

VORTEX-ЭКСТРАКЦИЯ И СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА И ТАНИНА В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Е. А. Подолина^{1,2}, М. А. Ханина², М. Г. Лежнина², Ю. А. Кузнецова²

¹Электростальский институт (филиал Московского политехнического университета)

²Государственный гуманитарно-технологический университет

Поступила в редакцию 15.05.2019 г.

Аннотация. Извлечение биологически активных веществ (БАВ) из лекарственного растительного сырья (ЛРС) впервые проведено на смесителе типа Vortex, создающем вихревое вертикальное перемешивание, приводящее к «эффекту губки» – деформации с временным изменением объема твердой фазы. Это приводит к кратковременному сжатию частиц твердой фазы и способствует более интенсивному выведению первичного клеточного сока в момент сжатия, а возвращение твердых частиц в первоначальное состояние ускоряет проникновение новой порции экстрагента в твердую фазу. Вместе с тем значительно увеличивается скорость массопереноса извлеченных БАВ из растительной клетки в объем экстрагента.

С учетом конструкции смесителя Vortex минимизировано соотношение сырье: экстрагент (0,025:4,0), которое позволяет при интенсивном вертикальном вихревом перемешивании практически мгновенно обновлять порцию свежего экстрагента на границе поверхности твердой частицы.

Количественное содержание суммы флавоноидов и суммы дубильных веществ определяли спектрометрическим методом в УФ-области. Содержание флавоноидов и дубильных веществ в пересчете на стандартное вещество и абсолютно сухое сырье полученных с помощью Vortex-экстракции, сравнивали с результатами контрольного опыта, который проводили методом дробной трехкратной мацерации при нагревании.

Установлено, что вихревое вертикальное перемешивание со скоростью 1500 об/мин в течение 3 мин позволяет увеличивать выход БАВ из различных морфологических частей василька синего. Например, из всей надземной части выход флавоноидов (в пересчете на рутин) увеличивается от 2.5 % до 4.1%, а для дубильных веществ (в пересчете на танин) от 1.85% до 2.7 %.

Разработанная Vortex-экстракционно-спектрометрическая методика определения рутина и танина в различных морфологических частях василька синего характеризуется следующими параметрами: существенно снижена масса анализируемого образца ЛРС – в 40 раз, уменьшен объем экстрагента – более чем в 22.5 раз и время проведения единичного анализа сократилось в 60 раз. Правильность получаемых результатов определения по предлагаемой методике подтверждена методом «введено-найдено», относительная погрешность при 5-кратном определении и доверительной вероятности 0.95 не превышает 3 %.

Ключевые слова: василек синий, флавоноиды, дубильные вещества, бинарный экстрагент, рутин, танин, Vortex-экстракция, УФ-спектроскопия.

Разработка новых методик контроля качества лекарственных препаратов (ЛП) на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС) представляет практический интерес. Большинство существующих методик для извлечения биологически активных веществ (БАВ) применяют дробную трехкратную мацерацию при нагревании [1-3], одно- и многочастотную УЗ-экстракцию [4-6], вихревую или турбо-экстракцию [7-9], центро-

бежную экстракцию [10-11] и др. Все эти методы извлечения БАВ из ЛРС характеризуются рядом недостатков, например, существенный расход химических реактивов, длительная пробоподготовка [1-11].

Многие авторы [12-15] при разработке новых методик количественного определения руководствуются «принципом минимизации», то есть масса анализируемой пробы, объем экстрагента и время контакта экстракционной системы должны быть минимальными. Так, применение для извлечения БАВ из ЛРС смесителя типа Vortex позво-

лит уменьшить объем экстракционной системы до размера центрифужной пробирки, а время экстрагирования до нескольких минут [16,17].

Цель настоящего исследования – разработка Vortex-экстракционно-спектрофотометрической методики определения содержания рутина и танина в морфологических частях василька синего.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования является вся надземная часть (краевые цветки, корзинки, листья, стебли, трава) василька синего, выращенного на опытном участке «Аптекарского огорода ГГТУ» (г. Орехово-Зуево, 2016-18 г.). Надземная часть растения собрана в фазе цветения, высушено естественной воздушно-теновой сушкой до воздушно-сухого состояния.

Реактивы: спирт этиловый для приготовления лекарственных форм, 95 % (ПХФК ОАО «Медхимпром»); для контроля концентрации экстрагируемых веществ использовали ГСО рутина и ГСО танина; в качестве экстрагента применяли бинарную смесь вода – этанол (объемная доля этанола 0.47).

Оборудование: Vortex-экстракцию осуществляли на смесителе Vortex, для пробирок V-1 plus/V32, скорость перемешивания до 3000 об/мин.

Перемешивание экстракционной системы (растительное сырье – водный раствор этанола) на приборе Vortex V-1 plus/V32 приводит к созданию так называемого «эффекта губки» – деформация с временным изменением объема твердой фазы. Это приводит к кратковременному сжатию частиц твердой фазы и способствует более интенсивному выведению первичного клеточного сока в момент сжатия, а возвращение твердых частиц в первоначальное состояние ускоряет проникновение новой порции экстрагента в твердую фазу [2, 18].

Спектрофотометрическое определение БАВ осуществляли в УФ-области на спектрофотометре UNICO, модель 2800.

Для получения экстрактов использовали сырье с влажностью 6.9-7.0%, измельченное на шаровой мельнице ИВМУ 100 до размера частиц, проходящих сквозь сито диаметром отверстий 1 мм.

С учетом конструкции смесителя Vortex минимизировано соотношение сырье: экстрагент (0,025: 4,0), которое позволяет при интенсивном вертикальном вихревом перемешивании практически мгновенно обновлять порцию свежего экстрагента на границе поверхности твердой частицы ЛРС.

Методика Vortex-экстракции: навеску мор-

фологической части василька синего (~0.025 г) помещают в пробирку вместимостью 10 см³, добавляют 4 см³ бинарной смеси вода – этанол, добавляют 3-4 грузика для балансировки экстракционной системы, помещают на платформу смесителя Vortex, фиксируют скорость перемешивания (1500 об/мин) и выдерживают в течение 3 минут. Полученный экстракт фильтруют через бумажный фильтр и измеряют объем полученного извлечения.

Методика контрольного опыта: навеску морфологической части василька синего (~0.0250 г) помещают в плоскодонную колбу, вместимостью 10 см³ приливают 4 см³ бинарного растворителя вода – этанол, присоединяют к воздушному холодильнику и помещают в водяную баню, выдерживают в течение 15 мин с момента закипания бинарного экстрагента при периодическом перемешивании. По истечении времени полученное извлечение без охлаждения фильтруют через бумажный фильтр в чистую колбу. Затем к этому же сырью приливают новую порцию бинарного экстрагента и проводят извлечение в тех же условиях дважды, полученные экстракты объединяют и измеряют объем полученного извлечения.

Оптическую плотность полученных водно-этанольных экстрактов измеряют в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см, раствор сравнения – бинарная смесь вода – этанол. Сумму дубильных веществ (в пересчете на танин) определяют при аналитической длине волны 275 нм, а сумму флавоноидов (в пересчете на рутин) – при 362 нм.

Количественное содержание (x %, в пересчете на абсолютно сухое сырье) суммы дубильных веществ и суммы флавоноидов рассчитывали по формуле, приведенной в [5].

Статистическая обработка результатов химического эксперимента проводилась в соответствии [19] с использованием программы Statistica.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные экстракты (Vortex-экстракции и дробной трехкратной мацерации при нагревании) спектрофотометрировали в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм в сравнении с УФ-спектрами ГСО рутина и танина (рис. 1).

В диапазоне 270±5 нм и 360±5 нм наблюдаются максимумы светопоглощения, что подтверждает присутствие в экстрактах БАВ фенольной природы (дубильные вещества и флавоноиды).

Для исследуемых извлечений определено со-

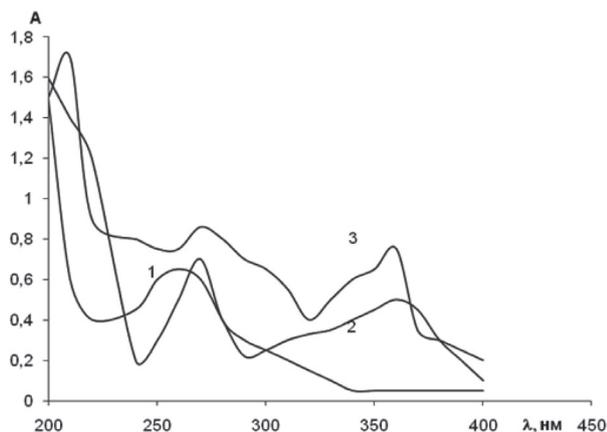


Рис. 1. Электронные спектры поглощения в УФ области света ГСО танина (1), ГСО рутина (2) экстракта травы василька синего (3), полученного Vortex-экстракцией

держание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) и суммы дубильных веществ (в пересчете на танин) (табл.1).

Экспериментальные данные согласуются с

полученными ранее [5]. Для проверки воспроизводимости разработанной методики проводили 5 независимых определений в надземной части василька синего при Vortex-экстракции и в контрольном опыте, относительные ошибки методики не превышали 3 %. (табл.2).

Предложенная методика количественного определения суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) и суммы дубильных веществ (в пересчете на танин) в надземной части василька синего надежна и дает воспроизводимые результаты. Опыты с добавками образцов ГСО рутина и ГСО танина к исследуемым растворам показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки при использовании данной методики (табл. 3).

Полученные результаты эксперимента свидетельствуют, что применение смесителя типа Vortex для извлечения БАВ из растительного сырья позволяет повысить извлечение суммы флавоноидов и суммы дубильных веществ в сравнении с

Таблица 1.

Содержание (x, %) суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) и суммы дубильных веществ (в пересчете на танин) в экстрактах надземной части василька синего, P=0.95, n=5

БАВ	цветки	корзинки	листья	стебли	трава
Vortex – экстракция					
танин	3.50±0.09	2.25±0.05	3.95±0.10	2.10±0.05	2.71±0.07
рутин	6.52±0.15	3.10±0.07	7.82±0.20	2.95±0.07	5.10±0.15
контрольный опыт					
танин	1.65±0.05	1.10±0.03	1.95±0.05	0.95±0.02	1.85±0.05
рутин	2.70±0.07	2.20±0.06	2.95±0.07	1.80±0.05	2.50±0.06

Таблица 2.

Метрологические характеристики методики извлечений (Vortex – экстракция и контрольный опыт) и спектрофотометрического определения (x, %) флавоноидов и дубильных веществ в траве василька синего

БАВ	X_{cp}	S^2	S	P	$t(P,f)$	ΔX	$\epsilon, \%$
Vortex – экстракция							
танин	2.71	0.0041	0.064	0.95	2.57	0.07	2.58
рутин	4.10	0.019	0.14	0.95	2.57	0.15	2.94
контрольный опыт							
танин	1.85	0.002	0.046	0.95	2.57	0.05	2.70
рутин	2.50	0.003	0.055	0.95	2.57	0.06	2.40

Таблица 3.

Определение правильности разработанной методике Vortex-экстракции и спектрофотометрического определения (x, %) суммы флавоноидов и суммы дубильных веществ способом «введено-найдено»

Содержание в аликвоте 1 мл, мг	Введено, мг	Теоретическое содержание, мг	Найдено, мг	Ошибка определения	
				абс., мг	отн., %
танин					
0.26	0.2	0.46	0.471	0.011	2.39
0.27	0.4	0.67	0.656	0.014	2.09
0.28	0.6	0.88	0.897	0.017	1.93
рутин					
0.50	0.2	0.70	0.715	0.015	2.14
0.51	0.4	0.91	0.892	0.018	1.99
0.52	0.6	1.12	1.10	0.020	1.78

контрольным опытом (дробная трехкратная мацерация при нагревании) в 1.5 -2.5 раза и хорошо согласуется с данными УЗ-экстракции [5].

Разработанная Vortex-экстракционно-спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов и суммы дубильных веществ характеризуется рядом преимуществ по сравнению с методикой, описанной в ОФС:

1) значительная минимизация навески сырья, в 40 раз меньше чем в ОФС (0,025 г) и объема экстрагента в 22.5 раза меньше, чем в ОФС (4 см³),

2) время экстрагирования сокращается в 10 раз (3 мин);

3) однократная Vortex- экстракция позволяет в 2.0-2.5 раза эффективнее извлекать сумму флавоноидов и в 1.5-2.0 раза - сумму дубильных веществ по сравнению с дробным трехкратным извлечением по методике контрольного опыта.

4) правильность получаемых результатов определения подтверждена методом «введено-найденно», относительная погрешность при 5-кратном определении и доверительной вероятности 0,95 не превышает 3 %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые для извлечения БАВ (суммы флавоноидов и дубильных веществ) из ЛРС применена Vortex-экстракция. Ввиду особенностей конструкции смесителя Vortex значительно уменьшена навеска сырья и объем экстрагента, получено соотношение сырье:экстрагент (1:160). Путем однократной Vortex-экстракции практически полностью извлечены БАВ из различных морфологических частей василька синего, что существенно сокращает время подготовки аналитической пробы к спектрофотометрическому определению, а время единичного анализа сокращается практически в 6 раз (10 мин по сравнению с контрольным опытом 60 мин).

Разработанная Vortex – экстракционно-спектрофотометрическая методика определения рутина и танина в различных морфологических частях василька синего подтверждена методом «введено-найденно», относительная погрешность при 5-кратном определении и доверительной вероятности 0,95 не превышает 3 %

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономарев В.Д. Экстрагирование лекарственного сырья. Москва, Наука, 1976, 202 с.
2. Государственная фармакопея. Российской Федерации, XIV издание. Москва, 2018, Т. 1, С. 289-318.

3. Быков И.И., Компанцев Д.В., Привалов И.М. // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. 2017. Т.16. №2. С. 170-180

4. Сипкина Н.Ю., Скорик Ю.А. // Журнал аналитической химии, 2015. Т.70. №11. С. 1224-1229.

5. Подолова Е.А., Ханина М.А., Рудаков О.Б., Небольсин А.Е. // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. 2018. №2. С. 28-35.

6. Хмелев В.Н., Цыганок С.Н., Шакура В.А. // Южно-сибирский научный вестник. 2017. Т. 20. № 4. С. 21-26.

7. Жматова Г.В. // Вестник ТГТУ. 2005. Т.11. № 3. С.701-707.

8. Штрыкова В.В. Получение биологически активных веществ из растительного сырья. Лабораторный практикум. Томск, ТПУ, 2010, 51 с.

9. Леонова М.В., Климошкин М.В. Экстракционные методы изготовления лекарственных средств из растительного сырья: учебно-методическое пособие. Самара, Самар. гос. техн. ун-т, 2012, 118 с.

10. Поникарова Д.И., Салин А.А., Гришин Н.С. // Вестник технологического университета. 2016. Т.19. №13. С.86-90.

11. Дубашинская Н.В., Хишова О.М., Шимко О.М. // Вестник фармации. 2007. Т.36. №2, С. 70-79.

12. Матюшина Т.А., Моросанова Е.И., Золотов Ю.А. // Журнал аналитической химии. 2010. Т.65. №3. С. 313-320.

13. Амелин В.Г., Большаков Д.С., Третьяков А.В. // Журнал аналитической химии. 2013. Т.68. №5. С. 430-441.

14. Ridgway K., Lalljie S.P.D., Smith R.M. // J. Chromatogr. A. 2007. Vol. 1153. pp. 36-53.

15. Malik A.K., Aulakh J.S., Kaur V. // Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology. 2008. V. 384.P. 93-118.

16. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. 2009, vol. 4, p. 456.

17. Власов С.С., Кривошеков С.В., Заманова М.К., Белоусов М.В., Гурьев А.М., Юсубов М.С. // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2016. Т.17. №4. С. 174-179.

18. Коничев А.С. Баурин П.В., Федоровский Н.Н., Марахова А.И., Якубович Л.М., Черникова М.А. // Вестник МГОУ. Серия «Естественные науки». 2011. №3. С. 49-54.

19. Государственная фармакопея. Российской Федерации, XIV издание. Т. 1. Статистическая обработка результатов химического эксперимента. Москва, 2018, С. 289-318.

Электростальский институт (филиал Московского политехнического университета)

Подолкина Е. А., д. хим. н., профессор кафедры безопасности и здоровья

E-mail: podolina70@mail.ru

Elektrostal Institute (Branch of the Moscow Polytechnic University)

Podolina E. A., PhD., DSci., Professor of the Health and Security Chair

E-mail: podolina70@mail.ru

Государственный гуманитарно-технологический университет

Ханина М. А., д. фарм. н., профессор заведующий кафедрой химии

E-mail: khanina06@mail.ru

Humanity-Technological State University

Khanina M. A., PhD., DSci., professor and the Head of the Chemistry Chair

E-mail: khanina06@mail.ru

Лежнина М. Г., к. фарм. н., доцент кафедры химии

E-mail: xm_86@mail.ru

Lejnina M. G., PhD., associate Professor of the Department of chemistry

E-mail: xm_86@mail.ru

Кузнецова Ю. А., старший преподаватель биолого-химического факультета

E-mail: hronoksia@mail.ru

Kuznetsova Y. A., Senior Lecturer at the Faculty of Biology and Chemistry

E-mail: hronoksia@mail.ru

VORTEX-EXTRACTION AND SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF RUTINE AND TANNIN IN PLANT RAW MATERIALS

E. A. Podolina^{1,2*}, M. A. Khanina², M. G. Lezhnina², Yu. A. Kuznetsova²

¹Electrostal Institute (branch of Moscow Polytechnic University)

²State Humanity-Technological University

Abstract. Extraction of biologically active substances (BAS) from medicinal plant materials (MPM) was first carried out on a Vortex mixer, creating a vertical vortex mixing, leading to a “sponge effect” - deformation with a temporary change in the volume of the solid phase. This leads to a short-term compression of particles of the solid phase and contributes to a more intensive removal of the primary cell sap at the time of compression, and the return of solid particles to the original state accelerates the penetration of a new portion of the extractant into the solid phase. At the same time, there is a significant increase of the rate of the mass transfer of the extracted BAS from the plant cell to the volume of the extractant.

Taking into account the design of the Vortex mixer, the ratio of raw materials: extractant (0.025: 4.0) is minimized making it possible to instantly update the portion of a fresh extractant at the interface of the solid particle with intensive vertical vortex mixing.

The quantitative content of the sum of flavonoids and the sum of tannins was determined by the spectrometric method in the UV region. The content of flavonoids and tannins in terms of standard substance and absolutely dry raw materials obtained using Vortex-extraction was compared with the results of the control experiment, which was carried out by the method of fractional threefold maceration when heated.

It was established that vertical vortex mixing at a speed of 1500 rpm for 3 minutes allows increasing the output of biologically active substances from different morphological parts of cornflower blue. For example, from the entire aboveground part, the yield of flavonoids (in terms of rutin) increases from 2.5% to 4.1%, and for tannins (in terms of tannin) from 1.85% to 2.7%.

The developed Vortex – extraction-spectrometric method for determining rutin and tannin in various morphological parts of the blue cornflower is characterized by the following parameters: the mass of the analyzed sample of MPM is significantly reduced – by 40 times, the volume of extractant decreased by more than 22.5 times and the time for a single analysis decreased by 60 times. The correctness of the obtained results of the determination according to the proposed method was confirmed by the “entered-found” method, the relative error at 5-fold determination and a confidence level of 0.95 does not exceed 3%.

Keywords: cornflower blue, flavonoids, tannins, extractant, rutin, tannin, Vortex extraction, UV spectroscopy.

REFERENCES

1. Ponomarev V.D. Ekstragirovanie lekarstvennogo syr'ya. Moskva, Nauka, 1976, 202 p.
2. Gosudarstvennaya farmakopeya. Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. Moskva, 2018, T. 1, pp. 289-318.
3. Bykov I.I., Kompantsev D.V., Privalov I.M., Vestnik Smolenskoii gosudarstvennoi meditsinskoi akademii, 2017, T.16, No. 2, pp. 170-180.
4. Sipkina N.Yu., Skorik Yu.A., J. of Analytical Chemistry, 2015, V.70, No. 11, pp. 1224-1229. DOI: 10.7868/S0044450215110158
5. Podolina E.A., Khanina M.A., Rudakov O.B., Nebolsin A.E., Vestnik VGU, seriya: Khimiya. Biologiya. Farmatsiya, 2018, No.2, pp. 28-35.
6. Khmelev V.N., Tsyganok S.N., Shakura V.A., South Siberian Scientific bulletin, 2017, V. 20, No. 4, pp. 21-26.
7. Zhmatova G.V. // Bulletin of TSTU, 2005, V.11, No. 3, pp.701-707.
8. Shtrykova V.V. Obtaining biologically active substances from plant materials. Laboratory session. Tomsk, TPU, 2010, p. 51.
9. Leonova M.V., Klimochkin M.V. Extraction methods for the manufacture of medicinal products from plant materials: a teaching aid. Samara, Samar. State Tech. Univ., 2012, p. 118
10. Ponikarova D.I., Salin A.A., Grishin N.S., The Bulletin of the Technological University, 2016, V.19, No. 13, pp. 86-90.
11. Dubashinskaya N.V., Khishova O.M., Shimko O.M., Bulletin of pharmacy, 2007, V. 36, No. 2, pp.70-79.
12. Matyushina T.A., Morosanova E.I., Zolotov Yu.A., J. of Analytical Chemistry, 2010, V. 65, No. 3, pp. 313-320.
13. Amelin V.G., Bolshakov D.S., Tretyakov A.V., J. of analytical chemistry, 2013, Vol. 68, No. 5, Pp.430-441. DOI: 10.7868/S0044450213050034.
14. Ridgway K., Lalljie S.P.D., Smith R.M., J. Chromatogr. A, 2007, Vol. 1153, pp. 36-53. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.01.134
15. Malik A.K., Aulakh J.S., Kaur V., Capillary Electrophoresis. Methods in Molecular Biology, 2008, V. 384, p. 93-118. DOI: 10.1007/978-1-59745-376-9_5
16. WHO Monographs on Selected Medicinal Plants. 2009, Vol. 4, 456 p.
17. Vlasov S.S., Krivoschekov S.V., Zamanova M.K., Belousov M.V., Guryev A.M., Yusubov M.S., Development and registration of medicines, 2016, V.17, No. 4, pp.174-179.
18. Konichev A.S. Baurin P.V., Fedorovsky N.N., Marakhova A.I., Yakubovich L.M., Chernikova M.A., Vestnik MGOU. Series "Natural Sciences", 2011, No. 3, pp.49-54
19. Gosudarstvennaya farmakopeya. Rossiiskoi Federatsii, XIV izdanie. V. 1. Statisticheskaya obrabotka rezul'tatov khimicheskogo eksperimenta. Moskva, 2018, pp. 289-318.