

УДК 615.332:582.998.2.03

**Спектрофотометрическое исследование
накопления хлорофилла и его производных
в экстрактах Melissa лекарственной
при использовании двухфазной
системы растворителей**

Л.В. Наймушина^{а*},

А.Ю. Карасева^а, Н.В. Чесноков^{а,б}

^а Сибирский федеральный университет

Россия 660041 Красноярск, Свободный, 79,

^б Институт химии и химической технологии СО РАН,

Россия 660036 Красноярск, Академгородок, 50-24 ¹

Received 10.09.2012, received in revised form 17.09.2012, accepted 24.09.2012

*Методом спектрофотометрии исследованы закономерности извлечения хлорофилла и его производных (ПХ) из Melissa лекарственной *Melissa officinalis* при двухфазной экстракции в системе «водный раствор этанола (60 %) – рапсовое масло». Количественный анализ содержания ПХ в масляных фазах экстрактов показал, что применение системы несмешивающихся растворителей по сравнению с однофазной экстракцией рапсовым маслом повышает выход в 1,5-2 раза при увеличении времени процесса с 6 до 30 часов соответственно. При создании устойчивой эмульсии в системе несмешивающихся растворителей с помощью поверхностно-активного вещества второго рода – лецитина – эффективность извлечения ПХ возрастает в 2,5–3,7 раза соответственно.*

Ключевые слова: растительное сырье, биологически активные вещества (БАВ), хлорофилл и его производные, двухфазная экстракция, спектрофотометрическое исследование.

Несомненным достоинством всех видов лекарственного растительного сырья является разнообразие биологически активных веществ (БАВ) различной полярности, обеспечивающих поливалентность (т. е. множественность) фармакологических эффектов. Однако эффективное комплексное извлечение БАВ затруднено при применении классических методов экстракции ввиду того, что спиртово-водные и масляные извлечения, различающиеся составом ценных со-

* Corresponding author E-mail address: naimlivi@mail.ru

¹ © Siberian Federal University. All rights reserved

единений, получают отдельно, используя разные по полярности экстрагенты. Например, применение технологии мацерации – масляной экстракции – позволяет извлекать растительными маслами только жирорастворимые вещества. При этом гидрофильные компоненты остаются в исходном сырье и могут быть извлечены лишь в другой экстракт. Как показывают исследования, в шроте часто остается большое количество ценных соединений, которые могут служить основой для производства лекарственных и косметических препаратов или биологически активных добавок к пище. В этой связи существует необходимость рационального использования растений, совершенствования и разработки новых ресурсосберегающих комплексных технологий переработки лекарственного растительного сырья, обеспечивающих максимальное извлечение БАВ.

Для решения указанных проблем возможна переработка сырья методом двухфазной экстракции в системе полярный – неполярный растворители с эффективным извлечением как гидрофильных, так и липофильных веществ. Например, применение системы несмешивающихся растворителей водный раствор этанола – растительное масло позволит за один технологический цикл получить одновременно водно-спиртовое и масляное извлечения [1-5].

В ряде научных исследований для оптимизации процесса двухфазной экстракции растительного сырья добавляют поверхностно-активные вещества (ПАВ) с целью получения эмульсионно-диспергированной системы несмешивающихся растворителей, обеспечивающей более высокую скорость массопереноса при экстрагировании [6-8].

Для изучения закономерностей процессов двухфазной экстракции растительного сырья авторами статьи в качестве объекта исследования была выбрана Melissa лекарственная – *Melissa officinalis*. Данное лекарственное сырье входит в фармакопеи большинства стран и применяется как успокаивающее, болеутоляющее, спазмолитическое и общеукрепляющее средство [9]. Известно, что Melissa содержит как липофильные (производные хлорофилла, каротиноиды), так и гидрофильные (флавоноиды, дубильные вещества, углеводные комплексы) БАВ [9].

Целью данной работы явилось спектрофотометрическое изучение накопления хлорофилла и его производных, извлекаемых из Melissa лекарственной – *Melissa officinalis*, с использованием системы несмешивающихся растворителей: водно-этанольный раствор (60 %-ный) – рапсовое масло.

Из литературы известно, что хлорофилл и его производные проявляют бактерицидное и антиоксидантное действие и используются в медицине и ветеринарии для фотодинамической терапии онкологических заболеваний; также есть данные по их применению в качестве натурального пигмента при производстве ряда косметических и парфюмерных изделий [10].

Использование рапсового масла как экстрагента объясняется его традиционным применением в качестве полезного растительного пищевого масла. В его составе преобладают мононенасыщенные кислоты олеинового ряда с незначительным содержанием ди- и триненасыщенных кислот. Являясь природными антиоксидантами, они уменьшают окисляемость масла и увеличивают его срок годности. Сегодня в продажу поступают так называемые селекционные низкоэруковые сорта – с низким содержанием эруковой кислоты. Достоинство низкоэрукового масла – сбалансированность смеси жирных кислот: 50–60 % олеиновой, 15–25 % – линолевой и 7–15 % – линоленовой. Они эффективно снижают уровень плазменного холестерина – главного виновника развития атеросклероза и сопутствующих заболеваний. Особенно важна роль

линолевой и линоленовой кислот – их дефицит чреват сужением сосудов и нарушением кровообращения. Кроме того, содержание в рапсовом масле необходимого количества витамина Е (430–1680 мг/кг) обеспечивает нормальную деятельность эндокринной системы [11].

В задачи исследования входило: 1) проведение процессов экстракции мелиссы лекарственной: а) однофазной системой – мацерацией рапсовым маслом, б) двухфазной системой: водно-этанольный раствор – рапсовое масло, в) той же двухфазной системой с добавлением ПАВ; 2) спектрофотометрическое изучение поглощения масляными экстрактами УФ- и видимого излучения в диапазоне длин волн 280-750; 3) количественное определение содержания хлорофилла и его производных в масляных экстрактах на спектрофотометре СФ-46 при 680 нм.

Экспериментальная часть

В качестве исходного сырья использовалась высушенная надземная часть мелиссы лекарственной, собранная в августе 2010 г. в экологически чистых регионах Приангарья. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящего сквозь сито с отверстиями диаметром 3,0-5,0 мм.

Двухфазная система экстрагентов выбрана со следующим составом: рапсовое растительное масло – водный раствор этанола (60 %-ный) в соотношении 2:1. Экстрагирование осуществляли по следующей методике: 10,0 г сухого сырья помещали в круглодонную колбу, приливали 50 мл 60 %-го водного раствора этилового спирта и выдерживали в течение 1,5 ч при комнатной температуре. Затем добавляли 100,0 мл рапсового масла. Экстрагирование вели в той же колбе с обратным холодильником при нагревании на водяной бане до 80-85 °С при периодическом перемешивании. Накопление БАВ в экстрактах изучали в динамике: через 6, 12, 18, 24, 30 ч экстрагирования. По достижении определенного времени вытяжку процеживали через марлю для отделения частиц сырья и разделяли по плотности в делительной воронке.

Для сравнения параллельно проводили мацерацию – однофазную экстракцию сырья рапсовым маслом. Также проведена экстракция сырья той же системой несмешивающихся растворителей, но с добавлением поверхностно-активного вещества (ПАВ) лецитина в количестве 0,025 г. Лецитин, являясь натуральным эмульгатором, позволял получать устойчивые эмульсии вода–этанол–масло.

Электронные спектры поглощения масляных фракций экстрактов записывали на спектрометре Sperecord 40 M. В этих же образцах оценивали степень извлечения липофильной фракции БАВ мелиссы по содержанию хлорофилла и его производных, измеряя оптическую плотность на спектрофотометре СФ-46 при $\lambda = 680$ нм [3]. В качестве растворов сравнения использовали рапсовое масло или – при исследовании двухфазной экстракции с добавлением ПАВ – рапсовое масло с добавлением лецитина.

Результаты и обсуждения

Исследование закономерностей экстракции травы мелиссы однофазной и двухфазной системами растворителей методом УФ- и видимой спектроскопии показало, что уже после 6-часовой экстракции в электронных спектрах масляных фракций экстрактов обнаруживаются существенные различия по интенсивности поглощения (рис. 1, кривые 1, 2). В спектрах экстрактов

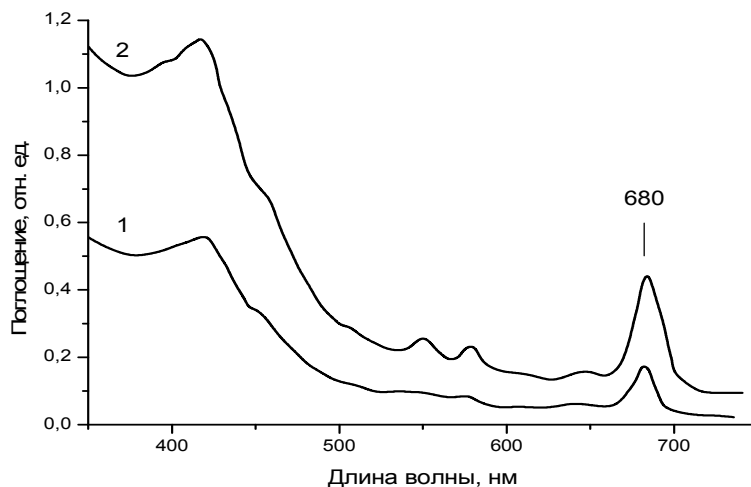


Рис. 1. Электронные спектры поглощения экстрактов Melissa (6 ч): 1 – экстрагент: рапсовое масло; 2 – экстрагент: рапсовое масло – 60 %-ный водный раствор этанола

можно выделить два основных максимума поглощения. Первый – при $\lambda \sim 400-430$ нм – можно отнести к поглощению гидрофильного комплекса БАВ Melissa, второй – при $\lambda \sim 670-685$ нм – поглощение, характерное для хлорофилла и его производных. Кроме того, при двухфазном экстрагировании появляется поглощение в диапазоне длин волн 550-580 нм, характеризующее присутствие в экстрактах антоцианов (рис. 1, кривая 2). Характерно, что антоцианы, будучи полярными флавоноидами, в чистом виде в неполярных растворителях нерастворимы. Таким образом, электронные спектры масляных фракций экстрактов позволяют визуальную оценку возрастания степени извлечения как гидрофильных, так и липофильных БАВ Melissa при применении двухфазной системы: полярный–неполярный растворители.

Опытным путем показано, что предварительное замачивание растительного сырья в полярном растворителе – в нашем случае в водно-этанольном растворе – обеспечивает протекание процесса гидратации, основное значение которого заключается в ослаблении межмолекулярных связей, их разрыхлении, дополнительной гидратации полярных групп гидрофильных соединений.

После разрушения связей между макромолекулами вода далее вытесняется этанолом, предназначенным для извлечения менее полярных БАВ лекарственного сырья. Кроме того, этанол разрушает водородные связи и ослабляет электростатическое взаимодействие липидов с белками, эффективно экстрагируя полярные липиды [12].

Следовательно, содержание этанола не ниже 60 мас. % в полярной фазе при двухфазной экстракции обеспечивает хорошее проникновение растворителя внутрь клеток сырья, его набухание, десорбцию и сольватацию не только липофильных (фитостероидов, токоферолов, терпенов, хлорофиллов и др.), но и полярных веществ (флавоноидов, иридоидов, антоцианов и др.). При прохождении через клеточные мембраны этиловый спирт переносит растворенные БАВ из клеточных компартментов на поверхность. Другими словами, использование водного раствора этанола облегчает проникновение более тяжелых молекул – триглицеридов жирных

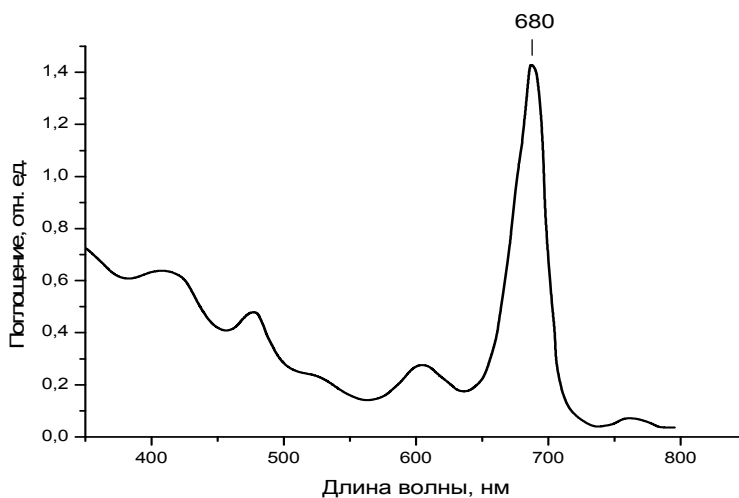


Рис. 2. Электронные спектры поглощения масляных экстрактов Melissa после применения двухфазной системы растворителей: 60 %-ный водный раствор этанола – рапсовое масло при добавлении лецитина

кислот растительного масла внутрь клеточных оболочек сырья для извлечения гидрофильных соединений, а также общих и нейтральных липидов.

Экспериментально установлено, что при добавлении к двухфазной системе экстрагентов поверхностно-активного вещества эффективность извлечения БАВ возрастает в несколько раз. Такое увеличение зарегистрировано при применении в качестве ПАВ лецитина – натурального эмульгатора, позволяющего получать устойчивую эмульсию вода – спирт–масло. Электронные спектры поглощения демонстрируют, что использование лецитина в добавлении к двухфазной системе растворителей приводит к увеличению содержания как гидрофильной, так и липофильной фракций БАВ в составе масляной фракции экстрактов Melissa (рис. 2).

Так как гидрофильная фракция в экстрактах представлена несколькими классами соединений, для количественного изучения накопления БАВ в зависимости от условий экстрагирования была выбрана липофильная фракция. Эта фракция представлена в сырье Melissa преимущественно хлорофиллом и его производными, дающими в видимой области четкий максимум поглощения при $\lambda = 680$ нм.

Измерение оптической плотности экстрактов сырья при $\lambda \sim 680$ нм на спектрофотометре СФ-46 позволило провести количественное определение содержания хлорофилла и его производных (ПХ) в зависимости от условий экстракции (рис. 3). Расчет содержания проводили по формуле

$$X = \frac{D \cdot P \cdot 1000}{755},$$

где X – концентрация ПХ, мг %; D – оптическая плотность; P – кратность разведения экстракта хлороформом; 755 – удельный показатель поглощения хлорофилла при 680 нм; 1000 – пересчет концентрации мг % [3].

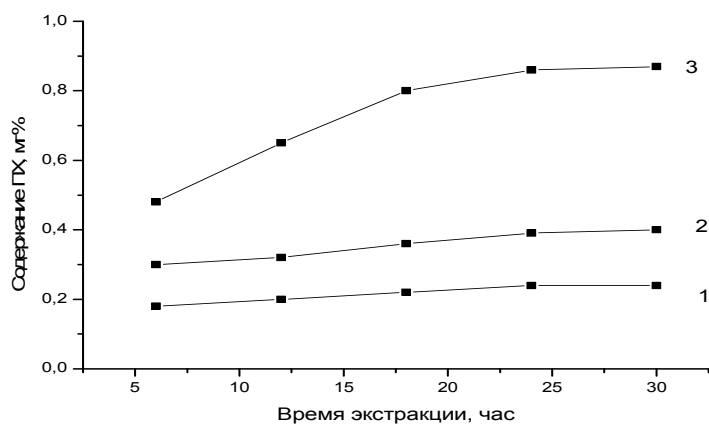


Рис. 3. Содержание хлорофилла и его производных (ПХ) в экстрактах Melissa: 1 – экстракция рапсовым маслом; 2 – экстракция в двухфазной системе: рапсовое масло – 60 %-ный водный раствор этанола; 3 – экстракция в двухфазной системе: рапсовое масло – 60 %-ный водный раствор этанола с добавлением лецитина

Количественный анализ содержания хлорофилла и его производных (ПХ) в экстрактах Melissa лекарственной показал, что применение системы «полярный – неполярный растворители» повышает выход ПХ в 1,5-2 раза (рис. 3, кривые 1-2).

При создании устойчивой эмульсии в системе несмешивающихся растворителей с помощью лецитина эффективность извлечения ПХ возрастает в 2,5–3,7 раза при увеличении времени экстракции с 6 до 30 часов соответственно (рис. 3, кривая 3).

Оптимизация извлечения БАВ, в частности хлорофилла и его производных, из Melissa при помощи ПАВ проявляется в том, что лецитин, являясь гидрофобным эмульгатором 2-го рода, образует обратную эмульсию «вода–спирт в масле». В эмульсионно-диспергированной системе несмешивающихся растворителей вязкость масла резко уменьшается, что приводит к возрастанию скорости процессов массопереноса и облегчению перехода липофильных БАВ из сухого сырья в масляную фазу [12].

Проведенные исследования позволяют сделать заключение, что фитоизвлечения, получаемые технологией двухфазной экстракции, являются облегченными эмульсиями, которые можно использовать для введения в пищевые, лекарственные или косметические кремообразные композиции. Кроме того, в связи с тем что количество полярной фазы достаточно мало и она легкоиспаряема, многообещающим направлением считается получение масляных экстрактов, насыщенных богатым спектром биохимических соединений различной полярности, обеспечивающих многофункциональное лечебное и профилактическое воздействие на организм.

Выводы

1. Проведенное спектрофотометрическое исследование показало, что экстракция Melissa лекарственной двухфазной системой растворителей: водный раствор этанола (60 %-ный) – рапсовое масло по сравнению с однофазным экстрагированием сырья рапсовым маслом увеличивает в несколько раз содержание как гидрофильной, так и липофильной фракций БАВ в масляных фазах экстрактов.

2. Экспериментально установлено, что применение ПАВ 2-го рода – лецитина – оптимизирует извлечение БАВ при двухфазной экстракции Melissa вследствие образования устойчивой эмульсии, уменьшения вязкости масла и возрастания скорости процессов массопереноса.
3. Количественный анализ содержания хлорофилла и его производных в масляных фазах экстрактов Melissa лекарственной показал, что применение системы полярный – неполярный растворители по сравнению с экстракцией рапсовым маслом повышает их выход в 1,5-2 раза при увеличении времени экстракции с 6 до 30 часов соответственно. При создании устойчивой эмульсии в системе несмешивающихся растворителей с помощью лецитина эффективность извлечения хлорофилла и его производных возрастает в 2,5 – 3,7 раза в соответствии с затраченным временем на экстрагирование.
4. Данный метод извлечения ценных компонентов с получением устойчивой эмульсии может быть применен для составления кремо- и мазеобразных лекарственных и косметических композиций, содержащих комплекс БАВ различной полярности и обеспечивающих поливалентность фармакологических эффектов.

Список литературы

1. Каухова И. Е. Новая методика получения растительных препаратов // Фармация. 2006. № 1. С. 37–39.
2. Минина С. А., Каухова И. Е. Химия и технология фитопрепаратов. М.: Гэотар-медиа, 2009. 560 с.
3. Хаззаа И.Х., Вайнштейн В.А., Чибилев Т.Х. Экстрагирование липофильных БАВ из травы зверобоя водно-масляными эмульсиями // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т.37. № 7. С. 20 – 23.
4. Иванова С.А., Ванштейн В.А., Каухова И.А. Особенности массопереноса липофильных БАВ при экстрагировании сырья двухфазной системой экстрагентов // Химико-фармацевтический журнал. 2003. Т.37. № 8. С.30-33.
5. Сорокин В.В., Вайнштейн В.А., Карнаухова И.Е., Чибилев Т.Х. Изучение экстрагирующей способности одно- и двухфазных систем экстрагентов для извлечения флавоноидов из травы клевера лугового // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т.42. № 8. С.23 – 25.
6. Вайнштейн В.А., Хаззаа И.Х., Чибилев Т.Х., Каухова И.Е. Экстрагирование полярных БАВ из травы зверобоя двухфазной системой экстрагентов в присутствии ПАВ // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38. № 5. С. 25 -27.
7. Белякова А.В., Вайнштейн В.А., Маркова К.В., Демченко Ю.Т., Чибилев Т.Х. Применение синтетических эфиров высших жирных кислот для экстрагирования листьев крапивы // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. № 11. С. 35 – 39.
8. Демченко Ю.Т., Каухова И.Е., Вайнштейн В.А., Чибилев Т.Х. Особенности процесса экстрагирования лекарственного сырья двухфазными системами экстрагентов, содержащими компоненты суппозиторных основ // Химико-фармацевтический журнал. 2005. Т.39. № 11. С.30-34.
9. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М., 1989. Т.2. 389 с.
10. Андрианова Ю. Е., Тарчевский И.А. Хлорофилл и продуктивность растений. М.: Наука, 2000. 135 с.

11. Лисицын А.Н., Быкова С.Ф., Давиденко Е.К., Минасян Н.М. Биологические особенности сортов рапса и физиологические ценности жмыхов и шротов // Масложировая промышленность. 2007. № 6. С. 18-20.

12. Гусакова С.Д., Степаненко Г.А., Асимбекова Д.Т. Липиды некоторых лекарственных растений // Растительные ресурсы. 1983. Т. 19. Вып. 4. С. 444-445.

Spectrophotometric Study of Chlorophyll and its Derivatives Accumulation in *Melissa Officinalis* Extracts Using Two-Phase Solvent System

**Lilia V. Naimushina^a,
Anastasia Yu. Karaseva^a and Nikolai V. Chesnokov^{a,b}**
^a *Siberian Federal University
79 Svobodny, Krasnoyarsk, 660041 Russia*
^b *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS
50/24 Akademgorodok, Krasnoyarsk, 660036 Russia*

*The regularities of chlorophyll and its derivatives (CD) recovering from *Melissa officinalis* at two-phase extraction in system "ethanol water solution (60 %) – colza oil" were investigated by spectrophotometric method. CD content quantitative analysis in oil extracts has shown that a usage of immiscible solvents system increases a yields in 1,5 – 2 time compared to single-phase extraction by colza oil under process time extension from 6 to 30 hours properly. The efficiency of CD extraction was increased in 2,5-3,7 times when a stable emulsion in immiscible solvents system was created by adding a surface-active agent of the second kind – lecithin.*

Keywords: vegetable raw materials, biologically active substances (BAS), chlorophyll and its derivatives, two-phase extraction, spectrophotometric study.
