АПРОБАЦИЯ МЕТОДИКИ ВАКУУМНО - ИМПУЛЬСНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ И ДУБИЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КОРЕ СОСНЫ С ПОСЛЕДУЮЩИМ ИЗУЧЕНИЕМ ИХ ФИЗИКО - ХИМИЧЕСКИХ СТРУКТУР

TESTING OF THE METHOD OF VACUUM-PULSE EXTRACTION OF FLAVONOIDS AND TANNINS IN PINE BARK WITH SUBSEQUENT STUDY OF THEIR PHYSICAL AND CHEMICAL STRUCTURES

УДК 54(045)

Чапаксин Иван Владимирович, преподаватель химических дисциплин, Костанайский высший медицинский колледж, г.Костанай, Казахстан

Торыбаев Жанболат Серикович, техник лаборант биологии Школы-лицей №2, г.Костанай, Казахстан

Ясько Елена Тимофеевна, Студент специальности фармация, Костанайский высший медицинский колледж, г.Костанай, Казахстан

Capuccin Ivan Vladimirovich, chapaksinevan44@gmail.com

Torybayev Zhanbolat Serikovich, zhtorybaev@gmail.com

Yasko Elena Timofeevna, yy.lena22@mail.ru

Аннотация

Настоящая работа посвящена изучению, применению коры сосны в фармацевтических предприятиях и поиску методов извлечение полезных веществ. Данная работа представляет результаты апробации технологического процесса экстракции с последующей реэкстаркцией выделяемого вещества на составные фазы «жидкость – сухой остаток», с параллельной фиксацией концентрации рефрактометрическим методом. Было подобрано время экстракции путем расчета степени недоизвлеченности

экстрагируемых веществ. Приведены результаты физических и химических испытаний сухого остатка спиртового экстракта. Технологический процесс экстракции флавонойдов и дубильных веществ, вполне применим для фармацевтических предприятий.

Abstract

This work is devoted to the study, use of pine bark in pharmaceutical enterprises and the search for methods for extracting useful substances. This work presents the results of approbation of the technological process of extraction with subsequent reextarction of the secreted substance into the compound phases "liquid - dry residue", with parallel fixation of the concentration by the refractometric method. The extraction time was selected by calculating the degree of under-extraction of the extracted substances. The results of physical and chemical tests of the dry residue of the alcoholic extract are presented. The technological process for the extraction of flavonoids and tannins is quite applicable for pharmaceutical companies.

Ключевые слова: экстракция, кора сосны, флавонойды, дубильные вещества, реэкстракция, аналитический сигнал, отвал, переработка, сапонины.

Key words: extraction, pine bark, flavonoids, tannins, re-extraction, analytical signal, dump, processing, saponins.

Введение

Республика Казахстан занимает 9 место в мире по площади территории, с общей площадью лесных массивов - более 11 млн га. В основном ландшафт республики это: пустыни, полупустыни и степи. Леса занимают площадь 21,8 млн.га., среди них самым распространенным является хвойные породы. Основное ее распространение приходится на южную и северную часть Казахстана [1, с.97].

В основном лесные ресурсы в Республике Казахстан применяются в деревоперерабатывающей, фармацевтической и химической промышленностях.

С развитием целлюлозно – бумажной промышленности возросла степень актуальности в изучении состава различных пород деревьев. По степени распространения видов лесных пород на территории Республики Казахстан, второе место по запасам занимает сосна, которая в процентном соотношении составляет 7,9% от лесопокрыточной площади РК [1, с.134]. Основной запас древесины сосредоточен в хвойных деревьях – это составляет 70% от общей площади насаждения.

В связи свыше перечисленными данными, особую степень актуальности носит проблема в комплексном и рациональном использовании лесного ресурса Республики Казахстан. Известно, что в целлюлозно – бумажной промышленности древесная кора относится к производственным отходам, так как нет технологии ее утилизации, кора подлежит либо сжиганию или же прессовке. Вопрос об утилизации или применении коры рассматривался еще давно, несмотря на уникальный химический состав коры, ее применение так и не осуществилась в производственных масштабах. Для успешного решения данной проблемы, необходимо разрабатывать технологическую карту по модернизации и усовершенствования деревоперерабатывающей промышленности.

Древесная кора, выходит в соотношения 9 – 17% от объема используемой древесины. Кора получается при обработке дерева, но в большинстве случаев она вывозится в отвал, и лишь некоторая ее часть используется в качестве получения коромпостов для кормления животных в сельскохозяйственной отрасли [2, с.75].

Из-за неэффективного использования коры, производство несет убытки в виде штрафных санкций вследствие загрязнения почвенного, водяного и воздушных слоев окружающей среды. Немалое количество исследовательских работ доказывают, что кора является химически ценным продуктом переработки древесины. Кора обладает такими ценными компонентами как: вещества дубильные, целлюлоза, биологически активные вещества, жиры, смола, воск.

Материалы и методы

Целью настоящей работы явилось апробация технологии вакуумной экстракции коры сосны с последующим изучением ее химического состава физико – химическим методом.

Флавонойды и дубильные вещества отличаются своим необычайным распространением и разнообразием, являются энергетическим балластом и сосредоточены в разных системах, таких как: семена, корни, стебель, цветы, кора, листья и т.п. Содержания этих веществ варьируется в зависимости от условий окружающей среды, по концентрации могут достигать от 1,5 до 95% [3, с. 96]. Огромное влияние на процентное содержание данных веществ оказывает: географическое место положения, время сбора, условия хранения, технология обработки – переработки и т.д.

Литературный обзор

В качестве объекта исследования была взята кора сосны, отбор которой осуществлялся из отвала деревоперерабатывающего цеха г.Костанай. Образцы исследования были подобраны согласно следующим параметрам: длина – 100 мм; ширина – 20 мм; толщина в пределах от 6 до 8 мм [4, с. 27].

Извлечение веществ для исследования из коры сосны осуществляли методом вакуумно – импульсной экстракцией [5, с. 107]. В основе этого принципа лежит пропитка сырья экстрагентом под давлением равному атмосферному, что составляло 762 мм. рт. ст., с периодическим подогреванием и вакуумированием до остаточного давления, равному давлению испускаемого пара растворителем при температуре необходимой для закипания экстаргента соединенным с атмосферным давлением.

Результатом данной экстракции является кипение растворителя в порах исследуемого объекта, последующий пар выталкивает экстрагент в общий

объем растворителя. Данная процедура повторяется до выхода системы растворитель – экстракт – пар – экстрагент в состоянии обесцвеченной жидкости или же жидкости цвета растворителя. После экстракции сырье необходимо взвесить и посчитать выход экстрагируемого вещества по формуле:

$$m_{(о.э.)} = m_1 - m_2; \quad (1)$$

где, $m_{(о.э.)}$ – масса общего экстракта;

m_1 – масса экстрагируемого вещества до экстракции;

m_2 – масса экстрагируемого вещества после экстракции;

Исходя из данной формулы, можно вычислить массу, которая получилась в результате процесса вакуумно – импульсной экстракции. Для нахождения чистой массы экстракта необходимо применять следующую формулу:

$$m_{(э)} = m_{(р)} - m_{(о.э.)} \quad (2)$$

где, $m_{(э)}$ – масса чистого экстракта;

$m_{(р)}$ – масса растворителя взятого для экстракции;

$m_{(о.э.)}$ – масса общего экстракта.

Результаты

Так как растворителем был выбран этиловый спирт, доведенный до 98% по концентрации, то экстрагируемыми веществами в преимуществе будут полимерные флавонойды, полифенольные кислоты, ввиду алифатических связей друг с другом, такие соединения наиболее интересные в изучении [6, с.100]. В настоящее время ведутся исследования по экстракции и изучению соединений фенольных пород, их разнообразие обусловлено способностью к конденсации и замещению в ароматических соединениях, как следствие появлению уникального, однообразного вещества обладающего отличительными характеристиками по структуре и свойствам. Изученными представителями данного класса являются лигнины, суберены производные пропана, коричные кислоты производные фенилпропана.

Одними из важнейших свойств многоатомных фенолов выражается в промежуточном соединении биосинтеза, как у целого комплекса фенольного класса, так и на составляющие танниды, которые обладают свойствами дубильных веществ. За счет своей реакционной способностью дубильные вещества могут образовывать комплексные соединения с коллагенами кожи.

Исходя из вышеперечисленного можно сказать, что кора сосны обладает представителями почти всех флавоноидных классов.

Эксперимент был осуществлен в лабораторной установке следующим образом. В двугорлую колбу заливали растворитель спирт этиловый 98%, на которую помещен аппарат с сырьем с обратным холодильником, оснащенную термометром для контроля температуры пара. Растворитель был залит в соотношении с сырьем 1:10. Смесь доводили до кипения и отбирали насыщенный экстрагент для определения pH среды, содержания экстрагируемого вещества контролировали рефрактометрическим методом на установке ИФР 454-Б2М, который был откалиброван стандартными растворами сухого вещества [7, с.152].

Обсуждение

Таблица 1

Кинетика экстракции коры сосны этиловым спиртом

Время затраченное на экстрагирования, мин	Концентрация экстрактивных веществ в экстракте, %	Степень недоизвлечения E 10^2 , %	pH
0	0,0	100,0	6,09
20	2,4	91,4	6,01
40	4,6	47,1	5,98

60	5,8	32,9	5,64
80	6,9	6,4	5,55
100	7,1	1,2	5,22
120	7,1	1,2	5,22

Степень недоизвлечения рассчитывался по формуле:

$$E = \frac{C_\infty - C}{C_\infty - C_o}$$

где $C_\infty = 7,1$; $C_0 = 0$; C – это максимальная начальная и текущая концентрация экстрактивных веществ, %.

Полученные экспериментальные данные (табл.1), показывает превосходство вакуумно – импульсной экстракции над классической экстракцией, преимущественно время и объем растворителя.

Для извлечения экстрактивных веществ (ЭВ) была применена последующая реэкстракция с применением реактивов: сульфат магния, гидроксид натрия спиртовой, дистиллированная вода, кальций хлористый.

Процесс реэкстракции ЭВ осуществлялся следующим образом, после процесса экстракции была замерена pH среда раствора, которая составила 6,09. Для подкисления раствора был выбран реагент, не вступающий в реакцию с растворителем, тем самым не разрушающий структуру ЭВ. Для этого процесса был подобран $MgSO_4$ 20%, для омыления экстрагентов был применен гидроксид натрия спиртовой выдерживался около 15 минут с компонентами экстрагент – $NaOH_{(C2H5OH)}$, данный процесс повторялся до того момента пока слой фаза $NaOH_{(C2H5OH)}$ не станет прозрачным. Для удаления спиртового гидроксида натрия полученную смесь промывали дистиллированной водой до постоянной pH 5,22. Последующее удаление водяного слоя проходило путем высушивания до сухого остатка над $CaCl_2$.

Масса сухого остатка 4,2г., по формуле (2). Сухой остаток растворили в хлороформе для бумажной хроматографии (1мг. в 1мл.) [8, с. 13].

Таблица 2

Изучение сухого остатка методом бумажной хроматографии (БХ)

Исследуемые вещества	Растворитель системы (БХ)	Улавливающий реагент	Цветовой пигмент	
			1	2
флавоны, флавонолы	изопропанол – уксусная кислота – вода (4:1:5); 5% уксусная кислота	3,5% раствор алюминия хлорид; 3,5% раствор железа хлорид (III)	темно- алый, после коричневый	Тускло жёлтый Темно-зеленый
флаваноны	Изопропанол – уксусная кислота – вода (4:1:5)	1% раствор тетрагидридобората натрия с изопропиловым спиртом с подкислением HCl (1, 2 капли)	Слабый оттенок бирюзового цвета	Фиолетовый с красным фоном
алифатические карбоновые кислоты	спирт этиловый – аммиак – вода (13:4:5)	0,05% раствор бромкрезолового зелёного в этиловом спирту	Темно-голубая флуоресценция	жёлтый на синем фоне с переходом с

				оранжевый цвет
Умбеллиферон	Хлороформ – уксусная кислота – этанол (3:1:6)	15% раствор гидроксида калия в этаноле, затем реактив Эрлиха	Точка коричневого цвета	жёлтый, затем, интенсивный оттенок оранжевого цвета

Примечание: для определения Умбеллиферона, смесь хлороформ – уксусная кислота – этанол по соотношению подбиралось экспериментальным образом, по времени выявления пегмента, по скорости его исчезновения см.график 1.

Таблица 3

Показательные характеристики сухого спиртового экстракта коры сосны

Наименование показателей	Показатель	
	твердая фракция	маслообразная фракция
Внешний вид	желтый однородный порошок	вязкий желтый продукт
Температура плавления, °С	63.0	12,2
Кислотное число, мг КОН/г	9.8	10.5
Число омыления, мг КОН/г	113.5	135.8
Йодное число, мг КОН/г	45.3	105.1

Коэффициент преломления	1.38	1.46
Динамическая вязкость ,Па-с	6,29	4,18

В таблице 3 приведены физические и химические испытание полученного сухого остатка.

Можно утверждать, что произошло практически полное извлечение дубильных веществ при спиртовой экстракции с последующей реэкстракцией коры сосны.

О присутствии флавонойдных соединений свидетельствует антоцианидовая реакция. Наличие сапонинов тритерпеновых групп доказывает реакция Лафона [9, с.35].

В ходе анатила удалось определить ряд следующих веществ:

1. Флавонойды – Luteolin, цинарозид [10, с. 1341];
2. Гидроксикоричные кислоты - Синапиновая кислота $C_{10}H_{11}O_3COOH$, пара-Кумаровая кислота, n-кумаровая [11, с.1187].

Проведенные лабораторные испытания сухого остатка с последующим бумажно хроматографическим определением показывает, что сухой остаток фильтра и сухой остаток после упаривания содержат множество биологически активных веществ и могут быть рекомендованы для последующих фармацевтических исследований.

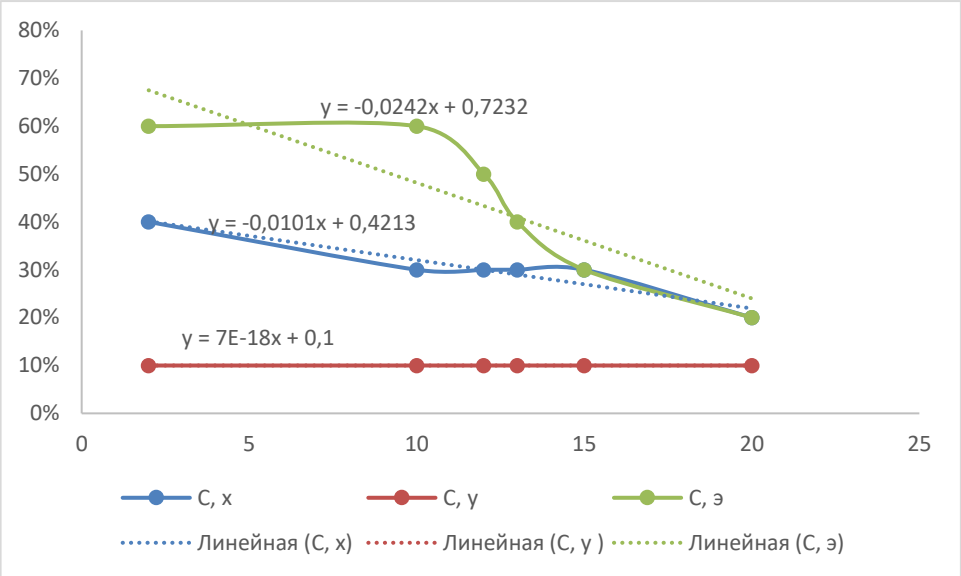

График 1 Поиск оптимальных соотношений в смеси (хлороформ - уксусная кислота - этанол)

Пропорциональное соотношения смеси для хроматографии зависит от скорости появления сигнала до момента его исчезновения. В качестве исследований были взяты следующие соотношения (табл.4):

Таблица 4

Экспериментальные соотношения среды

t, мин	C, x	C, y	C, э
20	20%	10%	20%
15	30%	10%	30%
13	30%	10%	40%
12	30%	10%	50%
10	30%	10%	60%
2	40%	10%	60%

Самым оптимальным соотношением выявлена пропорция 3:1:6, время проявление сигнала продлилась 10 минут от погружения в хроматографическую колонку и до момента исчезновения пигмента время 15

минут. Соотношения 4:1:6 проявляло себя намного быстрее, 2 минуты до появления сигнала с момента погружения, исчезновения пигмента 3 минуты, аналитическая погрешность составила более 60%. Исходя из этих данных, соотношения 3:1:6 проявляет себя самым должным образом для бумажной хроматографии.

Заключение

1. Апробирована вакуумно – импульсная методика экстракции коры сосны, с последующей реэкстракцией для разделения смеси на фазы жидкий экстракт – сухой остаток;
2. Проведено исследование степени извлечения и недоизвлечение с помощью рефрактометрического замера проб через промежуток времени, с параллельным измерением pH среды для контроля и недопущения разложения экстрагируемых веществ.
3. Проведен бумажно хроматографический анализ сухого остатка, растворенного в хлороформе. Данная методика экстракции с последующим восстановлением вещества является новым и эффективным технологическим процессом для извлечения экстрагируемых веществ из коры сосны, и может применятся для испытаний в фармацевтической отрасли.
4. Приведены некоторые характеристики сухого остатка спиртового экстракта для сравнения с последующим изучением динамики накопления веществ.
5. Разработаны оптимальные соотношения системы растворителя для бумажной хроматографии, с практическим применением и выдержкой системы.
6. Методика доказала свою пригодность в испытании и извлечении веществ с последующим их детальным анализом.

Использованные источники:

1. Национальный доклад по науке: МОН РК – Астана, 2015. – 217 с.
2. Пен, Р.З. Комплексная химическая переработка древесины. Введение в специальность: учебное пособие для студ. всех форм обучения / Р.З. Пен, Т.В. Рязанова. - Изд. 2-ое. - Красноярск : СибГТУ, 2012. - 158 с.
3. Литвиненко, В.И. Химия природных флавоноидов и создание препаратов при комплексной переработке растительного сырья: автореф. дис… д-ра фармац. наук: 15.00.02. / Литвиненко В.И. – Харьков, 1990. – 29 с.
4. Бутылкина, А.И. Изучение состава экстрактивных веществ, выделенных из коры сосны различными методами / А.И. Бутылкина, В.А. Левданский, Б.Н. Кузнецов // Химия растительного сырья. - 2011. - № 2. - С. 77-82.
5. Рыбальченко А.С. Ресурсо- и энергосбережение с применением вакуумно-импульсных технологий / Тезисы VI Всерос. студ. НПК с Межд. участием «Безопасность XXI», Новый взгляд на проблемы безопасности в XXI веке. Иркутск, 2001. Т. 1. С. 161–162.
6. Procyanidins and Polyphenols of Larix gmelini Bark / Shen Z., Haslam E., Falshaw C.P., Begley M.J. // Phytochemistry. - 1986. - Vol. 25. - P. 2629-2635.
7. Романков П.Г., Курочкина М.И. Экстрагирование из твердых материалов. Л., 1983. 256 с.
8. Chen P, Song F, LZ L. Chromatographic fingerprint analysis of Pycnogenol dietary supplements. J AOAC Int. 2009;92:624–632.
9. Громова, А.С. Флаваноиды из коры некоторых видов пихты, ели и сосны / А.С. Громова, В.И. Луцкий, Т.В. Ганенко и др. // Химия древесины. - 1978. -№4. -С. 90-98.
10. Yesil-Celiktas O, Ganzera M, Akgun I, Sevimli C, KS K, Erdal B. Determination of polyphenolic constituents and biological activities of bark extracts from different Pinus species. J Sci Food Agric. 2009;89:1339–1345
11. Pan, H. Phenolics from inner bark of Pinus Sylvestris / H. Pan, L.N. Lundgren Phytochemistry. - 1996. - Vol. 42. - N 4. - P. 1185-1189.

Sources used:

1. National Report on Science: MES RK-Astana, 2015. - 217 p.
2. Pen, R. Z. Complex chemical processing of wood. Introduction to the specialty: a textbook for students. all forms of education / R. Z. Pen, T. V. Ryazanova. - 2nd ed. - Krasnoyarsk: SibSTU, 2012. - 158 p.
3. Litvinenko, V. I. Chemistry of natural flavonoids and the creation of preparations for the complex processing of plant raw materials: abstract of the dissertation of the Doctor of Pharmaceutical Sciences: 15.00.02. / Litvinenko V. I.-Kharkiv, 1990. - 29 p.
4. Butlkina, A. I. Study of the composition of extractive substances isolated from pine bark by various methods / A. I. Butlkina, V. A. Levdansky, B. N. Kuznetsov // Chemistry of plant raw materials. - 2011. - No. 2. - pp. 77-82.
5. Rybalchenko A. S. Resource and energy saving with the use of vacuum-pulse technologies / V. I. Tezisy Vseros. student. NPK with It. with the participation of "XXI XXI", XXI XXI.. Irkutsk, 2001. Vol. 1. pp. 161-162.
6. Procyanidins and polyphenols of larch Larix gmelini bark / Z. Shen, Haslam E., Falshaw S. P., Begli J. / / Phytochemistry. - 1986. - Issue 25. - P. 2629-2635.
7. Romankov P. G., Kurochkina M. I. Extraction from solid materials. L., 1983. 256 p.
8. Chen P, Song F, LZ L. Chromatographic fingerprint analysis of Pycnogenol dietary supplements. J AOAC Int. 2009; 92: 624-632.
9. Gromova, A. S. Flavanoids from the bark of some species of fir, spruce and pine / A. S. Gromova, V. I. Lutsky, T. V. Ganenko et al. / / Chemistry of wood. -1978. -No. 4. - pp. 90-98.
10. Yesil-Celiktas o, Ganzera m, Akgun I, Sevimli s, KS K, Erdal B. determination of polyphenolic components and biological activity of bark extracts of various pine species. Jay Scientific Food-X. Sciences'. 2009;89:1339–1345
11. Pan, H. phenols from the inner bark of Pinus Sylvestris / H. Pan, L. N. Lundgren Phytochemistry. - 1996. - vol. 42. - N 4. - p. 1185-1189.