

УДК 543.544.32

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИРТОВОГО И УГЛЕКИСЛОТНОГО ЭКСТРАКТОВ ПАЛЬМЫ САБАЛЯ

© С.Е. Орлова¹, И.Н. Зилфикаров^{1*}, А.М. Алиев²

¹Закрытое акционерное общество «Вифитех», п. Оболенск, Московская обл., 142279 (Россия)

²Горный ботанический сад ДНЦ РАН, ул. М. Ярагского, 75, Махачкала, 367030 (Россия), e-mail: dagfarm@mail.ru

В работе представлены результаты сравнительного фитохимического анализа экстрактов из плодов пальмы Сабалья (*Serenoa repens* (Bartr.) Small.), полученных традиционным способом и сверхкритической флюидной CO₂-экстракцией. В составе экстрактов обнаружены β-амирин (доминирующий компонент) и β-ситостерин. Проведен сравнительный анализ жирно-кислотного состава экстрактов, предложены методики их стандартизации по качественному и количественному содержанию тритерпеноидов и фитостеринов.

Ключевые слова: *Serenoa repens* (Bartr.) Small., жирные кислоты, сверхкритическая экстракция, этанольный экстракт, газожидкостная хроматография/

Введение.

Плоды пальмы Сабалья (*Serenoa repens* (Bartr.) Small., сем. пальмовых – *Arecaceae*) содержат сумму липофильных биологически активных веществ (БАВ), в составе которых обнаружены ненасыщенные жирные кислоты, тритерпеноиды и фитостерины. В ходе многочисленных исследований установлено, что липофильный экстракт плодов пальмы Сабалья обладает способностью подавлять развитие аденомы простаты, поэтому является компонентом фитопрепаратов и биологически активных добавок (БАД), предназначенных для лечения и профилактики заболеваний предстательной железы [1–5]. Основной целью нашей работы является разработка нового лекарственного препарата на основе экстракта плодов пальмы Сабалья, что определило основные задачи исследования, а именно выбор метода экстракции, сравнительную оценку состава и основных физико-химических показателей образцов, полученных экстракцией спиртом 96% и сверхкритическим флюидным (СКФ) CO₂, разработку методик стандартизации.

Экспериментальная часть

Основными объектами наших исследований являются спиртовой и сверхкритический флюидный (СКФ) CO₂ экстракты из высушенных плодов пальмы Сабалья. В качестве объекта для сравнительного анализа использовали капсулы лекарственного препарата «Простамол Уно» (Германия), содержимое которых является нативным спиртовым экстрактом плодов пальмы Сабалья.

Существует несколько способов получения биологически активного экстракта из плодов пальмы

Орлова Светлана Евгеньевна – хроматографист-химик,
e-mail: svetlana.orlova.1986@bk.ru

Зилфикаров Ифрат Назимович – начальник
лаборатории, доктор фармацевтических наук,
e-mail: dagfarm@mail.ru

Алиев Аслан Мурадалиевич – научный сотрудник,
e-mail: aslan4848@yahoo.com

Сабалья, из которых наиболее известный – экстракция плодов спиртом концентрацией от 90 до 96% [6]. Исследуемый в данной работе спиртовой экстракт нами был получен методом дробной мацерации при комнатной температуре с последующим упариванием и фильтрацией извлечения.

* Автор, с которым следует вести переписку.

СКФ- CO_2 -экстракцию осуществляли на экспериментальной лабораторной установке (рис. 1) при давлении 30 МПа и температуре 40 °С. Измельченное до размеров 0,4–0,6 мм сырье в количестве 160 г загружали в экстрактор 1, куда из силового цилиндра 3 подавали диоксид углерода в сверхкритическом состоянии, где настаивали в течение 10 мин. Далее диоксид углерода с растворенным экстрактом выводится в сепаратор 2 при одновременной подаче в экстрактор свежей порции диоксида углерода. В сепараторе при быстром и значительном понижении давления CO_2 (до остаточного давления около 0,5 МПа) создается очень низкая температура (около –25 °С) за счет дросселирования, при этом диоксид углерода переходит из сверхкритического в газообразное состояние и улетучивается, а экстракт осаждается. Давление в системе создается насосом 8, который с помощью дистиллированной воды из резервуара 7 создает в силовом цилиндре давление, необходимое для перехода диоксида углерода в сверхкритическое состояние [7]. Соотношение сырье: экстрагент – 1 : 25.

В ходе фитохимических исследований в экстрактах и содержимом капсул Простамол Уно определяли жирно-кислотный состав липидной фракции (методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ)), качественный состав тритерпенов и фитостеринов (методом тонкослойной хроматографии (ТСХ)) и количественное содержание суммы фитостеринов (методом дифференциальной спектрофотометрии).

Методика анализа жирно-кислотного состава экстрактов методом ГЖХ заключается в следующем. Около 0,05 г экстракта помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 2 мл метанола, 5 капель ацетила хлорида и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Избыток метанола отгоняют нагреванием колбы на водяной бане. В охлажденную реакционную смесь прибавляют 2 мл гексана, перемешивают, раствор фильтруют в пробирку со шлифом и упоривают (испытуемый раствор). С помощью микрошприца вводят 1 мкл испытуемого раствора в хроматограф газовый «Кристаллюкс-4000М» (Россия) с пламенно-ионизационным детектором и программным управлением и анализируют в следующих условиях: колонка капиллярная марки C_{wax} 20 М с внутренним диаметром 0,53 мм, длиной 30 м; размер гранул неподвижной фазы – 3 мкм; температура испарителя + 240 °С; температура колонки + 180 °С; температура детектора + 210 °С; расход газа-носителя (гелия) – 30 см³/мин; расход водорода – 30 см³/мин; расход воздуха – 300 см³/мин.

Методика ТСХ-анализа заключается в следующем. Около 0,5 г экстракта помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл спирта 90%, затем доводят тем же спиртом до метки и перемешивают (испытуемый раствор). На линию старта хроматографической пластинки марки Кизельгель 60 (Мерк) наносят в виде полос по 0,02 мл испытуемых и стандартных растворов. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 20 мин, затем помещают в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную в течение 1 ч смесью растворителей толуол : этилацетат : уксусная кислота (70:30:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей дойдет до края пластинки, ее вынимают из камеры, высушивают на воздухе в течение 30 мин, затем обрабатывают ванилиновым реактивом и нагревают при температуре 100–105 °С в течение 5 мин. В описанных условиях анализируемые соединения хорошо разделяются и проявляются на хроматограмме в виде окрашенных зон и пятен от светло-розового до фиолетово-красного цвета.

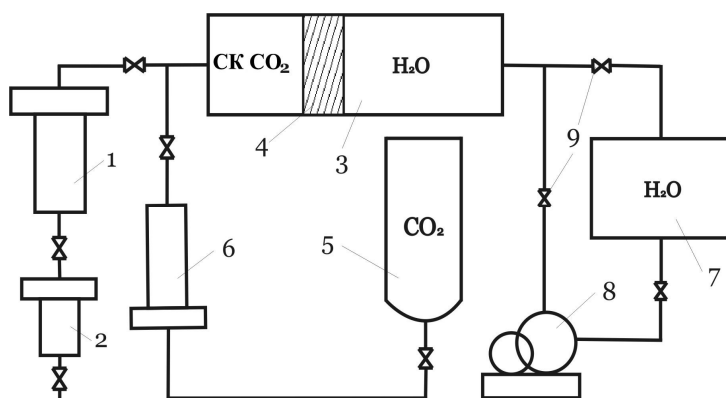


Рис. 1. Принципиальная схема экспериментальной установки для сверхкритической флюидной CO_2 -экстракции: 1 – экстрактор; 2 – сепаратор; 3 – силовой цилиндр; 4 – разделительный поршень; 5 – баллон с CO_2 ; 6 – фильтр очистки CO_2 ; 7 – емкость с дистиллированной водой; 8 – дозирующий насос высокого давления; 9 – вентили

Обсуждение результатов

Полученный нами спиртовой экстракт плодов пальмы Сабаля и содержимое капсул «Простамол Уно» имеют одинаковый внешний вид и представляют собой жидкости густоватые при комнатной температуре темно-коричневого цвета с характерным запахом, практически нерастворимые в воде. СКФ-СО₂-экстракт представляет собой жидкость, густоватую при комнатной температуре и застывающую при температуре ниже + 10 °С, коричневато-оранжевого цвета с характерным запахом, практически нерастворимую в воде.

Анализ качественного и количественного состава жирных кислот, тритерпеноидов и фитостеринов служит подтверждением подлинности и доброкачественности нативного экстракта плодов пальмы Сабаля [4], поэтому одним из результатов проводимого нами сравнительного фитохимического анализа явилась разработка методик его стандартизации.

Идентификацию детектируемых веществ осуществляли с использованием достоверных образцов высших жирных кислот (Sigma), также подвергнутых предварительному метилированию.

В результате анализа в составе исследуемых экстрактов идентифицированы миристиновая, пальмитиновая, пальмитолеиновая, стеариновая, олеиновая, линолевая и линоленовая кислоты в соотношениях (в среднем) 25 : 23 : 1 : 4 : 84 : 10 : 6 соответственно. Установлено также, что экстракты плодов пальмы Сабаля характеризуются повышенным содержанием миристиновой кислоты (табл. 1).

Для подтверждения подлинности экстракта мы также предлагаем методику ТСХ-анализа, которая позволяет обнаруживать тритерпеноиды и фитостерины. Для идентификации отдельных компонентов мы использовали стандартные образцы β-ситостерина и β-амирина (Sigma).

В результате ТСХ-анализа в составе экстрактов обнаружено более 10 соединений, среди которых идентифицированы β-ситостерин и β-амирин. Визуальная оценка площадей пятен позволяет считать, что во всех исследуемых образцах доминирующим веществом является β-амирин (рис. 2).

Для количественного определения суммарного содержания тритерпеноидов и фитостеринов в составе экстрактов нами предлагается методика дифференциальной спектрофотометрии, которая основана на их способности селективно извлекаться хлороформом из неомыляемой фракции и образовывать окрашенные продукты окисления с концентрированной серной кислотой. В качестве стандартного образца для пересчета суммы анализируемых веществ использовали β-амирин.

УФ-спектральный анализ продуктов взаимодействия испытуемого и стандартного растворов с серной кислотой показал, что в условиях анализа они имеют общую полосу поглощения при длине волны 311 нм, которая выбрана нами в качестве аналитической длины волны (рис. 3).

Разработанная нами методика анализа заключается в следующем. Около 0,2 г (точная навеска) экстракта помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 20 мл раствора натрия карбоната 20% и нагревают на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 ч. Колбу охлаждают, прибавляют 20 мл воды, затем смесь количественно с помощью 40 мл хлороформа переносят в делительную воронку вместимостью 125 мл и взбалтывают. После разделения фаз нижний хлороформный слой сливают, экстракцию повторяют 20 мл хлороформа. Объединенное хлороформное извлечение фильтруют через бумажный фильтр с 2 г натрия сульфата безводного, затем фильтрат упаривают под вакуумом досуха. Остаток растворяют в концентрированной серной кислоте и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем раствора доводят до метки концентрированной серной кислотой, затем выливают в сухой стакан и перемешивают (раствор А). 2,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят объем до метки концентрированной серной кислотой, затем выливают в сухой стакан и перемешивают (раствор Б).

Таблица 1. Жирно-кислотный состав исследуемых образцов

№ п/п	Жирные кислоты	Содержание, % от фракции		
		Простамол Уно	Спиртовой экстракт	СКФ-СО ₂ -экстракт
1	Миристиновая	17,29	16,95	14,76
2	Пальмитиновая	14,70	15,25	14,45
3	Пальмитолеиновая	0,79	0,68	0,52
4	Стеариновая	2,24	2,81	2,64
5	Олеиновая	52,43	51,54	57,44
6	Линолевая	6,38	6,38	6,08
7	Линоленовая	1,39	1,47	1,50
8	Не идентиф.	4,78	4,92	2,61

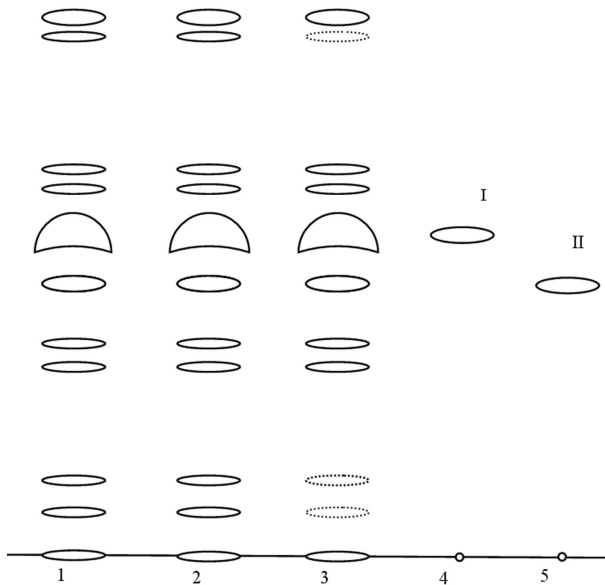


Рис. 2. ТСХ-хроматограмма анализа тритерпеноидов и фитостеринов экстрактов плодов пальмы Сабаля: 1 – Простамол Уно; 2 – спиртовой экстракт; 3 – СКФ-СО₂-экстракт; 4 – раствор СО β-амирина (I); 5 – раствор СО β-ситостерина (II)

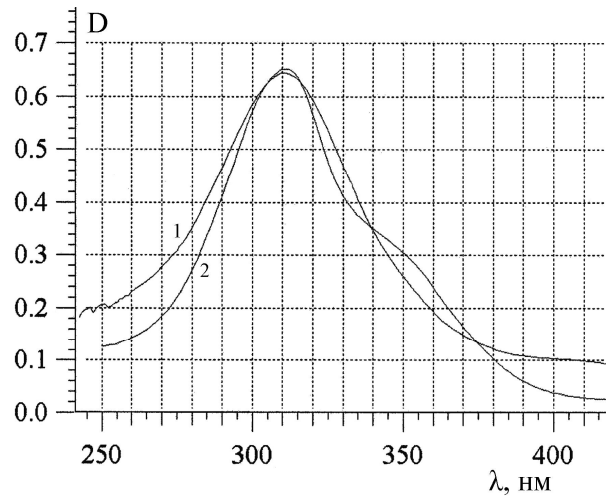


Рис. 3. УФ-спектр поглощения продуктов реакции тритерпеноидов и фитостеринов пальмы Сабаля (1) и СО β-амирина (2) с серной кислотой

Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 311 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют кислоту серную конц. При необходимости раствор Б разводят серной кислотой и при расчетах учитывают коэффициент разведения.

Учитывая ограниченную доступность стандартного образца β-амирина, а также с целью снижения возможной ошибки определения, мы предлагаем использовать рассчитанный нами в условиях анализа удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) β-амирина, равный 340 ($\epsilon = 1,1\%$).

Содержание суммы тритерпеноидов и фитостеринов в экстракте (X) в процентах рассчитывают по формуле

$$X = \frac{D \cdot 25 \cdot 10}{340 \cdot a \cdot 2},$$

где D – оптическая плотность раствора Б; 340 – удельный показатель поглощения β-амирина в условиях анализа; а – навеска экстракта, в граммах

Результаты анализа исследуемых экстрактов на содержание суммы тритерпеноидов и фитостеринов, обработанные статистическим методом, представлены в таблице 2.

Как видно из полученных данных, содержание суммы тритерпеноидов и фитостеринов в экстрактах плодов пальмы Сабаля варьируют от 2,5 до 3,8%; относительное стандартное отклонение методики анализа менее 3,0%. Разработанная методика достоверна, характеризуется селективностью, высокой точностью и воспроизводимостью и может применяться в стандартизации экстракта и лекарственной формы на его основе.

Таблица 2. Содержание суммы тритерпеноидов и фитостеринов в исследуемых образцах

Образец	$X \pm \Delta x$	f	P	S	$\epsilon, \%$
Простамол Уно	$2,50 \pm 0,06$	5	0,95	0,934	2,40
Спиртовой экстракт	$3,80 \pm 0,08$	5	0,95	0,821	2,11
СКФ-СО ₂ -экстракт	$3,30 \pm 0,08$	5	0,95	0,942	2,42

Выводы

Сравнительный анализ основных физико-химических показателей качества экстрактов пальмы Сабаля, полученных спиртовой и сверхкритической флюидной CO₂-экстракцией, показал их сходство по качественному и количественному составу высших жирных кислот, тритерпеноидов и фитостероидов. Полученные результаты позволяют считать СКФ-CO₂-экстракцию перспективным методом в технологии экстракта из плодов пальмы Сабаля, который обеспечивает исчерпывающее извлечение в сочетании с сохранением в нативном состоянии комплекса БАВ. Методики анализа, апробированные на исследованных объектах, позволяют использовать их для стандартизации исходного сырья, полупродуктов и готовых фитопрепаратов, содержащих липофильный комплекс БАВ из плодов пальмы Сабаля.

Список литературы

1. Куркин В.А. Основы фитотерапии. Самара, 2009. 963 с.
2. Орлова С.Е., Зилфикаров И.Н. Фитохимический анализ плодов пальмы Сабаля // Традиционная медицина. 2011. №5. С. 257–258.
3. Темников Н.Д., Еркович А.А. Эффективность терапии при начальной стадии ДГПЖ и простатита комбинированным фитопрепаратом Простагут Форте // Медицина и образование в Сибири. 2010. №1. С. 6.
4. Трапезникова М.Ф., Дугов В.В., Долгов А.Г., Уренков С.Б. Простамол Уно в лечении пациентов с аденомой предстательной железы и хроническим неинфекционным простатитом // Урология. 2008. №5. С. 39–42.
5. Log T. *Serenoa repens* in benign prostatic hyperplasia // Tidsskr Nor Laegeforen. 2008. Vol. 11, N128. Pp. 1293–1294.
6. Орлова С.Е., Зилфикаров И.Н. Технология и стандартизация липофильного экстракта из плодов пальмы Сабаля // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: сб. работ молодых ученых 2 Междунар. научно-практ. конф. Владикавказ, 2011. Ч. 1. С. 279–282.
7. Зилфикаров И.Н., Челомбитко В.А., Алиев А.М. Обработка лекарственного растительного сырья сжиженными газами и сверхкритическими флюидами. Пятигорск, 2007. 244 с.

Поступило в редакцию 13 января 2012 г.

Поле переработки 30 апреля 2012 г.

Orlova S.E.¹, Zilfikarov I.N.^{1*}, Aliev A.M.² TECHNOLOGY AND STANDARDIZATION OF LIPOPHILIC EXTRACT FROM FRUIT OF RALM SAW PALMETTO

¹Closed Joint-Stock Company «Vifiteh», p. Obolensk, Moskovskaia obl., 142279 (Russia)

²Mountain Botanical Garden, Dagestan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, st. M. Iaragskogo, 75, Makhachkala, 367030 (Russia), e-mail: dagfarm@mail.ru

In this paper the results of phytochemical analysis of extract from the fruit of palm saw palmetto (*Serenoa repens* (Bartr.) Small.). In fraction of phytosterols β -sitosterol and β -amirin were found, the dominant component is the β -amirin. Fatty acid fraction of the extract is characterized by a high content of oleic, myristic and palmitic acids. The techniques of standardization of the extract were developed.

Keywords: *Serenoa repens* (Bartr.) Small., fatty acid, supercritical extract, ethyl alcohol extract, gas-liquid chromatography.

* Corresponding author.

References

1. Kurkin V.A. *Osnovy fitoterapii*. [Fundamentals of phytotherapy]. Samara, 2009, 963 p. (in Russ.).
2. Orlova S.E., Zilfikarov I.N. *Traditsionnaia meditsina*, 2011, no. 5, pp. 257–258 (in Russ.).
3. Temnikov N.D., Erkovich A.A. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri*, 2010, no. 1, pp. 6 (in Russ.).
4. Trapeznikova M.F., Dugov V.V., Dolgov A.G., Urenkov S.B. *Urologiia*, 2008, no. 5, pp. 39–42 (in Russ.).
5. Log T. *Tidsskr Nor Laegeforen*, 2008, vol. 11, no. 128, pp. 1293–1294.
6. Orlova S.E., Zilfikarov I.N. *Molodye uchenye v reshenii aktual'nykh problem nauki: sb. rabot molodykh uchenykh 2 mezhdunar. nauchno-prakt. konf.* [Young scientists in solving actual problems of science: a collection of works of young scientists two international scientific conference]. Vladikavkaz, 2011, part 1, pp. 279–282 (in Russ.).
7. Zilfikarov I.N., Chelombit'ko V.A., Aliev A.M. *Obrabotka lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ia szhizhennymi gazami i sverkhkriticheskimi fliuidami*. [Processing of medicinal plants and liquefied gases, supercritical fluids]. Pyatigorsk, 2007, 244 p. (in Russ.).

Received January 13, 2012

Revised April 30, 2012