

**ЭКСТРАКЦИЯ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДОЙ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ ПЛОДОВ
РАСТОРОПШИ ПЯТНИСТОЙ (*Silybum marianum* L.)**

**¹И.А. Платонов*, ¹Н.В. Никитченко, ¹Л.А. Онучак, ¹Ю.И. Арутюнов,
²В.А. Куркин, ¹П.В. Смирнов**

¹Самарский государственный университет, Самара, Россия

²Самарский государственный медицинский университет, Самара, Россия

*pia@ssu.samara.ru

Поступила в редакцию 1.09.2009 г.

Предложен метод экстракции субкритической водой биологически активных соединений из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.), позволяющий получать водные экстракты без использования органических растворителей. Проведена сравнительная оценка количественного содержания гепатопротекторных биологически активных соединений (таксифолина, силикристина, силидианина и силибина) в экстрактах плодов расторопши пятнистой, полученных методом экстракции субкритической водой и стандартизированными методами жидкостной экстракции.

К л ю ч е в ы е с л о в а: экстракция, экстракция субкритической водой, биологически активные соединения, расторопша пятнистая, таксифолин, силикристин, силидианин, силибин, флаволигнаны, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Получение новых лекарственных форм на основе лекарственных растений является одним из наиболее активно развивающихся направлений современной фармакологии. Уникальные свойства микро- и наноформ фармпрепаратов открывают новые перспективные подходы к терапии, поскольку микронизация приводит к существенному повышению скорости растворения фармпрепаратов, позволяет уменьшить терапевтические дозы и свести к минимуму побочные токсические эффекты [1, 2]. Создание новых форм препаратов из лекарственного сырья требует предварительного извлечения биологически активных соединений (БАС).

Одними из наиболее востребованных лекарственных препаратов для профилактики и лечения заболеваний печени различной этиологии являются гепатопротекторы, содержащиеся в лекарственном растении расторопша пятнистая. Гепатопротекторные свойства расторопши обусловлены группой биологически активных соединений — флаволигнанов (таксифолин, силикристин, силидианин и силибин) [3]. Уникальность расторопши обусловлена одновременным присутствием этих БАС в растительном сырье и препаратах на ее основе. Для производства биологически активных добавок и лекарственных препаратов используют зрелые плоды растения, из которых получают экстракты и концентрированные вытяжки флавоноидных фракций растения. Очевидно, что химический состав, эффективность лечебного действия, а также качество фармпрепарата на основе лекарственных

растений напрямую зависят от технологии извлечения и получения биологически активных веществ в виде экстрактов [4]. Разработка экстракционных технологий, отвечающих принципам «зеленой химии», является актуальным направлением исследований [5]. Одной из таких технологий является экстракция субкритической водой в проточном режиме.

Высокая эффективность экстракции субкритической водой обусловлена ростом растворимости в ней органических веществ при увеличении температуры, связанным с изменением физико-химических свойств растворителя. В частности, повышение температуры приводит к снижению диэлектрической проницаемости и вязкости полярных жидкостей (в т.ч. воды) [5–7].

На рис. 1 представлены зависимости диэлектрической проницаемости и вязкости воды от температуры [6, 7]. Диэлектрическая проницаемость воды в интервале температур $75 \div 250$ °С уменьшается в 2 раза, и вода по полярности

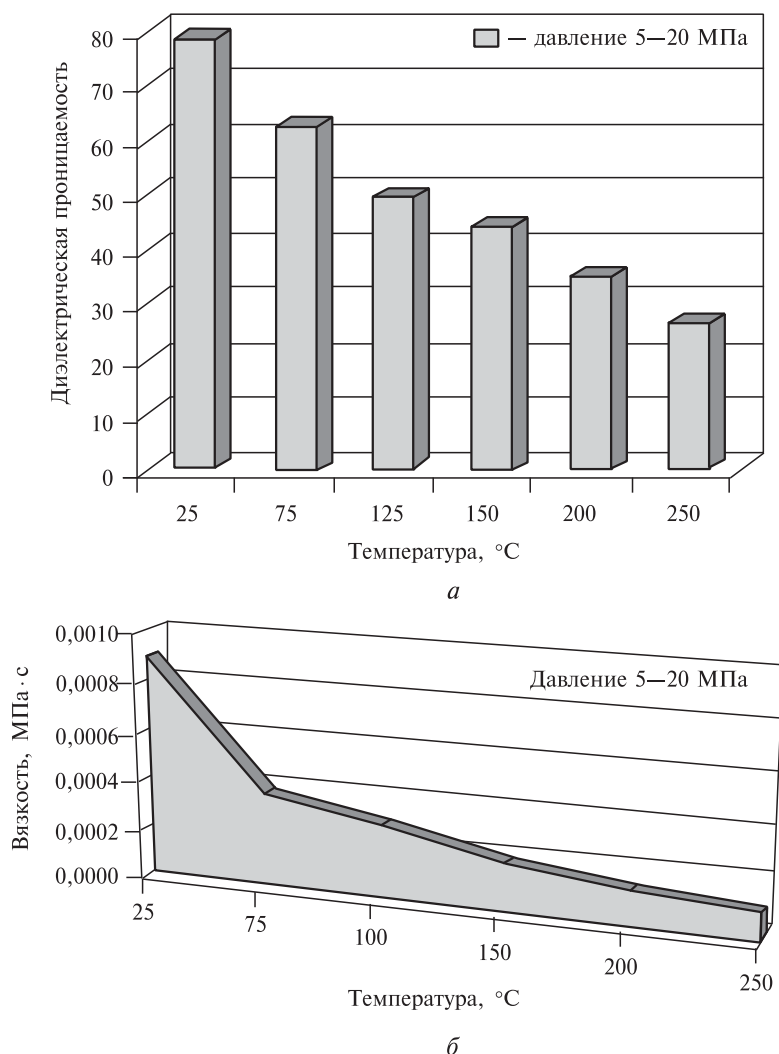


Рис. 1. Зависимости диэлектрической проницаемости (а) и вязкости воды (б) от температуры [6, 7]

становится близкой к органическим растворителям, таким как метанол и этанол, тем самым обеспечивая количественное извлечение слабополярных биологически активных компонентов. Кроме того, вода в субкритических условиях не обладает сильными коррозионными свойствами и не вызывает окисление образца [8].

Целью настоящей работы являлось изучение процесса экстракции основных гепатопротекторных БАС из плодов расторопши пятнистой субкритической водой в проточном режиме, а также сравнительная оценка качественного и количественного содержания этих компонентов в экстрактах, полученных экстракцией субкритической водой и стандартизированными методами жидкостной экстракции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования было выбрано лекарственное растение — расторопша пятнистая (*Silybum marianum* L.). В рамках данной работы внимание было уделено четырем флаволигнанам, входящим в состав данного лекарственного растения: таксифолину, силикристину, силидианину и силибину. Основные физико-химические характеристики этих соединений представлены в таблице 1 [3, 9].

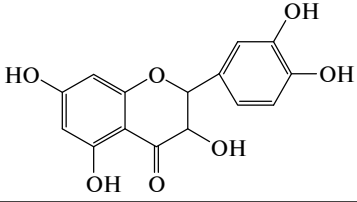
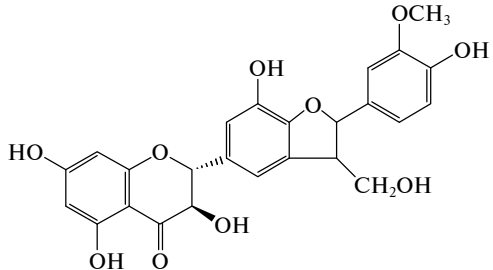
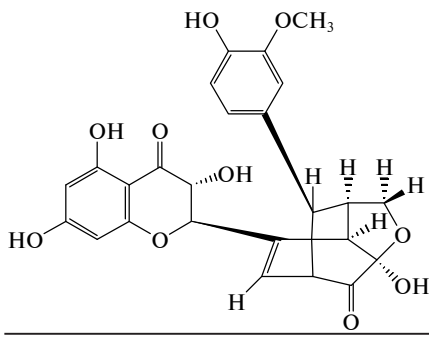
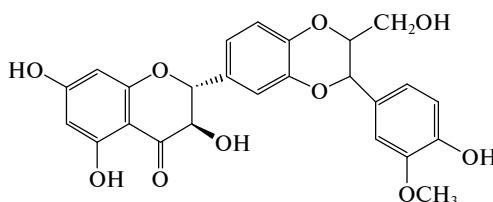
Эксперименты по изучению процесса экстракции субкритической водой в динамическом (проточном) режиме проводили с использованием установки, схема которой представлена на рис. 2. В данной установке дистиллированная дегазированная вода из сосуда 1 подается в насос высокого давления 2, обеспечивающий расход в системе от 0,1 до 10,0 см³/мин при давлении до 40,0 МПа. Из насоса вода поступает в капилляр предварительного нагрева воды 3 и экстрактор 4, помещенные в термостат 5. Экстрактор выполнен в виде колонки из нержавеющей стали длиной 250 мм и внутренним диаметром 10 мм. На выходе из экстрактора установлен капилляр 6, охлаждаемый до 20 °С. Для контроля давления в системе установлены образцовый манометр 7 и регулятор давления 8.

Для экстракции БАС использовали плоды расторопши пятнистой из одной партии лекарственного растительного сырья. Плоды расторопши измельчали до зерна 0,1—0,5 мм и проводили экстракцию (навеска 11,4 г) таксифолина, силикристина, силидианина и силибина при температурах 75, 100, 150 и 250 °С и давлении 12,5 МПа, которое обеспечивает пребывание воды в жидком состоянии. Для этого систему выдерживали в статическом режиме в течение 5—15 мин, после чего процесс экстракции проводили в динамическом режиме в течение 40—60 мин при расходе подвижной фазы 1,0—2,5 см³/мин, отбирая фракции по 5 см³ с последующим их анализом хроматографическим методом (здесь и далее объемы экстрагента и/или элюента приведены к состоянию жидкости при комнатной температуре и атмосферном давлении). Кроме того, для оценки эффективности экстракции были получены стандартные водные (отвары) и спиртовые экстракты, приготовленные в соответствии с требованиями фармакопейной статьи [10] и методики, предложенной в работе [11].

Качественный и количественный анализ полученных экстрактов проводили в обращенно-фазовом варианте высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в изократическом режиме на хроматографе «Biotronik» со спектрофотометрическим детектором при длине волны 289 нм. Разделение осуществляли на колонке фирмы Phenomenex (США) (250 × 4,6 мм) с обращенно-фазовым сорбентом Sil C18 (диаметр зерна 5 мкм) при скорости элюирования 0,6 см³/мин.

Таблица 1

Структурные формулы и основные физико-химические характеристики исследуемых соединений

Компонент	Молекулярная формула	M_r , а. е. м.	$T_{пл}$, °С	λ_{max} , нм	α_D^{25} , А ³	μ^* , D
<p>Таксифолин</p> 	$C_{15}H_{12}O_7$	304	240	289	28,73	2,85
<p>Силикристин</p> 	$C_{22}H_{22}O_{10}$	482	173—175	289	46,87	3,56
<p>Силидианин</p> 	$C_{22}H_{22}O_{10}$	482	188—190	289	45,93	3,79
<p>Силибин</p> 	$C_{22}H_{22}O_{10}$	482	164—166	289	46,87	4,80

* Расчет поляризуемости и дипольного момента проводился методом РМ 3 с полной оптимизацией молекулы с использованием среды HyperChem 7.

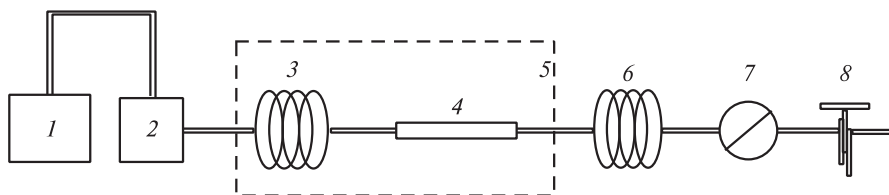


Рис. 2. Схема установки для экстракции субкритической водой:

1 — сосуд с водой; 2 — насос высокого давления; 3 — капилляр предварительного нагрева воды; 4 — экстрактор; 5 — термостат; 6 — охлаждаемый капилляр; 7 — манометр; 8 — регулятор давления

В качестве подвижной фазы использовали раствор, содержащий фосфатный буфер (рН = 3) и ацетонитрил в объемном соотношении 65 : 35.

Качественный состав экстрактов определяли по временам удерживания БАС относительно времени удерживания стандартного образца сравнения (силибина) по литературным данным [12, 13].

Количественный анализ силибина проводили методом абсолютной градуировки. Построение градуировочных характеристик (зависимость площади хроматографического пика вещества от его концентрации) осуществляли с использованием государственного стандартного образца (ГСО) силибина (ФС 42-0072-01). Для приготовления градуировочных растворов силибина 0,02 г ГСО силибина растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл в 80 мл 95 %-го этилового спирта при нагревании (70 °С), затем содержимое колбы охлаждали и доводили объем раствора до метки. На основе полученного раствора объемно-весовым методом готовили серию градуировочных растворов силибина в этаноле (0,5—50 мг/дм³).

Значения концентраций таксифолина, силикристина и силидианина рассчитывали методом внутреннего стандарта по уравнению

$$C_i = \frac{Q_i}{Q_{st}} \cdot C_{st}, \quad (1)$$

где Q_i — площадь хроматографического пика определяемого компонента; Q_{st} — площадь хроматографического пика стандарта (силибина); C_{st} — концентрация стандарта.

Коэффициенты чувствительности для исследуемых компонентов относительно стандартного вещества силибина равны единице, так как все они имеют одинаковое поглощение при длине волны спектрофотометрического детектора $\lambda = 289$ нм [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 3 представлены кривые элюирования силибина, полученные в динамическом режиме экстракции субкритической водой (ЭСВ) при изученных температурах и давлении 12,5 МПа.

Как видно из рис. 3, выходные кривые «концентрация — время» имеют вид асимметричного пика с размытым задним фронтом с максимумом на начальных участках кривой элюирования. Чем выше температура в системе, тем сильнее выражен этот максимум. Экспериментально установлено, что для извлечения 30 мг силибина из 11,4 г исходного сырья необходимо затратить 80 см³ субкритической воды при температуре 250°С. Время экстракции при этом составляет не более

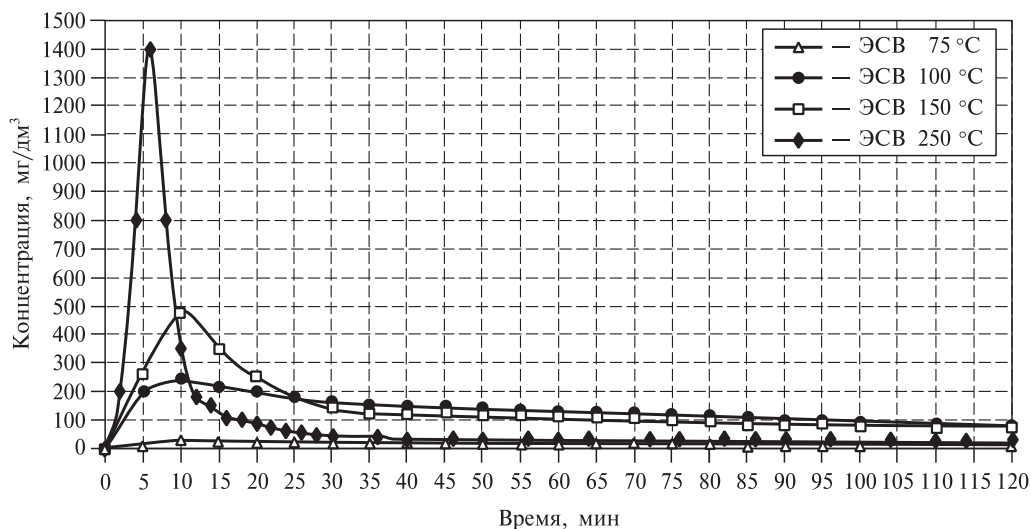


Рис. 3. Кривые элюирования силибина, полученные экстракцией субкритической водой в динамическом режиме при 75, 100, 150 и 250 °С (скорость элюирования 1 см³/мин) и при 250 °С (скорость элюирования 2,5 см³/мин)

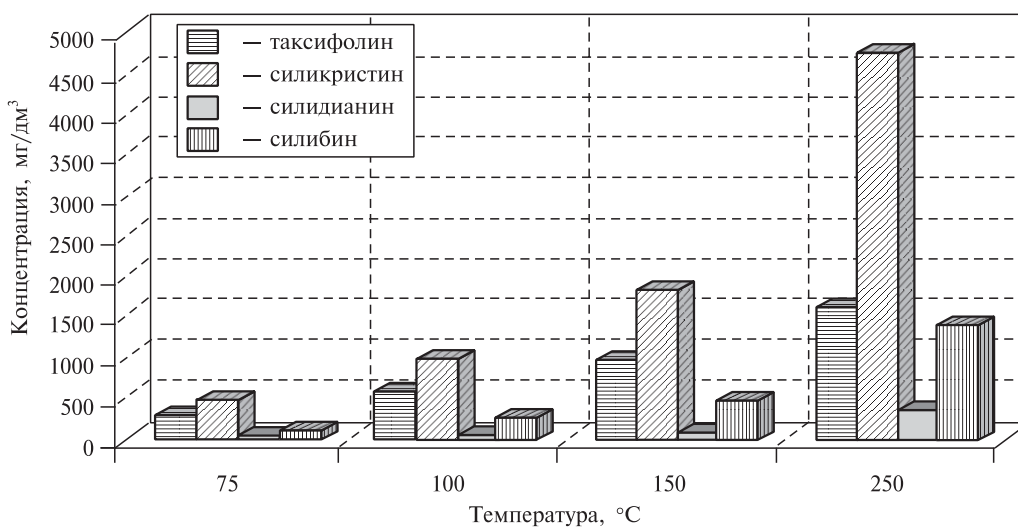


Рис. 4. Концентрации анализируемых компонентов в максимумах пиков кривых элюирования при различных температурах

35 мин. Для извлечения такого же количества силибина при других изученных температурах объем воды и время экстракции увеличиваются: для 150 °С — в 3 раза, для 100 °С — в 5 раз, для 75 °С — в 35 раз. Таким образом, эффективность экстракции увеличивается с ростом температуры и максимальное извлечение силибина наблюдается при температуре 250 °С. Показатели точности определения силибина (таблица 2) получены в результате статистической обработки результатов анализа в соответствии с работами [14, 15].

На рис. 4 представлены зависимости концентраций (мг/дм³) анализируемых компонентов в максимумах пиков кривых элюирования при различных температурах.

Экстракция субкритической водой биологически активных соединений из плодов расторопши пятнистой (*Silybum marianum* L.)

Таблица 2

Показатели точности определения концентрации силибина

Истинная концентрация C_{st} , мг/дм ³	Измеренная концентрация \bar{C}_{st} , мг/дм ³	Разность двух концентраций в выборке $C_{\max} - C_{\min}$, мг/дм ³	Предел прецизионности r_i , мг/дм ³	Граница доверительного интервала $\pm\Delta_i$, мг/дм ³	Правильность измерения δ_i , %	ОСКО S_{r_i} , %
0,50	0,45	0,09	0,10	0,05	10,00	3,70
1,00	0,89	0,14	0,20	0,08	11,00	3,00
5,00	4,66	0,76	0,80	0,39	6,80	2,80
10,00	9,48	1,77	1,90	0,89	5,20	3,20
50,00	45,84	6,50	7,70	3,75	8,30	2,70

Таблица 3

Количество извлеченного БАС субкритической водой в проточном режиме при различных температурах в расчете на 1 грамм исходного сырья ($P = 12,5$ МПа)

Температура ЭСВ, °С	Таксифолин (мг/г сырья)	Силикристин (мг/г сырья)	Силидианин (мг/г сырья)	Силибин (мг/г сырья)	Сумма БАС (мг/г сырья)
75	2,2	10,1	1,3	0,8	14,4
100	4,2	17,1	2,4	3,5	27,2
150	3,9	17,8	3,3	4,7	29,7
250	3,6	17,5	3,7	6,1	30,9

Как видно из рис. 4, с ростом температуры концентрации компонентов в максимумах выходных кривых увеличиваются не только для силибина, но и для таксифолина, силикристина и силидианина.

Проточный вариант ЭСВ дает возможность определять не только концентрации в максимумах кривой, но и суммарное извлеченное количество компонента при прохождении через систему заданного объема экстрагента. В таблице 3 представлены данные по количественному извлечению исследованных БАС субкритической водой заданного объема в проточном режиме при различных температурах. Для всех компонентов объем затраченного элюента (измеренный при комнатной температуре и атмосферном давлении) составил 300 см³.

Анализ данных, представленных в таблице 3, показал, что если максимальное извлечение силибина и силидианина наблюдается при 250 °С, то для таксифолина и силикристина оно достигается при температуре 150 °С. Есть основание полагать, что эти вещества менее термически стабильны, чем силибин и силидианин, и они частично разлагаются при температуре выше 150 °С.

Для оценки эффективности метода ЭСВ было проведено сравнение его со стандартизированными методами жидкостной экстракции этанолом (95 %) и горячей водой (100 °С; 0,1 МПа).

На рис. 5 представлена диаграмма, показывающая количество извлекаемых БАС при использовании различных методов экстракции.

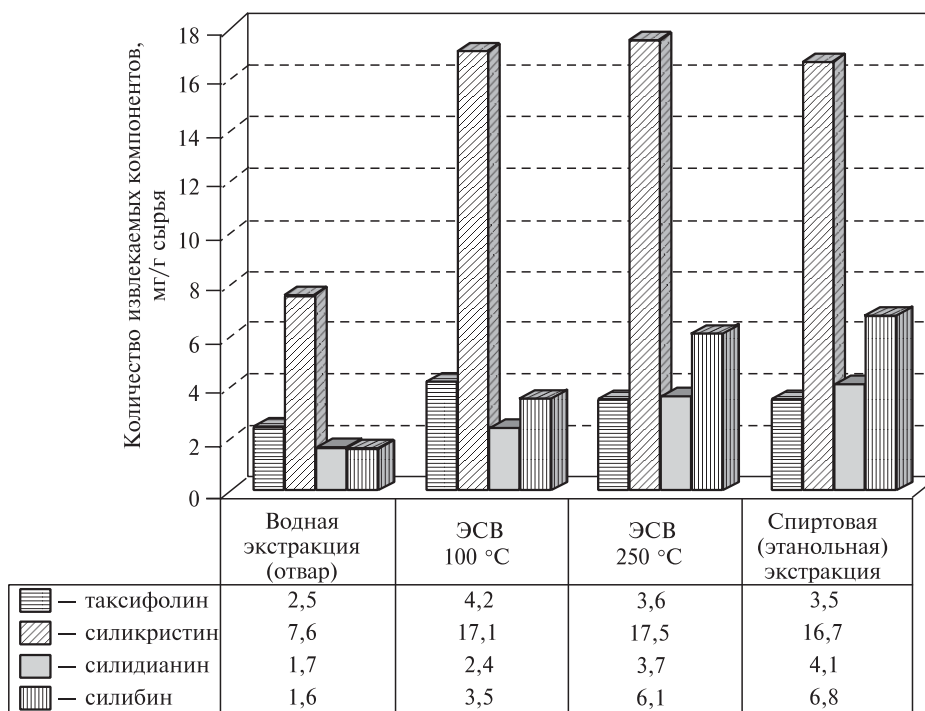


Рис. 5. Количество извлекаемых компонентов при использовании различных методов экстракции (ЭСВ — экстракцией субкритической водой)

Из сопоставления полученных результатов видно, что суммарное количество извлекаемых компонентов методом ЭСВ при 100 °С в 2 раза выше, чем с помощью традиционной водной экстракции. Данный факт можно объяснить изменением физико-химических свойств воды в субкритическом состоянии, 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. Эффективность ЭСВ при извлечении таксифолина, силикрестина, силидианина и силибина из расторопши пятнистой при температуре 250 °С и давлении 12,5 МПа сопоставима со спиртовой экстракцией. Однако, используя метод ЭСВ, можно получать субстанции гепатопротекторных препаратов, не содержащие следов токсичных примесей, присутствующих в органическом экстрагенте.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования:

— установлено, что в изобарных условиях (при 12,5 МПа) с ростом температуры от 75 до 250 °С суммарное количество извлекаемых гепатопротекторных БАС из плодов расторопши пятнистой увеличивается;

— показано, что эффективность ЭСВ при температуре 250 °С и давлении 12,5 МПа не уступает традиционной жидкостной экстракции этанолом.

Работа выполнена в рамках проекта № 02.740.11.0650 федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Залепугин Д.Ю., Тилькунова Н.А., Чернышова И.В. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 1. С. 5.
2. Залепугин Д.Ю., Гамзазаде А.И., Тилькунова Н.А., Мишин В.С., Чернышова И.В., Хохлов А.Р. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 1. С. 24.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия. Самара: ООО «Офорт», 2007. С. 712.
4. Ревельский И.А., Глазков И.Н. СКФ-ТП. 2008. Т. 3. № 2. С. 70.
5. Галкин А.А., Лунин В.В. Успехи химии. 2005. Т. 74. Вып. 1. С. 24.
6. Uematsu M., Franck E.U. J. Phys. Chem. 1980. № 9. P. 1291.
7. Yang Yu, Belghazi M., Lagadec A., Miller D.J., Hawthorne S.B. J. Chromatogr. A. 1998. Vol. 810. P. 149.
8. Yang Yu, Hawthorne S.B., Miller D.J. Environ. Sci. Technol. 1997. Vol. 31. Iss. 2. P. 430.
9. Волоцьева А.В. Дис. на соиск. уч. степ. канд. фарм. наук. Самара: СамГМУ, 2004.
10. Государственная фармакопея СССР. XI изд. Вып. 2. М.: Медицина, 1991. С. 147.
11. Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Авдеева Е.В., Семенов М.Ф., Смольякова И.Б., Браславский В.Б., Первушкин С.В., Цыбулько Н.С. Растительные ресурсы. 1996. Т. 32. Вып. 3. С. 80.
12. Tittel G., Wagner H. J. Chromatogr. 1978. Vol. 158. P. 227.
13. Минахметов Р.А., Онучак Л.А., Куркин В.А., Авдеева Е.В., Волоцьева А.В. Химия природных соединений. 2001. Т. 37. № 4. С. 318.
14. Дёрффель К. Статистика в аналитической химии / Пер. с нем. М.: Мир, 1994.
15. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений.

SUBCRITICAL WATER EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES FROM MILK THISTLE SEED (*Silybum marianum* L.)

¹I. A. Platonov, ¹N. V. Nikitchenko, ¹L. A. Onuchak, ¹Yu. I. Arutyunov,
²V. A. Kurkin, ¹P. V. Smirnov

¹Samara State University, Samara, Russia

²Samara State Medical University, Samara, Russia

A method of subcritical water extraction (SCWE) of biologically active substances from Milk Thistle seed (*Silybum marianum* L.) that allows one to obtain aqueous extracts without use of organic solvents is suggested. The comparison of content of hepatoprotector-type biologically active substances (taxifolin, silychristin, silydianin and silybin) in the Milk Thistle seed extracts obtained by SCWE and by standardized liquid extraction procedures is carried out.

Key words: extraction, subcritical water extraction, biological active substances, Milk Thistle, taxifolin, silychristin, silydianin, silybin, flavolignans, high performance liquid chromatography.
