

УДК 615.322 : 615.451.16 : 661.91-404

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ СЖИЖЕННЫХ ГАЗОВ ДЛЯ ОЧИСТКИ АЛКАЛОИДОВ БАРБАРИСА

Демьяненко Д. В., Демьяненко В. Г.

Национальный фармацевтический университет,
кафедра товароведения
ул. Пушкинская 53, г. Харьков, Украина, 61002,
E-mail: tovaroved@ukrfa.kharkiv.ua

Введение

Биологически активные вещества (БАВ) корней барбариса, относящиеся к алкалоидам изохинолиновой группы, являются перспективными субстанциями для создания препаратов с различной фармакологической активностью. Известно, что они обладают выраженным бактерицидным действием против ряда протозойных и некоторых антибиотико-резистентных грам+ и грам- микроорганизмов [1, 2], в т.ч. и *Helicobacter pilori* [3]. Кроме того, алкалоиды барбариса проявляют противовоспалительную, желчегонную, гепатопротекторную и противоопухолевую активность [2, 4], и при этом низкую токсичность даже в дозах до 400 мг.

В бывшем СССР на основе указанных БАВ производился препарат «Берберина бисульфат», однако сейчас в большинстве стран СНГ он незаслуженно снят с производства. Возможной причиной этому были устаревшие технологии получения алкалоидов, предусматривающие использование токсичных и/или огнеопасных растворителей (хлороформа, этилацетата, толуола и т. п.) на стадиях экстракции и последующей очистки технического продукта в системе жидкость/жидкость [5]. Известны способы многостадийной очистки берберина на различных хроматографических колонках элюированием метанолом с последующей лиофильной сушкой [7], что значительно увеличивает экономическую себестоимость готового продукта. Также используется множество методов осаждения, в том числе изохинолиновых алкалоидов солями тяжёлых металлов [6], однако последние известны своей токсичностью, поэтому их возможные примеси в готовом продукте значительно снижают его качество.

В наших предыдущих исследованиях [8] была разработана технология экстрагирования суммы алкалоидов из корней барбариса с использованием смесей сжиженных газов (фреонов и аммиака). Поскольку они обладают низкими температурами кипения (минус 30–45°C), то полученный продукт не содержал остаточных количеств экстрагента.

Исходя из вышеизложенного, целью данной работы было обоснование возможности использования сжиженных газов или их смесей для очистки в системе жидкость/жидкость первичного экстракта, содержащего сумму алкалоидов корней барбариса.

Материалы и методы

Исходным растительным сырьём являлись корни барбариса обыкновенного *Berberis vulgaris*, заготовленные самостоятельно весной на территории Южной Украины. Ввиду отсутствия отечественной нормативной документации для оценки качества сырья использовали монографию ГФ Республики Беларусь, т. 2, с. 307. Используемая в данных исследованиях серия сырья характеризовалась следующими показателями: внешние признаки и микроскопия – согласно описанию ГФ РБ, с. 307; влажность – 11,7%; общая зола – 4,1%; посторонние примеси (органические – отсутствовали, минеральные – 0,61%); корни, почерневшие на изломе – 2,5%; зола, нерастворимая в соляной кислоте – 0,75%; содержание берберина – 1,36%. Таким образом, исследуемая серия корней барбариса по всем показателям соответствовала требованиям фармакопейной монографии. Кроме того, по разработанной нами методике, описанной в работе [9] была определена сумма алкалоидов, составлявшая 1,93% в пересчете на берберин и абсолютно сухое сырье.

Корни барбариса измельчали последовательно на эксцельсиоре (производство бывшего СССР) и на кофемолке (Saturn, Китай), для экспериментов отбирали фракцию с диаметром частиц 0,5-1,4 мм. Навески, загружаемые в лабораторную экстракционную установку, составляли 100 г.

Гравиметрические определения проводили на весах лабораторных 2-го класса точности VIC 123-120/0,001 (Acculab, Germany). В работе использовались следующие реактивы: кислота фосфорномолибденовая (Biochem, Франция), диэтиламин (Merck, Германия), фиксагалы серной кислоты и натрия гидроксида (НВП «Альфарус», Украина). Все реактивы и титрованные растворы были квалификации х.ч. или ч.д.а.

На стадиях очистки и экстракции алкалоидов применялись сжиженные газы: дифторхлорметан и 1,1,1,2-тетрафторэтан (Shandong Dongyue Chemical Co. Ltd, Китай, степень чистоты 99,9%), фреон-410А (99,7%, DuPont, Бельгия), изобутан, дифформетан (EcoFrost, Китай), аммиак жидкий марки Ак (99,6%, ГОСТ 6221-90, ЧАО «Северодонецкое объединение Азот», Украина).

Согласно заявленному способу получения алкалоидов [8] перед стадией экстракции БАВ предусматривается очистка сырья от липофильных примесей. С этой целью использовались следующие сжиженные газы: тетрафторэтан (фреон-134-а), изобутан, дифторхлорметан (фреон-22) и дифформетан (фреон-32). Количество липофильных примесей, извлечённых указанными растворителями, определяли гравиметрически.

Качественный состав суммы алкалоидов в исходном сырье и экстрактах исследовали методом тонкослойной хроматографии, как описано в работе [10]. В системе хлороформ-метанол-диэтиламин (80:20:0,5) было обнаружено 4-5 основных алкалоидов, один из которых соответствовал стандартному образцу бербе-

рина, и до 5 минорных. При этом во всех образцах экстрактов и в исходном сырье хроматографические профили не отличались [10].

Для оценки селективности экстрагента в полученных вытяжках проводили количественный анализ суммы алкалоидов по методике, описанной в работе [9], учитывая, что вместо точной навески корней барбариса использовали экстракт. Данная методика основана на осадительном титровании изохинолиновых алкалоидов и является доступной для любой лаборатории, т.к. не предусматривает использования

$$\dot{A} = \frac{2,114 \cdot (20,0 \cdot \hat{E}\ddot{I}_{\text{OIE}} - (V_{\text{NaOH}} - 20,0 \cdot \hat{E}\ddot{I}_{\text{H}_2\text{SO}_4}) \cdot 1,923) \cdot \hat{E}\ddot{I}_{\text{NaOH}} \cdot 10}{m_H \cdot 100}, \quad (1)$$

где V_{NaOH} – объем 0,1 М раствора натрия гидроксида, израсходованного на титрование, мл;

$K\text{П}_{\text{ФМК}}$, $K\text{П}_{\text{H}_2\text{SO}_4}$, $K\text{П}_{\text{NaOH}}$ – коэффициенты поправки титрованных растворов фосфорномолибденовой кислоты, серной кислоты и натрия гидроксида соответственно;

m_H – масса навески экстракта, г.

Экстракцию суммы алкалоидов проводили дифформетаном с добавлением 1%, 12%, 50% аммиака или 10% диэтиламина, как описано в патенте [8]. Температура на стадии мацерации составляла 20–25°C, последующую перколяцию осуществляли при 30–45°C и перемешивании экстрагента.

Полученные первичные экстракты из обезжиренных корней барбариса, содержащие сумму алкалоидов, подвергались двухступенчатой сжиженногазовой очистке на специальном модуле, принципиальная аппаратная схема которого представлена на рис. 1.

Основными аппаратами в данном модуле были два сепаратора первой ступени очистки М1 и М1а, в которых основания алкалоидов переводились в сульфаты (или гидрохлориды) и очищались от балластных примесей сжиженным фреоном-22, и два сепаратора второй ступени очистки М4 и М4а, где соли алкалоидов преобразовывались в основания и одновременно экстрагировались смесью дифформетана и аммиака. Для контроля границы разделения жидкостных фаз стенки всех сепараторов были снабжены вмонтированными на фланцах указателями уровня, сделанными из стекла Клингера, выдерживающего давление до 160 атм.

Полученные нами первичные экстракты помещали в сепараторы М1 и М1а, все сосуды герметично закупоривали, вакуумировали весь контур установки, из мерника М2 заливали в сепараторы по 1 л 10% водного раствора серной или хлороводородной кислоты (учитывая растворимость солей алкалоидов 1:200 – 1:500), потом заполняли сжиженным дифторхлорметаном из баллона или напорной ёмкости, подавая его сверху. Перемешивание жидкостных фаз проводили за счёт попеременного создания градиентов температур и, как следствие, давлений между сепараторами, подавая поочередно в рубашку одного из них

дорогих реагентов и оборудования. Кроме того, она характеризуется высокой точностью и селективностью к алкалоидам, которые осаждаются фосфорномолибденовой кислотой количественно и стехиометрично [11].

Содержание суммы алкалоидов A , % в пересчёте на берберин рассчитывали по формуле:

холодную воду из водопровода, а в рубашку другого – тёплую, поддерживая её температуру в пределах $40 \pm 5^\circ\text{C}$ термостатом Т7.

После 10 циклов перемешивания жидкости отстаивали до полного разделения фаз, фильтровали, наблюдая за границей раздела по указателям уровня, нижнюю фреоновую фазу сливали в испаритель, откуда отгоняли фреон в конденсор. Когда в смотровом окне КПЗ появлялся насыщенный жёлтый или оранжевый раствор, прекращали слив фреона и направляли водную фазу в сепараторы М4 и М4а, в которые затем добавляли по 1 л сжиженной смеси дифформетана с аммиаком в направлении снизу вверх.

Перемешивание осуществляли, как и на предыдущей ступени очистки. После отстаивания жидкостей нижнюю водную фазу передавляли в один из сепараторов М4 или М4а, контролируя границу раздела фаз с помощью указателей уровня. Фреоно-аммиачный раствор оснований алкалоидов сливали через фильтр-осушитель Ф5 в испаритель С6; когда в смотровом окне КПЗа появлялась мутная жидкость, слив сразу же прекращали. В сепараторы вводили новую порцию смеси дифформетана с аммиаком и операцию очистки водных фаз повторяли трижды описанным выше способом. Из сборника С6 отгоняли растворитель в конденсор и выделяли очищенный продукт. Водный раствор солей аммония и балластных примесей отправляли на утилизацию.

Очищенные экстракты высушивали до постоянной массы, взвешивали и количественно определяли в них содержание суммы алкалоидов, как описано выше.

Полученные результаты обрабатывали общепринятыми статистическими методами согласно фармакопее, учитывая, что доверительный интервал составляет 95%.

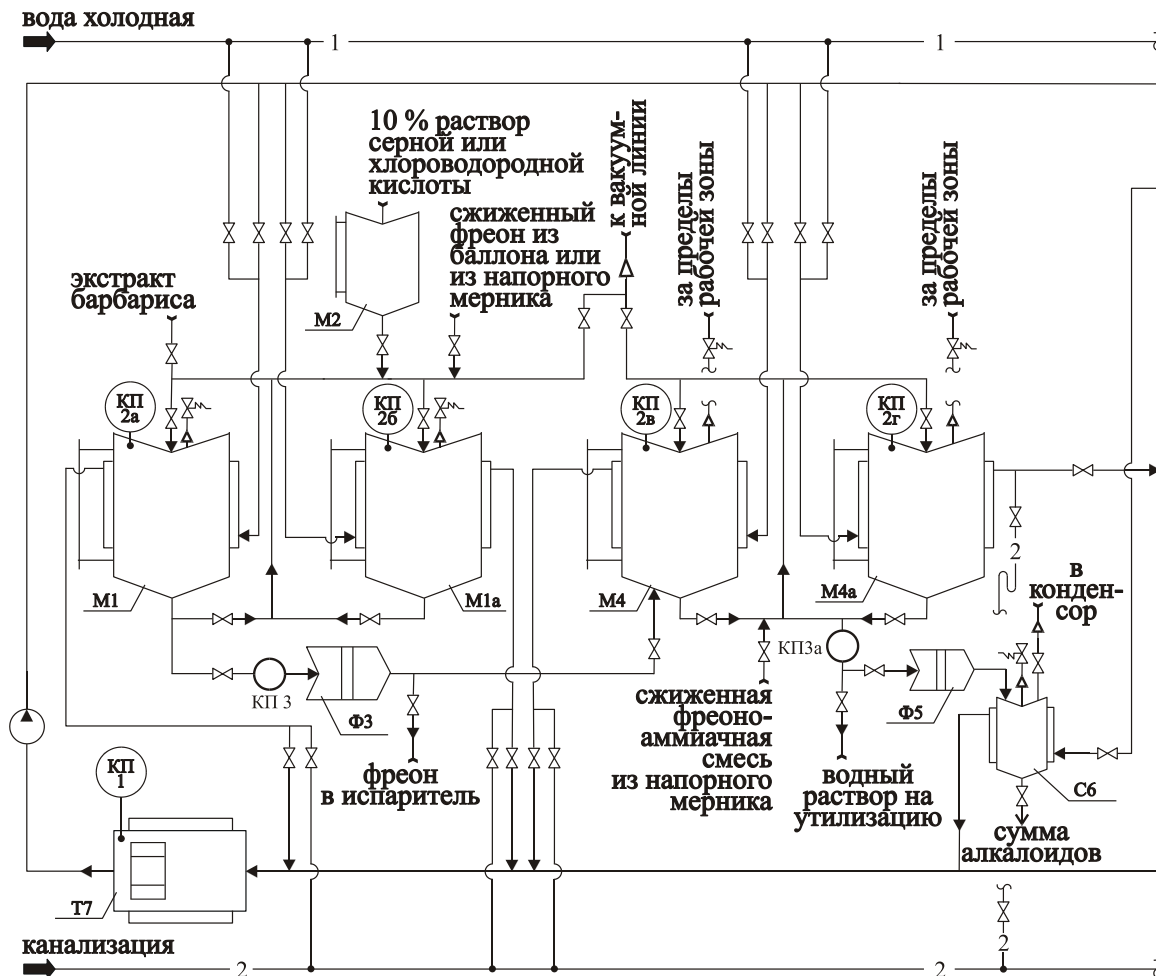


Рис. 1 : Аппаратурная схема модуля очистки алкалоидов барбариса: М1, М1а; М4, М4а – сепараторы соответственно первой и второй ступени очистки, снабженные указателями уровня, объемами по 6 л; М2 – напорный мерник объемом 2 л; Ф3 – фильтр предварительной очистки; Ф5 – фильтр тонкой очистки; С6 – сборник-испаритель экстракта; Т7 – теплообменник объемом 15 л, снабженный термостатом; КП1 – термометр; КП2а-2г – мановакуумметры аммиачные МВП-3А; КП3, КП3а – смтровые окна.

Результаты и обсуждение

Результаты гравиметрического определения липофильных балластных веществ, удалённых на стадии обезжиривания сырья, а также количество содержащихся в них алкалоидов, представлены в табл. 1.

Полученные данные указывают на то, что

наиболее селективным к липофильным балластным соединениям корней барбариса является изобутан, экстрагирующий наибольшее количество данных примесей и не извлекающий алкалоиды, что подтверждается статистически достоверными различиями по сравнению с дифторхлорметаном.

Таблица 1. Применимость различных сжиженных газов для обезжиривания корней барбариса перед стадией экстракции алкалоидов (навеска сырья 100 г)

| Используемый сжиженный газ | тетрафторэтан | изобутан | дифторхлорметан | фреон 410А | дифторметан |
|---|-------------------|------------------|-----------------|------------|-------------------|
| Количество удалённых из сырья липофильных соединений, г | 0,429± 0,032 | 0,527± 0,040* | 0,422± 0,038 | 0 | 0,403± 0,030 |
| Масса суммы алкалоидов в липофильном экстракте, г | 0,054± 0,003** | 0** | 0,017± 0,002 | 0** | 0,116± 0,005** |

Примечание: n=5; *, ** – статистически достоверно относительно дифторхлорметана.

Однако, изобутан является взрывоопасным, и его утечку из контура установки трудно обнаружить органолептически вследствие отсутствия запаха, что может привести к созданию взрывоопасной концентрации, поэтому в промышленном масштабе оборудо-

вание нужно оснащать системой газоанализаторов. Как альтернатива изобутану, подходящим является дифторхлорметан, экстрагирующий несколько меньшее количество липофильных примесей, но в то же время почти не растворяющий алкалоиды, которые в

сырье находятся в ионизированной форме, при этом данный экстрагент безопасен и экономически доступен.

При количественном анализе конечных продуктов было установлено (табл. 2), что эффективность стадии очистки алкалоидов барбариса в значительной мере зависела от состава экстрагента при выделении первичных экстрактов. Наилучшие показатели были выявлены в конечном продукте после очистки экстрактов, выделенных дифторметаном с добавлением 12 % аммиака: доброкачественность, показывающая процентное содержание целевых БАВ в общей массе экстракта, достигала 95 %, а потери алкалоидов были незначительны – 3,5 %. Увеличение содержания растворителя (аммиака) в экстрагенте до 50 % значительно затрудняло очистку экстрактивных веществ, и при этом возрастали потери алкалоидов до 13,2 %,

очевидно, в результате присутствия большого количества гидрофильных балластных веществ, которые могут образовывать труднорастворимые комплексы с алкалоидами и ухудшать разделение водной и органической фаз. Уменьшение содержания аммиака в экстрагенте до 1 % также оказывало негативное влияние на процесс получения алкалоидов, выход которых был самым низким (1,309 г) среди исследуемых образцов. Это можно объяснить меньшим значением pH в экстракционной среде, изменением полярности растворителя, в результате чего в состав первичных экстрактов переходили среднеполярные и гидрофобные соединения, ухудшающие процесс разделения алкалоидов между водной и органической (сжиженногазовой) фазами, увеличивая материальные потери целевых БАВ.

Таблица 2. Количественные характеристики конечных продуктов после стадии очистки первичных экстрактов корней барбариса

| Соразтворитель на стадии экстракции и его количество | 1 % аммиака (экстрагент 1) | 12 % аммиака (экстрагент 2) | 50 % аммиака (экстрагент 3) | 10 % диэтиламина (экстрагент 4) |
|--|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| Масса первичного экстракта, г | 1,802 ± 0,094 | 1,836 ± 0,102 | 4,548 ± 0,212* | 2,135 ± 0,118* |
| Масса конечного продукта, г | 1,608 ± 0,080 | 1,518 ± 0,077 | 1,920 ± 0,085* | 1,823 ± 0,092* |
| Масса балластных веществ в конечном продукте, г | 0,299 ± 0,011* | 0,079 ± 0,012 | 0,574 ± 0,024* | 0,408 ± 0,015* |
| Масса алкалоидов в конечном продукте, г | 1,309 ± 0,069 | 1,439 ± 0,065 | 1,346 ± 0,061 | 1,415 ± 0,077 |
| Содержание алкалоидов в конечном продукте (доброкачественность экстракта), % | 81,4 | 94,8 | 70,1 | 77,6 |
| Потеря алкалоидов при очистке % | 13,3* | 3,5 | 13,2* | 3,4* |

Примечание: n=5; * – статистически достоверно относительно экстрагента 2.

Выводы

Обоснована возможность использования сжиженных газов и их смесей для очистки суммы алкалоидов из корней барбариса. Показано, что перед стадией экстрагирования данных БАВ целесообразно проводить удаление липофильных примесей из сырья с помощью сжиженного дифторхлорметана (фреона-22). Эффективность очистки конечного продукта значительно зависит от состава экстрагента при выделении первичных экстрактов. Наилучшие показатели выявлены после очистки экстрактов, полученных дифторметаном с добавлением 12 % аммиака.

Очистку первичных экстрактов наиболее целесообразно производить двухступенчато с использованием в качестве органической фазы сжиженного дифторхлорметана (фреона-22) на первой ступени и дифторметана с добавлением 10% аммиака – на второй, а в качестве водной фазы – 10% раствор серной или хлороводородной кислоты; жидкостную реэкстракцию алкалоидов- оснований на второй ступени необходимо проводить трижды.

References

1. Ball, A. R. Conjugating berberine to a multidrug resistance pump inhibitor creates an effective antimicrobial / A. R. Ball, G. Casadei, S. Samosorn [et al.] // ACS Chem. Biol. – 2006. – Vol. 1, № 9. – P. 594–600.
2. Rashmi, A. The Genus Berberis Linn.: a Review / A. Rashmi, A. Rajasekaran, Jagdish Pant // Pharmacognosy Reviews. – 2008. – Vol. 2, № 4. – P. 369–385.
3. Mahady, G. B. In vitro susceptibility of Helicobacter pylori to isoquinoline alkaloids from Sanguinaria canadensis and Hydrastis canadensis / G. B. Mahady, S. L. Pendland, A. Stoia, L. R. Chadwick // Phytother Res. – 2003. – Vol. 17, № 3. – P. 217–221.
4. Soboleva, V. A. Berberis vulgaris is a source of preparations for allopathy, homeopathy, phytotherapy and folk medicine / V. A. Soboleva, O. S. Dan'kevich // Provisor. – 2002. – № 2. – P. 37–41.
5. Pat. RU 2141837, IPC 6 A61K35/78, A61K31/435. Method of preparing sanguiritrin / Savina A. A., Tolkahev O. N., Glyzin V. I. [et al.] ; applicant Nauchno-

производственое об"единение "Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut lekarstvennykh i aromatischeskikh rastenij". – № 97108032/14 ; appl. 19.05.1997 ; publ. 27.11.1999.

6. Pat. CN 101269132, IPC A61K36/718, A61P31/04, A61P31/10, C07D455/03. Coptis chinensis total alkaloid extracting technique / Xiaoli Ye, Xuegang Li, Lujiang Yuan (CN) ; applicant Univ. Southwest (CN). – № CN20081069671 ; appl. 14.05.2008 ; publ. 24.09.2008.

7. Pat. KR 100302487, IPC C07D491/14. Extraction and purification method of berberine / Ham Seung Si, Oh Deok Hwan, Yoo Jae Hong, Yoo Jin Yeong (KR) ; applicants Ham Seung Si, Oh Deok Hwan, Yoo Jae Hong (KR). – № KR19980043012 ; appl. 14.10.1998 ; publ. 03.07.2001.

8. Pat. UA 102884, IPC (2013.01) A61K 36/00, A61K 31/33. Process for the preparation of alkaloids from plant raw material / Demianenko D. V. (UA) ; applicant National University of Pharmacy (UA). – № a201110544 ; appl. 31.08.11 ; publ. 27.08.13, № Bull. 16.

9. Demianenko, D. V. Study of extraction process of barberry roots with condensed gases / D. V. Demianenko // Phitoterapiya Chasopis. – 2011. – № 3. – P. 62–66.

10. Demianenko, D. V. Study for qualitative composition of condensed gas extracts from *Berberis vulgaris* roots / D. V. Demianenko // Pharmaceutical review. – 2011. – № 4. – P. 28–33.

11. Stepnevskaya, Y. V. The physico-chemical methods of the separation and determination of the sum of *Chelidonium Majus L.* alkaloids. – Manuscript. The thesis for a scientific degree of Candidate of Sciences in Chemistry. The speciality : 02.00.02 – Analytical Chemistry. – Odessa, 2003.

UDC 615.322 : 615.451.16 : 661.91-404
POSSIBILITY FOR APPLICATION OF LIQUEFIED GASES FOR PURIFICATION OF BARBERRY ALKALOIDS

Demianenko D. V., Demianenko V. G.

Introduction. Biologically active substances (BAS) of barberry roots represented by alkaloids of isoquinoline group are perspective substances for development of preparations with multiple pharmacological activities. However, now manufacture of them in Ukraine is stopped. One of the reasons of this is out-of-date production technologies of alkaloids involving use of toxic and/or flammable solvents. In the article possibility for application of liquefied gases in technology of obtaining of alkaloids from barberry roots has been studied. **Materials and methods.** Initial raw herb drug were barberry (*Berberis vulgaris*) roots harvested in spring on the territory of Southern Ukraine. Their moisture content was 11%, comminuting degree was 0,5-1,4 mm. At the first stage purification of raw herb drug from lipophilic impurities (defatting) was made with use of some liquefied gases: tetrafluoroethane, isobutane, difluorochloromethane and difluoromethane. Extraction of the alkaloid sum was made with difluoromethane mixed with various quantities of liquid ammonia or diethylamine as alkaline

agent. Crude extracts were exposed to two-level liquefied-gas purification. At first the alkaloid bases were transformed into saline forms with aqueous solutions of acids and purified from ballast impurities with liquefied freon-22. Then alkaloid salts were reextracted from aqueous phase in the base form with liquefied mixture of difluoromethane and ammonia. Mixing of liquid phases was provided by creation of alternate gradients of temperatures and, as consequence, pressures between separators feeding alternately cool water into jacket of one of them, and warm water – into jacket of another one. Quantity of lipophilic ballast impurities and also weight of extractives were determined gravimetrically. Quantitative analysis of the alkaloid sum was made by titrimetric method after sedimentation of alkaloids with volumetric solution of phosphomolybdic acid. **Results and discussion.** It has been found that at stage of degreasing of raw crude drug the most selective solvent to lipophilic ballast compounds was isobutane and difluorochloromethane, but the latter was more rational for using in industrial scale concerning its fire-safety and economic availability. It has been also found that efficiency of the purification stage of *Berberis* alkaloids appreciably depends on composition of extracting solvent while obtaining of crude extracts. The best parameters in the finished product have been revealed after purification of the extracts obtained with difluoromethane containing 12% of liquid ammonia: quantity of BAS (alkaloids) in the finished product reached 95%, and their losses were insignificant – 3,5%. Increasing of cosolvent (ammonia) content in the extracting solvent considerably complicated purification of extractives, and losses of alkaloids raised to 13,2%, obviously as a result of presence of considerable quantity of hydrophylic ballast substances. Reducing of the ammonia content in the extracting solvent down to 1% also caused negative impact on process of obtaining of the alkaloids which yield was the lowest among investigated assays. It's possible to explain this by lower pH value in extracting medium, change of solvent polarity, therefore middle-polar and hydrophobic compounds preferably passed into composition of crude extracts. **Conclusions.** Acceptability for use of liquefied gases and their mixtures for purification of the alkaloid sum from barberry roots has been proved. It has been shown that prior to stage of extraction of these BAS it's expedient to withdraw lipophilic impurities from the crude herbal drug with liquified difluorochloromethane (freon-22). Purification efficiency of the finished product considerably depends on composition of extracting solvent during obtaining of crude extracts. The best parameters were found after purification of the extracts taken with difluoromethane containing 12% of liquid ammonia. It's the most expedient to purify crude extracts by two-step procedure using on the first step liquefied difluorochloromethane (freon-22) as organic phase and on the second one – difluoromethane mixed with 10% of ammonia, and as aqueous phase – 10 % acidic solutions; at the second step it's necessary to provide liquid re-extraction of the alkaloid bases in triplicate.

Keywords: barberry roots, alkaloids, liquefied gases, purification.