

## ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ КОМПОНЕНТОВ *HYPERICUM PERFORATUM*

ГВУЗ «Украинский государственный химико-технологический университет», г. Днепропетровск

С использованием спектрофотометрии изучена экстракция основных активных компонентов *Hypericum perforatum* (флавоноидов, каротиноидов, гиперидина) водно-этанольными растворами и растительным маслом. Найдены оптимальные условия процесса извлечения действующих веществ водно-спиртовым экстрагентом.

### Введение

Извлечение биологически-активных компонентов из лекарственного растительного сырья (ЛРС) и использование полученных экстрактов в косметике и медицине является в настоящее время актуальным направлением научных исследований. Это связано, прежде всего, с тем, что компоненты ЛРС представляют собой сбалансированный комплекс биологически-активных веществ, мягко и в то же время эффективно воздействующих на организм человека. Интерес к получению и использованию в косметике и медицине препаратов зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum*) обусловлен разносторонними фармакологическими свойствами этого растения: антибактериальными, противовоспалительными, противоопухолевыми, капилляроукрепляющими и др. В медицине применяются такие препараты зверобоя как «Новоиманин», «Пиразоль», «Негрустин», «Деприм», а в составе косметических средств для кожи используются масляные экстракты, например, препарат «Витанон». Масло зверобоя применяется в косметике как активный компонент антивозрастного действия. Эффективность препаратов зверобоя связана с широким спектром биоактивных веществ, характерных для данного сырья. Основными действующими веществами являются конденсированные антраценпроизводные — гиперидин и псевдогиперидин, их количество достигает 0,5% [1]. Для травы зверобоя характерно высокое содержание каротиноидов (до 55 мг%) и биофлавоноидов: гиперозида (до 1,1%), кверцетина, рутина, кверцитрина и изокверцитрина. Кроме этого в траве зверобоя находятся дубильные вещества катехиновой группы (в некоторых образцах до 10%), эфирное масло, азулен, холин (34 мг%), смолистые вещества (до 10%), витамин С (0,1–0,2%), никотиновая кислота и ее амид, органические кислоты [2–3].

© Е. Г. Кольцова, А. И. Годлевская, 2012

Такое разнообразие биологически-активных компонентов *Hypericum perforatum* требует разработки методик экстракции, позволяющих выделять если не всю сумму компонентов, то хотя бы максимальное их количество. Однако данная задача осложняется тем, что часть биоактивных веществ зверобоя являются гидрофильными (дубильные вещества, флавоноиды, водорастворимые витамины, органические кислоты), а часть — гидрофобными (антраценпроизводные, каротиноиды, азулен, холин, эфирное масло). Поэтому использование какого-либо одного экстрагента позволяет получать вытяжки, обогащенные лишь одной — двумя группами компонентов.

В настоящее время в качестве экстрагентов для *Hypericum perforatum* используют воду (фармакопейная методика получения настоев) [4], 95%-ный спирт [5], 40%-ный спирт [1], ацетон [6], растительные масла [7]. Новым и очень перспективным направлением стало использование двухфазных систем экстрагентов, позволяющих извлекать весь комплекс БАВ зверобоя за один технологический цикл [8]. В качестве полярной фазы при этом используют пропиленгликоль, полиэтиленгликоль-400, глицерин и их смеси с водой, а жировыми компонентами являются бутирол, масло какао, парафин.

В настоящей работе изучена экстракция основных биоактивных веществ зверобоя (флавоноидов, антраценпроизводных, каротиноидов, азулена) водой и водно-спиртовыми смесями, а так же проведено сравнение качественного состава водно-спиртовых экстрактов с масляными экстрактами, полученными разными методами.

### Экспериментальная часть

В качестве сырья использовали аптечную сухую траву зверобоя, которую измельчали и последовательно просеивали через ряд сит с разным размером отверстий, получая фракции с размером частиц не более 0,5 мм, 1 мм, 2 мм, 3 мм, 5 мм.

В качестве экстрагентов использовали воду, водно-спиртовые смеси с массовой долей спирта 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 96%. Навеску не фракционированного сырья массой 1,00 г заливали 10 мл экстрагента и выдерживали на водяной бане при температуре 40°C в течение 1,5 ч, после чего экстракт фильтровали в чистую сухую посуду.

Для изучения влияния температуры и времени настаивания на эффективность извлечения биоактивных веществ зверобоя навески не фракционированного сырья массой 1,00 г заливали 10 мл 60% спирта и настаивали на водяной бане 30 мин, 60 мин, 90 мин, 120 мин, повторяя эксперимент для температур 30°C, 40°C, 50°C, 60°C.

При изучении зависимости выделения биоактивных веществ зверобоя от соотношения сырья: экстрагент навески не фракционированного сырья массой 1,00 г заливали разными объемами 60%-ного спирта (6 мл, 10 мл, 20 мл, 30 мл, 40 мл) и выдерживали на водяной бане при температуре 40°C в течение 1,5 ч.

При изучении влияния размера частиц сырья на извлечение активных компонентов из каждой фракции (0,5; 1; 2; 3; 5 мм) брали навеску 1,00 г, заливали 6 мл 60% спирта и экстрагировали настаиванием в течение 1,5 ч при температуре 40°C.

Масляные экстракты получали одним из двух способов:

- способом, изложенным в патенте [7] и предполагающем распаривание сырья с последующим его настаиванием в растительном масле в течение 5 ч на кипящей водяной бане;

- реэкстракцией биоактивных веществ из водно-спиртовой вытяжки растительным маслом при нагревании на водяной бане.

Спектры полученных экстрактов снимали относительно соответствующего экстрагента с помощью спектрофотометра СФ-46.

### Результаты и их обсуждение

Экстракты зверобоя стандартизируют, главным образом, по двум группам компонентов — флавоноидам (основным из которых является гиперозид — гликозид кверцетина) и антраценпроизводным (гиперицину и псевдогиперицину) [9–10]. Для количественной оценки содержания флавоноидов используют спектрофотометрическую методику, основанную на образовании ими окрашенных комплексов с хлоридом алюминия, при этом в качестве стандартного образца применяют рутин, который, так же как и гиперозид, является гликозидом кверцетина. Содержание гиперидина устанавливают по поглощению экстрактов при 590 нм, используя в расчетах удельное поглощение 1%-го раствора гиперидина.

Как видно из приведенных на рис. 1 спектров, в водно-спиртовом экстракте зверобоя присутствуют флавоноиды (полоса при 350–360 нм), каротиноиды (полоса при 450 нм), антраценпроизводные гиперидин и псевдогиперидин (две по-

лосы при 540 и 590 нм), а так же азулен (полоса при 660–670 нм). Для доказательства присутствия гиперидина нами так же была проведена реакция Борнтрегера, сопровождающаяся образованием антрахинолятов, окрашенных в вишневый цвет [11]. Необходимо отметить, что присутствие гиперидина в экстрактах фиксируется и визуально, поскольку экстракты имеют красную окраску разной степени интенсивности в зависимости от условий извлечения.

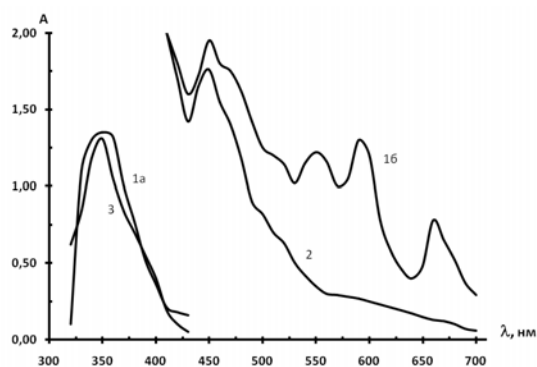


Рис. 1. Спектры водно-этанольного экстракта *Hypericum Perforatum* (1,а — исходный экстракт 1:10, 1,б — 20-кратное разведение), а так же водно-этанольных растворов рутина (2) и каротина (3)

Сравнение спектров экстрактов, полученных разными способами (рис. 2), позволяет сделать вывод, что наиболее полно действующие вещества зверобоя извлекаются водно-этанольной смесью. В экстракте на 96%-ном спирте (кривая 2) практически отсутствуют каротиноиды (плечо при 460 нм) и незначительно содержание гиперидина и его изомеров (малая интенсивность полос при 540 и 590 нм). Учитывая гидрофобность данных соединений, объяснить этот факт только исходя из растворимости этих веществ в экстрагенте не представляется возможным. Вероятно, решающее значение имеет проникающая способность растворителя через клеточные стенки сырья, и в этом случае определяющим фактором является размер молекул растворителя. Это подтверждается так же сравнением спектров масляных экстрактов зверобоя, полученных разными способами (рис. 2, кривые 3,4): при непосредственном настаивании сырья в масле извлекается меньше активных веществ, чем при реэкстракции водно-спиртовой вытяжки. Это вполне объяснимо тем, что молекулы триглицеридов, будучи хорошими растворителями для липофильных соединений, плохо проникают через клеточные стенки сырья.

При изучении зависимости выделения основных биоактивных компонентов зверобоя от концентрации спирта в водно-этанольной смеси проводили фотометрирование полученных экстрактов при длинах волн, соответствующих максимуму

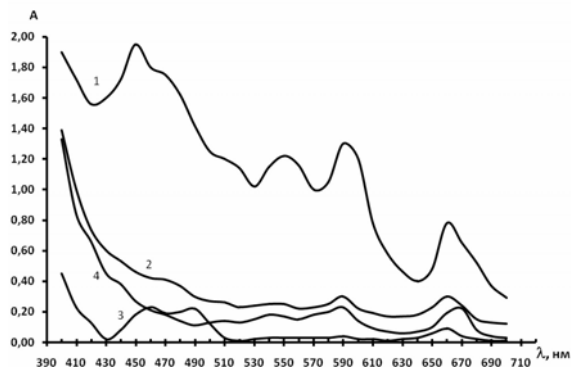


Рис. 2. Спектры экстрактов *Hypericum Perforatum*, полученных различными способами: 1 – экстракция 70%-ным спиртом, 2 – экстракция 96%-ным спиртом, 3 – экстракция маслом, 4 – реэкстракция маслом водно-спиртовой вытяжки

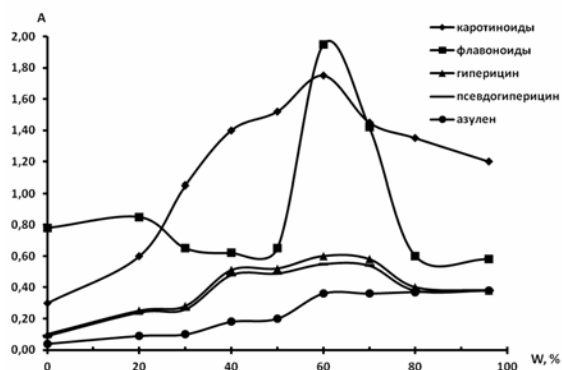


Рис. 3. Зависимость оптической плотности экстрактов *Hypericum Perforatum* от концентрации спирта в экстрагенте при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения различных биоактивных компонентов: каротиноиды –  $\lambda=450$  нм, флавоноиды –  $\lambda=360$  нм, гиперидин –  $\lambda=590$  нм, псевдогиперидин –  $\lambda=540$  нм, азулен –  $\lambda=660$  нм

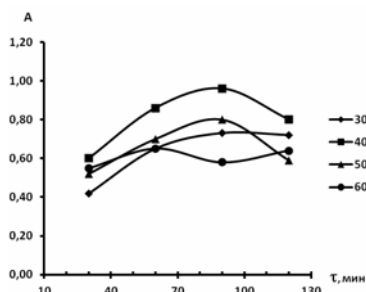


Рис. 4. Влияние температуры и времени настаивания на оптическую плотность экстрактов *Hypericum Perforatum*,  $\lambda=590$  нм (максимум поглощения для гиперидина)

мам поглощения отдельных компонентов: 360 нм – флавоноиды, 450 нм – каротиноиды, 540 и 590 нм – антраценпроизводные, 660 нм – азулен (рис. 3). Как следует из приведенных данных,

флавоноиды и каротиноиды эффективнее всего извлекаются 60%-ным спиртом, гиперидин – 60–70%-ным спиртом, а азулен – в интервале концентраций спирта 60–96%. Изучение влияние температуры и времени настаивания на выделение гиперидина в экстракте показало, что данное вещество является в значительной мере термолабильным, поэтому использовать при мацерации температуру выше 40°C нецелесообразно. Оптимальное время настаивания при данной температуре – 1,5 ч (рис. 4). Оптимальное соотношение сырья:экстрагент соответствует 1:6 (рис. 5), дальнейшее уменьшение количества экстрагента не обеспечивает полного контакта сырья с растворителем.

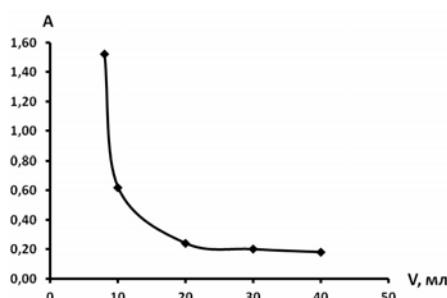


Рис. 5. Влияние соотношения сырья : экстрагент (объем растворителя на 1 г сырья) на оптическую плотность экстрактов *Hypericum Perforatum*,  $\lambda=590$  нм (максимум поглощения для гиперидина)

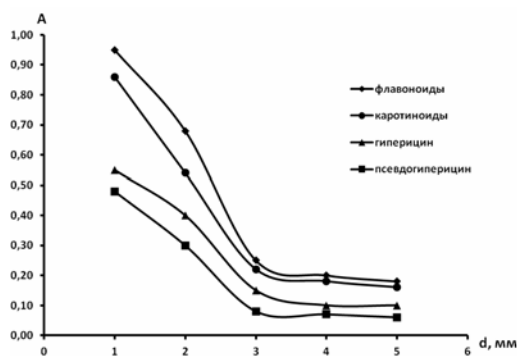


Рис. 6. Зависимость оптической плотности экстрактов *Hypericum Perforatum* от степени измельчения сырья при длинах волн, соответствующих максимумам поглощения различных биоактивных компонентов: каротиноиды –  $\lambda=450$  нм; флавоноиды –  $\lambda=360$  нм; гиперидин –  $\lambda=590$  нм; псевдогиперидин –  $\lambda=540$  нм

Зависимость извлечения биоактивных веществ зверобоя от размера частиц сырья в оптимизированных по остальным параметрам условиях показала, что максимальное содержание всех изучаемых компонентов в экстракте наблюдается для фракций сырья с размером частиц 0,5–1,0 мм (рис. 6). Характер приведенных зависимостей свидетельствует о том, что степень измельчения сырья является одним из факторов, имеющих суще-

ственное влияние на эффективность извлечения. Однако увеличение степени измельчения до размера частиц менее 0,5 мм не будет влиять на увеличение содержания антраценпроизводных в экстракте (рис. 6, кривые 3,4), поэтому более тонкое измельчение сырья в данном случае нецелесообразно.

### **Выводы**

Проведенные исследования показали, что для комплексного извлечения характерных для зверобоя биоактивных компонентов, в качестве экстрагента следует применять 60%-ный спирт. Если по каким-то причинам необходимо получить масляный экстракт, наиболее рациональной методикой для этого может быть реэкстракция маслом водно-спиртовой вытяжки.

Оптимальными параметрами экстракции биоактивных веществ зверобоя являются: температура 40°C, время настаивания 1,5 ч, соотношение сырья:экстрагент 1:6, степень измельчения сырья 0,5–1,0 мм.

Благодаря наличию широкого спектра активных компонентов (флавоноиды, каротиноиды, антраценпроизводные, азулен) полученные предполагаемыми способами экстракты обладают разносторонним действием и могут быть использованы в лечебно-профилактических и косметических средствах.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. *Растительные лекарственные средства* / Ред. Н.П. Максютин. — К.: Здоров'я, 1985. — 280 с.
2. *Ковалева Н.Г.* Лечение растениями. — М.: Медицина. — 1971. — 351 с.
3. *Грбарець М.О., Западнюк В.Г.* Довідник з фітотерапії. — К.: Вища шк. — 1982. — 200 с.
4. *Государственная Фармакопея СССР.* Изд-е XI. — М.: Медицина — 1990. — Вып. 2. —Т.2. —400 с.
5. *Пономарев В.Д.* Экстрагирование лекарственного растительного сырья. — М.: Медицина. — 1976. — 210 с.
6. *Пат.2067452 Россия,* МПК<sup>6</sup> А 61 К 35/78. Способ получения экстракта зверобоя // Мухамедзянов Р.М., Кулавский В.А., Пушкарев В.А., Хасанов Р.А.; НПО «Иммунопрепарат». - №93055781/14; Заявл. 15.12.1993; Оpubл. 10.10.1996. Бюл. № 6. — 3 с.
7. *Пат. 2205017 Россия,* МПК<sup>7</sup> А 61 К 35/78, В 01 D 11/02. Способ получения масляного экстракта, обладающего антимикробной активностью // Высочина Г.И., Волхонская Т.А., Якимова Ю.Л., Долгов В.И.; Центр. Сибирский ботан. сад СО РАН. — № 2001125135/14; Заявл. 12.09.2001; Оpubл. 27.05.2003. Бюл. № 8. — 5 с.
8. *Особенности процесса экстрагирования лекарственного растительного сырья двухфазными системами экстрагентов, содержащими компоненты суппозиторных основ* / Ю.Т. Демченко, И.Е. Каухова, В.А. Вайнштейн, Т.Х. Чибилев // Хим.-фарм. журн. — 2005. — Т.39. — № 11. — С.30-34.
9. *Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В.* Исследование сырья и препаратов зверобоя // Фармация. — 2005. — № 3. — С.23-25.
10. *Правдивцева О.Е., Куркин В.А.* Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного // Химия растит. сырья. — 2008. — № 1. — С.32-38.
11. *Коренская И.М., Ивановская Н.П., Измалкова И.Е.* Лекарственные растения и лекарственное растительное сырье, содержащие антраценпроизводные, простые фенолы, лигнаны, дубильные вещества. — Воронеж. — 2007. — 87 с.

Поступила в редакцию 7.05.2012