

УДК 634.73:[577.164.2:641.524.6]

ЭКСТРАГИРОВАНИЕ ГИПЕРИЦИНА И ПСЕВДОГИПЕРИЦИНА ИЗ ЗВЕРБОЯ ПРОДЫРЯВЛЕННОГО В УСЛОВИЯХ МИКРОВОЛНОВОЙ АКТИВАЦИИ ПРОЦЕССА

© *В.В. Пунегов^{1*}, В.И. Костромин¹, М.Г. Фомина¹, В.Г. Зайнуллин¹, Е.А. Юшкова¹, Д.В. Белых²,
И.Ю. Чукичева², Г.Г. Зайнуллин²*

¹Институт биологии Коми НЦ УрО РАН, ул. Коммунистическая, 28,
Сыктывкар, 167982 (Россия), e-mail: punegov@ib.komisc.ru

²Институт химии Коми НЦ УрО РАН, ул. Первомайская, 48, Сыктывкар,
167982 (Россия), e-mail: chukicheva-iy@chemi.komisc.ru

Исследовано влияние основных параметров на экстрагирование с микроволновой активацией нафтодиантроновых пигментов (гиперицина и псевдогиперицина) из сырьевой фитомассы звербоя продырявленного *Hypericum perforatum*. Установлено, что максимальное извлечение указанных пигментов достигается при применении в качестве экстрагентов 55%-ного этанола или изопропанола при гидромодуле, равном 40, при удельной мощности микроволнового излучения 0,0205 Вт/см³ при частоте 2450 МГц и продолжительности воздействия СВЧ – 60 с.

Ключевые слова: *Hypericum perforatum*, гиперин, псевдогиперин, микроволновая экстракция, гидромодуль, состав экстрагента, спектрофотометрия.

Работа выполнена при финансовой поддержке Программы Президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций», проект № 12-П-34-2009 «Новые производные природных пигментов (гиперицина, псевдогиперицина, хлорофилла а) для диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний: синтез и исследование сенсбилизирующей активности», а также гранта корпорации «Сибирское здоровье», № 12-750.

Введение

Пунегов Василий Витальевич – старший научный сотрудник, кандидат химических наук,
e-mail: punegov@ib.komisc.ru

Костромин Василий Иванович – ведущий инженер,
e-mail: kostromin@ib.komisc.ru

Фомина Марина Геннадьевна – старший лаборант-исследователь

Зайнуллин Владимир Габдуллович – заведующий отделом радиоэкологии, доктор биологических наук, профессор, e-mail: zainullin@ib.komisc.ru

Юшкова Елена Александровна – научный сотрудник отдела радиоэкологии, кандидат биологических наук,
e-mail: ushkova@ib.komisc.ru

Белых Дмитрий Владимирович – старший научный сотрудник, кандидат химических наук, доцент,
e-mail: belykh-dv@mail.ru

Чукичева Ирина Юрьевна – ведущий научный сотрудник, кандидат химических наук, доцент,
e-mail: chukicheva-iy@chemi.komisc.ru

Зайнуллин Геннадий Габдуллович – старший научный сотрудник, кандидат геолого-минералогических наук,
тел.: (8212) 21-99-16, факс: (8212) 21-84-77

В технологии получения биологически активных соединений (БАС) из растительного сырья наиболее ресурсоемкой и поныне остается стадия экстракции. В данной работе основное внимание уделено относительно новому методу активации процесса массопереноса в системе капиллярно-пористое тело – жидкость под воздействием микроволнового излучения. Нами исследовано влияние ряда параметров (состав экстрагента, гидромодуль и др.) на экстрагирование с микроволновой активацией нафтодиантроновых пигментов (гиперицина и псевдогиперицина) из сырьевой фитомассы звербоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L).

В научной литературе за методом микроволновой экстракции закрепился термин microwave assisted extraction (MAE) [1]. В связи с этим в работе использована в виде сокращения для микроволновой экстракции аббревиатура MAE.

* Автор, с которым следует вести переписку.

В качестве модельных соединений были выбраны пигменты гиперидин (1) и псевдогиперидин (2) (рис. 1). Все результаты исследований, приведенные в данной работе, получены с применением бытовой микроволновой камеры LG MS2322T в периодическом режиме извлечения экстрактивных веществ из растительного сырья. Полученные экспериментальные данные являются основой для масштабирования технологии экстракции указанных соединений на противоточную систему МАЕ непрерывного действия.

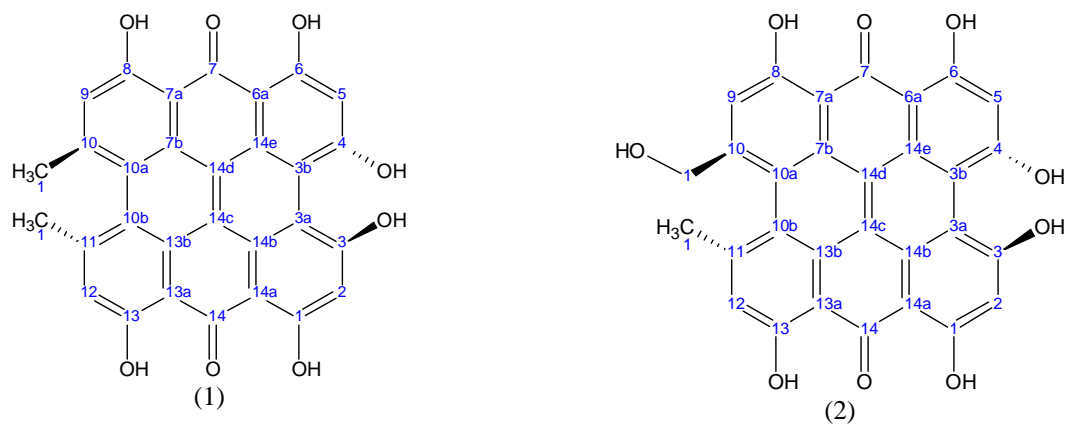


Рис. 1. Химическая структура гиперидина (1) и псевдогиперидина (2)

Зверобой продырявленный *Hypericum perforatum* L. (сем. *Hypericaceae* Juss.) наряду с другими видами указанного семейства является источником для получения нафтодиантроновых пигментов. Учитывая, что массовая доля суммы нафтодиантроновых пигментов в сырьевой фитомассе зверобоя продырявленного лежит в пределах 0,03–0,08% и редко превышает 0,1% [2], препаративно чистые гиперидин и псевдогиперидин остаются в перечне наиболее дорогостоящих субстанций как медицинского, так и немедицинского назначения. Так, по каталогу Sigma Aldrich стоимость 10 мг гиперидина (95%) составляет 298,5 € [3], а стоимость 5 мг псевдогиперидина (95%) – 466,5 € [4]. В связи с этим разработка новых способов получения указанных пигментов, отличающихся высокой эффективностью и низкой ресурсоемкостью, является актуальной задачей для исследователей.

H. perforatum был выбран в качестве модельного объекта при оптимизации технологии МАЕ не только из-за ценности нафтодиантроновых пигментов, но и из-за уникальной визуальной информативности процесса МАЕ указанных пигментов. Водно-спиртовые растворы гиперидина и псевдогиперидина даже в концентрациях мкг/см³ имеют ярко-красную окраску, и эффективность МАЕ указанных пигментов может быть оценена, в некоторой степени, визуально при наличии у технолога спиртовых растворов пигментов с градацией концентрации.

Экспериментальная часть

В качестве материала для исследований использовали сырьевую фитомассу растения *H. perforatum* L., собранную с экспериментальных делянок Ботанического сада Института биологии Коми НЦ УрО РАН в фазе массового цветения. Растительное сырье высушивали до воздушно сухого состояния вне действия прямого солнечного света и перемалывали в травяную муку, проходящую через сито с ячейкой 0,5 мм. В качестве экстрагентов использовали водные растворы спиртов разной концентрации: этилового (ректификованного, высшей очистки) и изопропилового «хч».

Выполнение МАЕ нафтодиантроновых пигментов зверобоя. С целью определения зависимости общего выхода суммы гиперидин + псевдогиперидин от содержания этанола навески по 500,0 мг травяной муки *H. perforatum* с остаточной влажностью 6% вносили в 12 мерных колб объемом 25 см³. Приливали в каждую колбу по 15 см³ хлороформа, озвучивали суспензии в колбах в ультразвуковой ванне УЗВ-2/150-ТН (ООО «Рэлтек», Россия) в течение 30 с и выдерживали при комнатной температуре 30 мин. Хлороформный экстракт хлорофиллов и липидов зверобоя отфильтровывали на манифольде через слой ваты и бумажного фильтра «синяя лента» (поверх ватного тампона) в вакууме водоструйного насоса. Фильтрат собирали для рекуперации хлороформа. Аналогичным образом выполняли повторную и третью экстракцию из сырья липидов и хлорофиллов свежими порциями хлороформа в объеме 15 см³. Обезжиренное сырье высушивали в токе воздуха на фильтре в полипропиленовых цилиндрах манифольда эвакуацией паров хлороформа водоструйным насосом.

Высушенное сырье в цилиндрах манифольда смешивали, добавляя по 15 см³ экстрагента с градацией объемной доли этанола от 20 до 90%. Цилиндры с суспензией сырья – экстрагент отсоединяли от манифольда, помещали в стакан емкостью 1000 см³, а последний вносили в микроволновую камеру. МАЕ выполняли в бытовой микроволновой камере LG MS2322T при мощности микроволнового излучения 600 Вт (удельная мощность СВЧ в условиях эксперимента 0,0205 Вт/см³ при частоте 2450 МГц). Суспензию сырья – экстрагент нагревали в СВЧ камере до 65 °С в течение 60 с. Цилиндры с экстрактами извлекали из микроволновой камеры и отфильтровывали первичный экстракт на манифольде. Экстракты, полученные после первого контакта фаз, переносили в мерные колбы объемом 25 см³ и разбавляли 95% этанолом до метки. Аналогичным образом получали экстракты после второго и третьего контактов фаз. Отработанное сырье утилизировали. Эксперимент выполняли в трехкратной повторности. Общий выход суммы гипериперин+псевдогипериперин определяли методом спектрофотометрии 108 образцов экстрактов при длине волны 590 нм на приборе UV1700 Shimadzu Ind. Ink. (Япония) по методике В.В. Беликова с соавторами [5].

Данные аналитических исследований приведены на рисунке 2. МАЕ пигментов зверобоя с применением в качестве экстрагентов водных растворов ИПС различной концентрации была выполнена аналогичным образом. Данные аналитических исследований приведены на рисунке 3.

МАЕ пигментов зверобоя с вариацией гидромодуля процесса от 20 до 48 с применением в качестве экстрагента 55% этанола выполнено аналогичным образом. Все эксперименты выполняли в трехкратной повторности при гидромодулях, равных 20, 30, 40 и 48. Данные аналитических исследований 12 экстрактов приведены на рисунке 4.

Наряду с МАЕ пигментов зверобоя выполнены эксперименты по извлечению суммы гипериперин+псевдогипериперин методом мацерации 55 % этанолом при гидромодуле процесса, равном 40. С этой целью суспензию сырья – экстрагент нагревали в цилиндрах манифольда при периодическом перемешивании на водяной бане до 65 °С в течение 3, 30, 60, 120 мин при первом контакте фаз, 3, 30, 30 и 30 мин при втором и третьем контактах фаз. Все эксперименты выполняли в трехкратной повторности. Прочие условия были аналогичны условиям эксперимента и аналитического сопровождения при МАЕ экстракции. Аналитические данные по динамике мацерации суммы гипериперин+ псевдогипериперин приведены на рисунке 5.

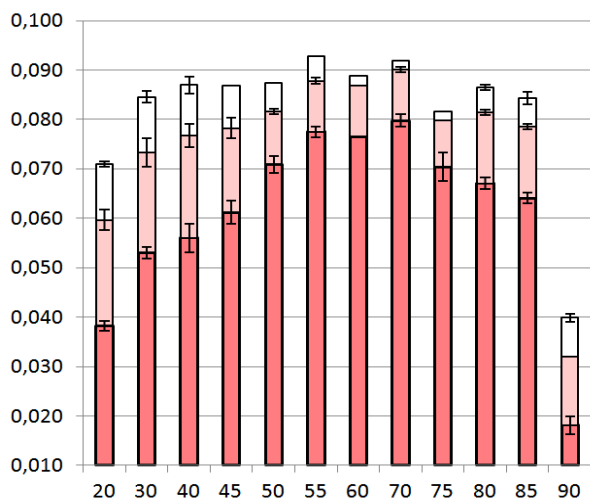


Рис. 2. Зависимость общего выхода суммы нафтодиантроновых пигментов гипериперин+псевдогипериперин от концентрации этанола в результате МАЕ. По оси ординат: массовая доля суммы гипериперин + псевдогипериперин, %; по оси абсцисс: объемная доля этанола в экстрагенте, %; ■ – экстракт после первого контакта фаз, □ – экстракт после второго контакта фаз, □ – экстракт после третьего контактов фаз

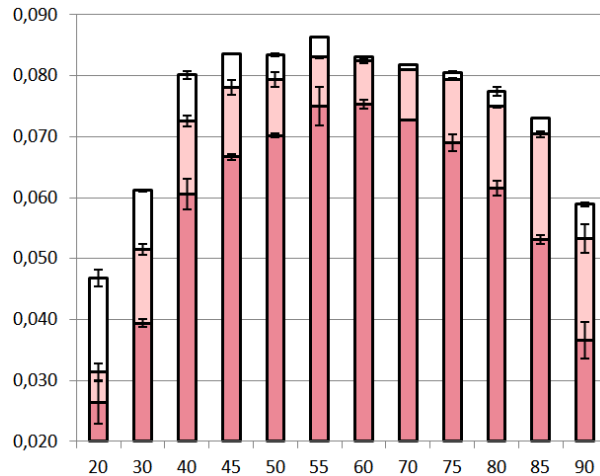


Рис. 3. Зависимость общего выхода суммы нафтодиантроновых пигментов гипериперин+псевдогипериперин от концентрации ИПС в результате МАЕ. По оси ординат: массовая доля суммы гипериперин+псевдогипериперин, %; по оси абсцисс: объемная доля ИПС в экстрагенте, %; ■, □, □ – экстракт после первого, второго и третьего контактов фаз соответственно

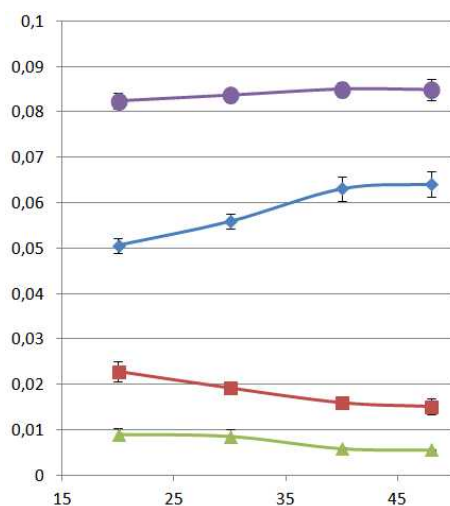


Рис. 4. Зависимость общего выхода суммы нафтодиантроновых пигментов гиперидин+псевдогиперидин от гидромодуля процесса в результате МАЕ. По оси ординат: массовая доля суммы гиперидин + псевдогиперидин, %; по оси абсцисс: гидромодуль процесса (отношение объема экстрагента к массе сырья). Состав экстрагента – 55% этанол; ♦, ■, ▲ – экстракт после первого, второго и третьего контактов фаз, ● – суммарный экстракт после трех стадий извлечения

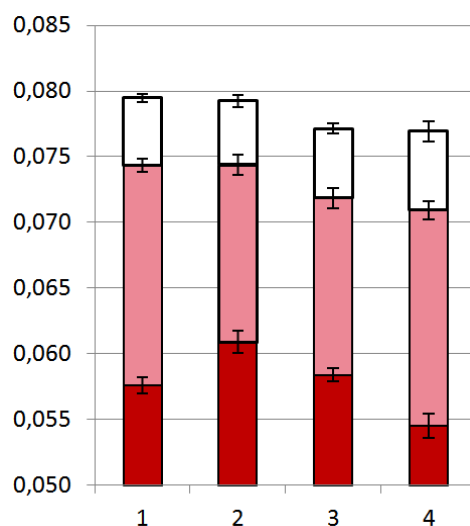


Рис. 5. Зависимость общего выхода суммы гиперидин+псевдогиперидин (%) из сырьевой фитомассы *H. perforatum* от продолжительности мацерации и кратности стадий экстракции; ■, ■, □ – экстракт после первого, второго и третьего контактов фаз; продолжительность мацерации: 1 – по 3 мин трехкратно, 2 – 30 мин трехкратно, 3 – 60 мин – первая стадия мацерации и по 30 мин – вторая и третья стадии мацерации, 4 – 120 мин – первая стадия мацерации и по 30 мин – вторая и третья стадии мацерации

Обсуждение результатов

Метод МАЕ был впервые предложен в 1975 г. Abu- Samra и соавт. [6] были первыми исследователями, которые использовали микроволновую печь для лабораторного анализа следовых количеств металлов в биологических образцах. Только через десять лет (1986 г.) после этого появились публикации, содержащие методики микроволновой экстракции липидов, антинутриентов и пестицидов из почвы, семян и продуктов в нескольких миллилитрах растворителя [7]. Они облучали суспензии в течение 30 с до 7 раз в бытовой микроволновой печи. С тех пор методики МАЕ были разработаны для извлечения растворимых компонентов из различных типов образцов, таких как растительные, экологические, биологические, геологические и металлические матрицы. Одновременно стремительно развивалась техника и технология МАЕ. Появились коммерческие экстракторы для лабораторной МАЕ как в закрытых реакторах, так и в открытых (сообщающихся с атмосферой) системах.

Зависимость общего выхода суммы гиперидин+псевдогиперидин от концентрации этилового спирта в экстрагенте при МАЕ. По данным литературы [8], нафтодиантроновые пигменты зверобоя наиболее эффективно экстрагируются классическими методами экстракции с применением 70% этанола. С учетом того, что в условиях МАЕ происходит интенсивное нарушение водородных связей и, как следствие, повышение доступности целевых соединений для экстракции растворами спирта в воде, представлялось целесообразным исследовать зависимость выхода суммы гиперидин+псевдогиперидин при МАЕ от концентрации этанола и изопропанола в экстрагенте.

Этанол был выбран как наименее токсичный, экономичный, сравнительно легко кипящий растворитель, изопропанол – как доступный и малотоксичный экстрагент. Результаты исследований отражены на рисунках 2, 3.

Как следует из рисунка 2, большая часть нафтодиантроновых пигментов экстрагируется при первом контакте фаз в условиях МАЕ. С ростом концентрации этанола от 20 до 55% наблюдается линейный рост практического выхода суммы гиперидин+псевдогиперидин от 0,04 до 0,08% в пересчете на абсолютно сухое сырье. Дальнейшее повышение концентрации этанола в экстрагенте от 55 до 70% не приводит к достоверно значимому увеличению выхода пигментов зверобоя. При увеличении объемной доли этанола от 70 до 90%

происходит достоверно выраженное снижение практического выхода нафтодиантроновых пигментов зверобоя по причине резкого снижения набухаемости сырья в экстрагентах с концентрацией спирта более 70%.

Выполнение второго и третьего контакта фаз при МАЕ приводит к некоторой нивелировке зависимости практического выхода пигментов зверобоя от концентрации этанола. Отличие практического выхода пигментов зверобоя в интервале концентраций этанола от 30 до 85% становится в условиях выполненного эксперимента недостоверным. Практический выход пигментов зверобоя в указанном интервале концентраций спирта составляет 0,082–0,093%.

Вместе с тем полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что минимальная эффективная концентрация этанола в экстрагенте, обеспечивающая исчерпывающее извлечение нафтодиантроновых пигментов зверобоя, равняется 55%.

Аналогичным образом была исследована зависимость выхода суммы гиперипин+псевдогиперипин при МАЕ от концентрации изопропанола (ИПС) в экстрагенте. ИПС является альтернативой этанолу в процессах экстракции, характеризуется более высокой температурой кипения 82,4 °С (азетропная смесь ИПС – вода – 80 °С), а, следовательно, и меньшей вероятностью выброса экстракционной массы в результате аварийного перегрева при МАЕ в открытых системах.

Как следует из рисунка 3, с повышением концентрации ИПС от 20 до 55% наблюдается также линейный рост выхода суммы гиперипин+псевдогиперипин при первом контакте фаз от 0,025 до 0,075%. Дальнейшее повышение концентрации ИПС от 60 до 90% сопровождается снижением выхода пигментов из растительного сырья от 0,075 до 0,037%, обусловленным уменьшением набухаемости растительного сырья в экстрагентах с высоким содержанием ИПС. В процессе второго и третьего контактов фаз при гидромодуле, равном 30, с применением свежих порций экстрагентов удается нивелировать, в некоторой степени, зависимость общего выхода указанных пигментов зверобоя от концентрации ИПС. Различия в выходе пигментов в результате трехкратной экстракции становятся незначительными в интервале концентраций ИПС от 40 до 75% (0,08 и 0,081% соответственно).

Следует отметить, что минимальная эффективная концентрация ИПС, при которой наблюдается максимальный выход пигментов зверобоя (0,086%), так же, как и для этанола, соответствует 55%. Вместе с тем использование ИПС не обеспечивает исчерпывающего извлечения гиперипина и псевдогиперипина из зверобоя, что обусловлено более низкой диэлектрической проницаемостью данного растворителя и, как следствие, менее энергичного воздействия микроволнового поля на систему капиллярно-пористое тело – жидкость [1].

По данным ранее выполненных нами исследований, гидромодуль процесса экстракции является одним из основных факторов, влияющих на степень извлечения суммы пигментов зверобоя гиперипин+псевдогиперипин, независимо от метода экстракции. В связи с этим необходимо было выяснить воздействие указанного фактора на эффективность МАЕ пигментов зверобоя. Как следует из данных исследований (рис. 4), с увеличением гидромодуля от 20 до 40 наблюдается линейный рост общего выхода пигментов зверобоя гиперипин + псевдогиперипин и особенно это проявляется при первом контакте фаз. Дальнейшее увеличение гидромодуля процесса МАЕ от 40 до 48 уже не приводит к достоверно значимому росту степени извлечения суммы пигментов гиперипин+псевдогиперипин. Таким образом, нами установлено, что только при гидромодуле не менее 40 достигается эффективная экстракция указанных пигментов зверобоя в процессе МАЕ.

Для сравнения исследована эффективность экстракции суммы гиперипин+ псевдогиперипин пигментов без микроволновой активации. Как следует из рисунка 5, метод мацерации сырья при 65 °С при гидромодуле 40 в целом малоэффективен. Только при экспрессной мацерации в указанных условиях (3–30 мин), после трехкратного контакта фаз удается достичь степени извлечения указанных пигментов, равной 86,4%. При увеличении продолжительности процесса от 30 до 120 мин (при первом контакте фаз) наблюдается окислительная дегградация указанных пигментов, сопровождающаяся снижением степени их извлечения из лекарственной фитомассы до 83,6%. Таким образом, было установлено, что метод МАЕ гиперипина и псевдогиперипина является частным примером повышения эффективности извлечения БАС из растительного сырья. При этом затраты времени непосредственно на осуществление экстракции в сумме составляют 3 мин, что примерно в 20 раз меньше, чем для выполнения экстракции кипячением сырья в ацетоне при гидромодуле 1 : 100 [5], или 60 раз меньше, чем при выполнении трехкратной экстракции кипячением в 70% этаноле при гидромодуле 1 : 20 [9].

Выводы

Полученные экспериментальные данные позволяют утверждать, что метод МАЕ является одним из наиболее эффективных методов экстракции относительно термостабильных биологически активных соединений из растительного сырья, в частности, гиперипина и псевдогиперипина из зверобоя продырявленного.

ного. Использование метода МАЕ в технологии получения указанных веществ позволяет в десятки раз сократить продолжительность стадии исчерпывающей экстракции растительного сырья.

Список литературы

1. Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. Microwave assisted extraction – An innovative and promising extraction tool for medicinal plant research // *Pharmacognosy Reviews*. 2007. Vol. 1, N1. Pp. 7–18.
2. Портнягина Н.В., Эчишвили Э.Э., Пунегов В.В., Мишуков В.П. Ресурсная характеристика *Hypericum perforatum* (*Hypericaceae*) в условиях интродукции (Республика Коми) // *Растительные ресурсы*. 2009. Т. 45, вып. 2. С. 48–57.
3. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/00190180>
4. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h9416>
5. Беликов В.В., Точкова Т.В., Шатунова Л.В., Колесник Н.Т., Баяндина И.И. Количественное определение основных действующих веществ у видов *Hypericum* L. // *Растительные ресурсы*. 1990. Т. 26, вып. 4. С. 541–578.
6. Abu-Samra A., Morris J.S., Koirtiyohann S.R. Wet ashing of some biological samples in a microwave oven // *Analytical Chemistry*. 1975. Vol. 47. Pp. 1475–1477.
7. Ganzler K., Bati J., Valko K. A new method for the extraction and high- performance liquid chromatographic determination of vicine and convicine in fava beans. In. *Proceedings of the 2nd International Eastern European-American Symposium of Chromatography* // *J. Chromatography*. 1986. Vol. 371. Pp. 299–306.
8. Агабалаев А.А., Каранкевич Е.Г., Попова О.П., Куваева З.И. Экстракция гиперического из зверобоя продырявленного *Hypericum perforatum* // *Известия НАН Беларуси. Серия химических наук*. 2011. № 4. С. 40–42.
9. Сычев Р.Л., Пунегов В.В. Интенсификация экстракции псевдогиперического и гиперического из травы *Hypericum perforatum* L. в СВЧ-поле // *Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья*. Барнаул, 2007. С. 92–96.

Поступило в редакцию 21 марта 2013 г.

Punegov V.V.^{1*}, Kostromin V.I.¹, Fomina M.G.¹, Zaynullin V.G.¹, Yushkova E.A.¹, Belyh D.V.², Chukicheva I.U.², Zaynullin G.G.² EXTRACTION OF HYPERICIN AND PSEUDOHYPERICIN OF HYPERICUM PERFORATUM IN MICROWAVE ACTIVATION PROCESS

¹*Institute of Biology, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Kommunisticheskaya st., 28, Syktyvkar, 167982 (Russia), e-mail: punegov@ib.komisc.ru*

²*Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Pervomaiskaya st., 48, Syktyvkar, 167982 (Russia)*

The influence of the main parameters for extraction with microwave activation pigments (hypericin and pseudohypericin) of raw phytomass *Hypericum perforatum* were studied here. It was found that the maximal extraction of the pigments is achieved using 55% ethanol or isopropanol as extractants and liquor equal to 40 (power density of microwave radiation at a frequency of 0,0205 W/cm³ 2450 MHz and duration of microwave 60 seconds). It was experimentally proved that the method of extracting the microwave activation of hypericin and pseudohypericin of *Hypericum perforatum* is a particular example of the intensification of mass transfer in a system of capillary porous body-liquid. Found that microwave activation method allows extraction of ten times to reduce the time necessary to fully extract of *Hypericum perforatum* pigments compared with the classical methods of extraction.

Keywords: *Hypericum perforatum*, hypericin, pseudohypericin, microwave assisted extraction, water duty, the composition of the extractant, spectrophotometry

References

1. Mandal V., Mohan Y., Hemalatha S. *Pharmacognosy Reviews*, 2007, vol. 1, no. 1, pp. 7–18.
2. Portniagina N.V., Echishvili E.E., Punegov V.V., Mishurov V.P. *Rastitel'nye resursy*, 2009, vol. 45, no. 2, pp. 48–57. (in Russ.).
3. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/00190180>
4. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h9416>
5. Belikov V.V., Tochкова T.V., Shatunova L.V., Kolesnik N.T., Baiandina I.I. *Rastitel'nye resursy*, 1990, vol. 26, no. 4, pp. 541–578. (in Russ.).
6. Abu-Samra A., Morris J.S., Koirtiyohann S.R. *Analytical Chemistry*, 1975, vol. 47, pp. 1475–1477.
7. Ganzler K., Bati J., Valko K. *J. Chromatography*, 1986, vol. 371, pp. 299–306.
8. Agabalaev A.A., Karankevich E.G., Popova O.P., Kuvaeva Z.I. *Izvestiia NAN Belarusi, seriia Khimicheskikh nauk*, 2011, no. 4, pp. 40–42. (in Russ.).
9. Sychev R.L., Punegov V.V. *Novye dostizheniia v khimii i khimicheskoi tekhnologii rastitel'nogo syr'ia*. [New advances in chemistry and chemical engineering plant materials.]. Barnaul, 2007, pp. 92–96. (in Russ.).

Received March 21, 2013

* Corresponding author.