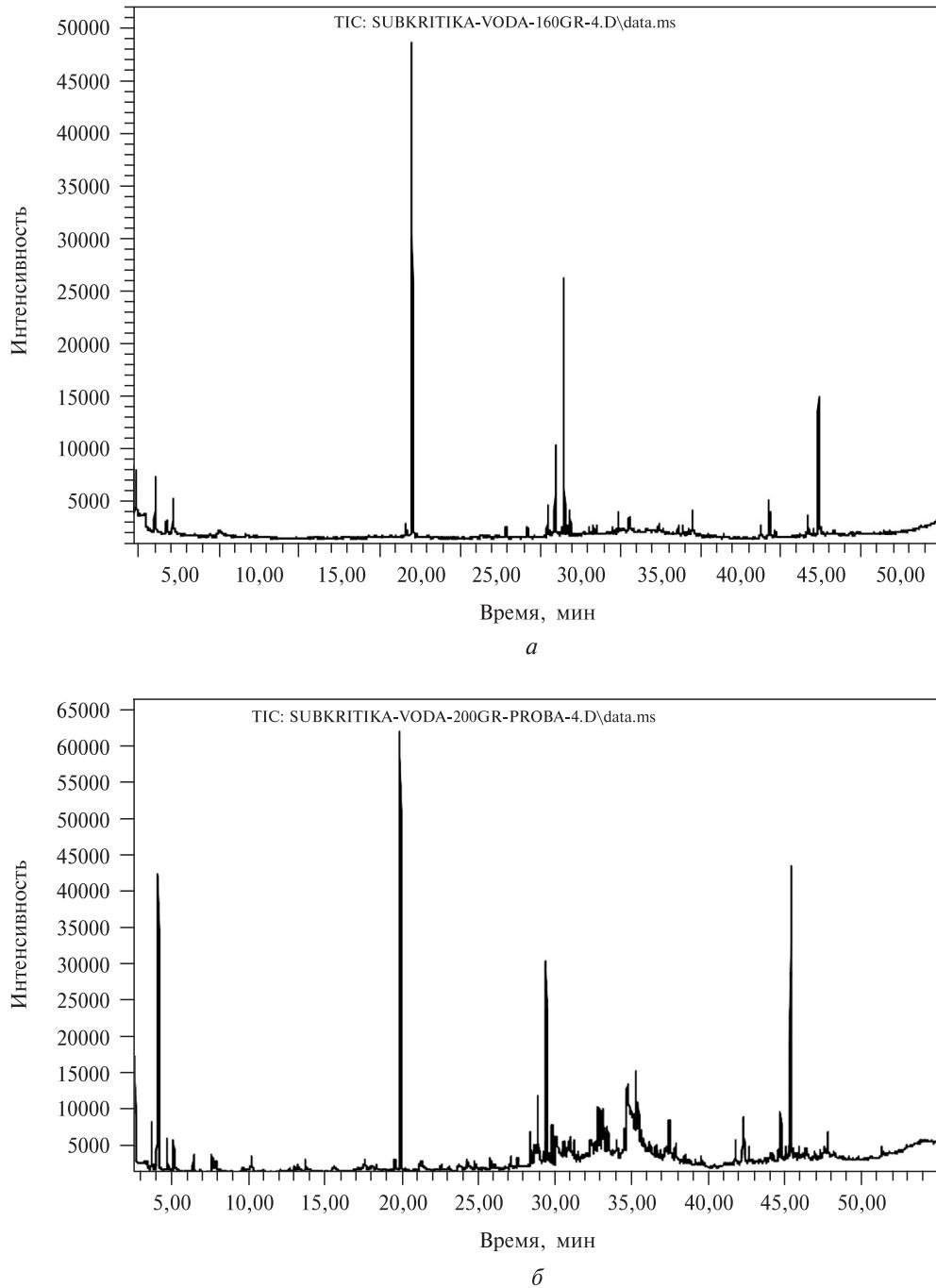
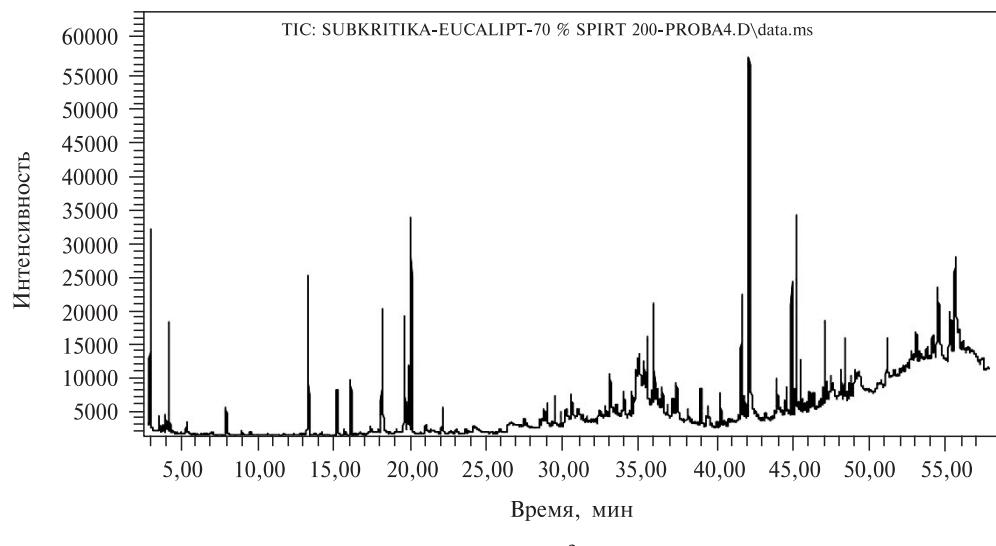
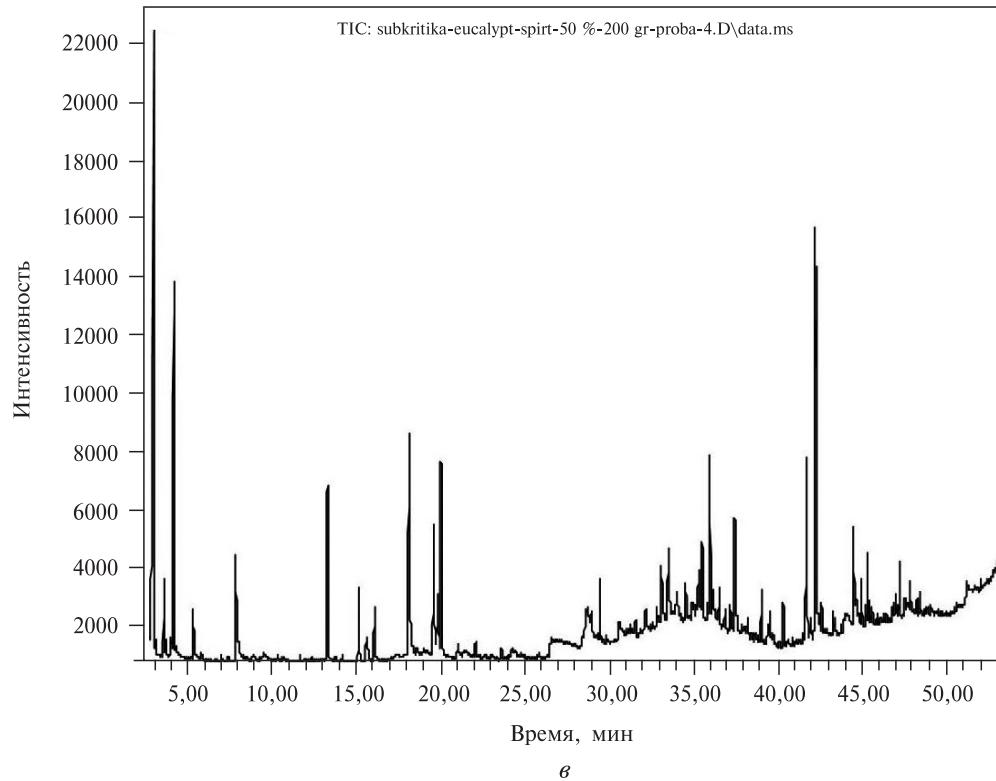


Рис. 2. Хроматограммы (ГХ-МС) экстрактов эвкалипта прутовидного, полученных экстрагентами в субкритическом состоянии при 5 МПа:
a – ЭСВ 160 °C; *б* – ЭСВ 200 °C; *в* – ЭЭ 50 % 200 °C; *г* – ЭЭ 70 % 200 °C

**Оценка эффективности извлечения летучих органических соединений
эвкалипта прутовидного (*eucalypti viminalis labill*) экстрагентами в субкритическом состоянии**



Таблица

**Количество извлекаемых при 5 МПа ЛОС эвкалипта прутовидного
в мкг на 1 г растительного сырья**

ЛОС	Количество ЛОС, мкг/г растительного сырья					
	ЭСВ 120 °C	ЭСВ 160 °C	ЭСВ 200 °C	ЭЭ 10 % 200 °C	ЭЭ 50 % 200 °C	ЭЭ 70 % 200 °C
α-пинен	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	136,32	501,07
β-пинен	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	94,91	257,57
α-феландрен	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01	301,27	1318,75
п-цименин	3,75	10,68	17,45	18,34	145,02	173,71
1,8-цинеол	494,95	749,98	1073,36	1038,55	1047,57	1098,57

Следующий этап исследований заключался в изучении влияния состава растворителя на процесс извлечения. Модификация воды 10 % этанола не изменила ее экстракционных свойств, о чем свидетельствует качественный состав извлеченных компонентов. Однако при использовании в качестве экстрагента 50 и 70 %-го раствора этанола в воде при 200 °C и 5 МПа качественный состав извлеченных соединений заметно изменился и достиг 300 компонентов.

Эффективность извлечения ЛОС в экстрактах оценивали по содержанию α-пинена, β-пинена, α-феландрена, п-цименина и 1,8-цинеола. Следует отметить, что α-пинен, β-пинен, α-феландрен содержатся в продуктах ЭСВ при 120—200 °C и 5 МПа, в продуктах ЭЭ 10 % 200 °C в следовых количествах, однако в продуктах ЭЭ 50 %, 70 % 200 °C их содержание позволило сделать количественную оценку (таблица).

Как видно из представленных в таблице данных, ЭСВ при температурах 120 и 160 °C не позволяет провести эффективную экстракцию ЛОС из листьев эвкалипта прутовидного. Для наиболее полного извлечения ЛОС из растительного сырья необходимо применять в качестве экстрагента 70 % раствор этанола при следующих условиях экстракции: температура 200 °C и давление 5 МПа. Однако если рассматривать в качестве целевого компонента 1,8-цинеола, то рациональнее использовать в качестве экстрагента воду в субкритическом состоянии при температуре 200 °C и давлении 5 МПа, поскольку использование воды в отличие от органических растворителей более экономично и экологично.

Использование режима динамической экстракции позволяет селективно отбирать фракции с необходимым содержанием целевых компонентов. На рис. 3 представлены кривые извлечения 1,8-цинеола, полученные при различных условиях экстракции. Как видно из рис. 3, пофракционный анализ экстрактов выявил смещение максимума извлечения в зависимости от используемого экстрагента. При практически одинаковом извлечении 1,8-цинеола за время всего процесса (таблица) для ЭСВ при 200 °C и 5 МПа и ЭЭ 70 % 200 °C 5 МПа динамика экстракции неодинакова. Так, в первом случае полное извлечение 1,8-цинеола наблюдается за 44 минуты, при этом затрачивается 75 см³ экстрагента, максимальное извлечение достигается за 17 минут (объем экстрагента составил 30 см³). При ЭЭ 70 % 200 °C 5 МПа полное извлечение 1,8-цинеола происходит за 23 минуты

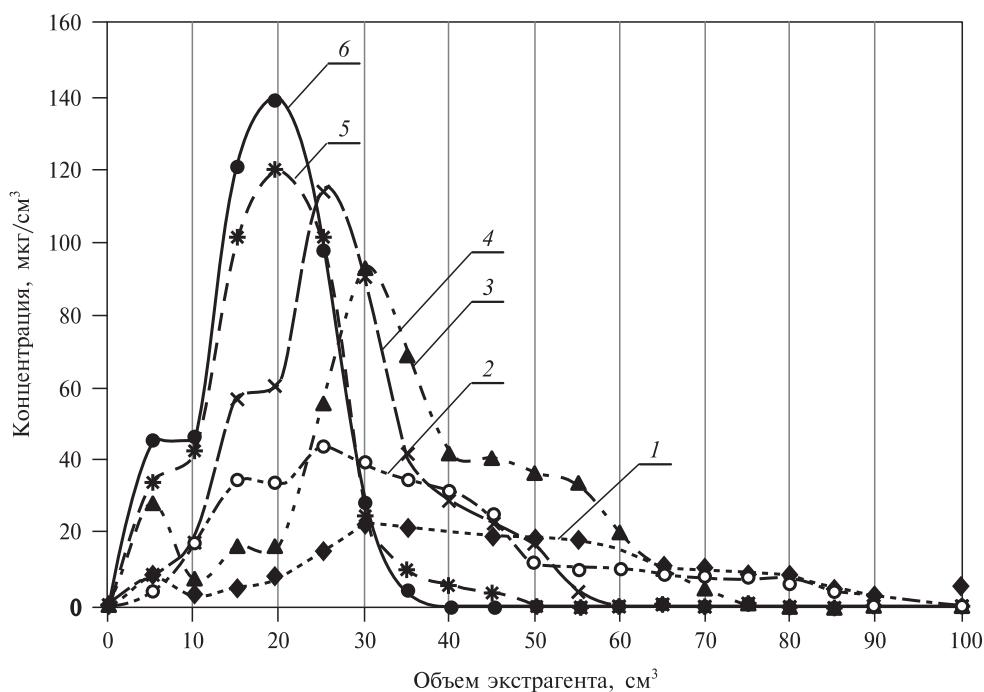


Рис. 3. Количество извлекаемого 1,8-цинеола в зависимости от объема пропущенного экстрагента при 5 МПА:

1 – ЭСВ 120 °C; 2 – ЭСВ 160 °C; 3 – ЭСВ 200 °C; 4 – ЭЭ 10 % 200 °C; 5 – ЭЭ 50 % 200 °C; 6 – ЭЭ 70 % 200 °C

(объем экстрагента 40 см³), максимальное извлечение соответствует объему 20 см³, т.о. данные условия являются оптимальными для обеспечения эффективного извлечения целевых компонентов из лекарственного растительного сырья «Листья эвкалипта прутовидного».

Установлено, что экстракция субкритической водой при температурах 120 и 160 °C и давлении 5 МПа малоэффективна по сравнению с другими изученными в данной работе вариантами проведения процесса. Следует отметить, что в условиях ЭСВ при 200 °C и 5 МПа, ЭЭ 10 %, 50 %, 70 % 200 °C 5 МПа количество фенольных соединений (оценка по площадям пиков) максимально в первых порциях экстрактов (15 см³ экстрагента), в последующих порциях их количество значительно снижается, а при пропускании 40 см³ экстрагента они не детектируются. Жирные кислоты и хинная кислота в продуктах ЭСВ при 200 °C и 5 МПа детектируются только в первых трех фракциях (время экстракции 9 мин, объем экстрагента 15 см³).

При изучении динамики экстракции ЛОС эвкалипта прутовидного 70 % раствором этанола при температуре 200 °C и давлении 5 МПа (рис. 4) обнаружено, что практически все исследуемые вещества полностью извлекаются за 23 мин, объем экстрагента при этом составляет 40 см³. Однако для извлечения α-феландрена требуется 55 см³ экстрагента. Максимальное количество изученных ЛОС содержится в первых 3–4 фракциях. Время экстракции при этом составляет 12 мин.

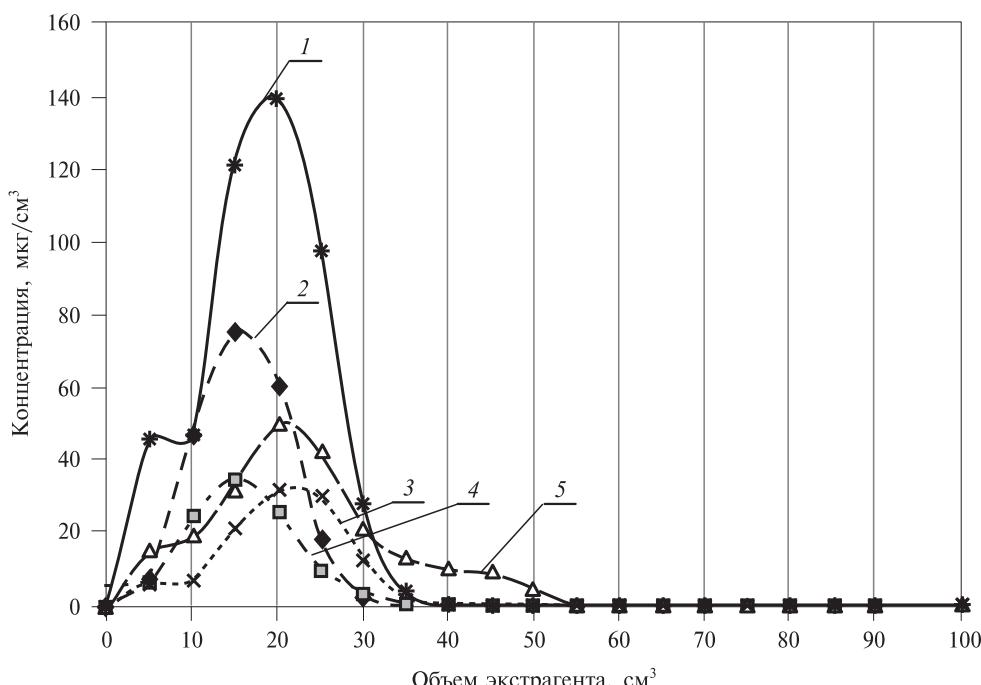


Рис. 4. Количество извлекаемых ЛОС эвкалипта прутовидного при ЭЭ 70 % 200 °C, 5МПа в зависимости от объема пропущенного экстрагента:

1 — 1,8-цинеол; 2 — α-пинен; 3 — π-цимен; 4 — β-пинен; 5 — α-феландрен

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования продемонстрировали высокую эффективность использования экстрагентов в субкритическом состоянии. Установлено, что наиболее полное извлечение всех ЛОС из эвкалипта прутовидного наблюдается при экстракции раствором этанола в воде с концентрацией 70 % при температуре 200 °C и давлении 5 МПа. При этом ЭСВ при температуре 200 °C и давлении 5 МПа для извлечения целевого компонента 1,8-цинеола из растительного сырья эвкалипта прутовидного является сопоставимой с ЭЭ 70 % при тех же температуре и давлении. Показано, что температура процесса экстракции БАС не должна превышать 200 °C.

Работа частично поддержана Минобрнауки РФ в рамках государственного задания на выполнение работ, проект № 608.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зильфикаров И.Н., Алиев А.М. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 2. С. 43.
2. Eikani M.H., Golmohammad F., Mirza M., Rowshanzamir S. J. of Food Process Engineering. 2007. Vol. 30. P. 255.
3. Uematsu M., Franck E.U. J. Phys. Chem. Ref. Data. 1980. Vol. 9. № 4. P. 1291.
4. Ong E.S., Cheong J.S.H., Goh D. J. Chromatogr. A 1112. 2006. P. 92.
5. Eikani M.H., Golmohammad F., Rowshanzamir S. J. of Food Engineering. 2007. Vol. 80. P. 735.
6. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: Офорт, 2007. С. 347.
7. Хаджисеева З.Д., Теунова Е.А. Фундаментальные исследования. 2011. № 11. С. 254.

Оценка эффективности извлечения летучих органических соединений эвкалипта прутовидного (*eucalypti viminalis labill*) экстрагентами в субкритическом состоянии

8. Nagpal N., Shah G., Arora N.M., Shri R., Arya Y. IJPSR. 2010. Vol. 1 (12). P. 28.
 9. Кузьменко А.Н., Пашкова Е.Б., Пирогов А.В., Разживин Р.В., Решетняк В.Ю. Вестник московского ун-та. Сер. 2. Химия. 2010. Т. 51. № 2. С. 132.
 10. Кошевой О.Н., Виноградов Б.А., Ковалеева А.М., Комисаренко А.Н. Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. 2011. Вип. XXIV. № 2. С. 23.
 11. Jeminez-Carmona M.M., Luque de Castro M.D. Chromatographia. 1999. Vol. 50. P. 578.
 12. Платонов И.А., Никитченко Н.В., Онучак Л.А. и др. СКФ-ТП. 2010. Т. 5. № 3. С. 67.
 13. Павлова Л.В., Платонов И.А., Новикова Е.А., Никитченко Н.В. Аналитика и контроль. 2013. Т. 17. № 3. С. 304.
 14. Лечение гепатита С. Руководство, перспективы. Best clinical practice: русское издание. М.: Рид Елсивер, 2011. С. 37.
-

EVALUATION OF PERFORMANCE OF VOLATILE ORGANIC COMPOUNDS EXTRACTION FROM EUCALYPTUS VIMINALIS (EUCALYPTI VIMINALIS LABILL) USING EXTRACTANT IN SUBLITICAL STATE

L.V. Pavlova, I.A. Platonov, N.V. Nikitchenko, E.A. Novikova

Samara State Aerospace University, Samara, Russia

Extraction of biologically active substances from the leaves of eucalyptus viminalis is carried out by subcritical water in the temperature range 120–200 °C and a pressure of 5 MPa, as well as solutions of ethanol in water of different concentrations at 200 °C and 5 MPa. The extracts are analyzed using gas chromatography-mass spectrometry. Identification of the detected volatile organic compounds is realized. The content of α -pinene, β -pinene, α -phellandrene, *p*-cymene, 1,8-cineole in obtained extracts is determined.

Key words: extraction, subcritical water, eucalyptus viminalis, 1,8-cineole.
