



## АННОТАЦИЯ

Название дипломной работы - "Интенсификация процессов переработки лекарственного растительного сырья".

Целью работы является изучение влияния ультразвука и микроволнового излучения на степень извлечения активных компонентов из растительного сырья.

Объектом исследования является совокупность необходимых условий, обеспечивающих оптимальный подход к анализу путей интенсификации процессов переработки лекарственного растительного сырья.

Дипломная работа состоит из введения, двух глав, заключения и списка литературы из 22 ссылок, в том числе 5 зарубежных источников. Работа содержит 11 таблиц и 12 формул.

Первая часть работы посвящена истории использования лекарственных растений, содержащих эфирные масла. Перечислены основные свойства растений, дана краткая характеристика основных представителей эфирносодержащих растений (чабрец, душица, фенхель, анис, гвоздика). Описаны методы интенсификации процессов переработки лекарственного растительного сырья. Охарактеризованы методы извлечения лекарственного сырья (активного вещества) из лекарственных трав.

Вторая часть работы содержит экспериментальную часть, в которой представлены объекты и методы исследования.

При обсуждении результатов анализируются полученные данные количественного извлечения компонентов из растительного сырья.

## ABSTRACT

The title of the graduation work is “Intensification of processes of medicinal plant raw materials processing”.

The aim of the work is to study of the effect of ultrasound and microwave radiation on the degree of extraction of the active components of plant raw materials.

The object of the research is a set of necessary conditions that provides the best approach to the analysis of ways of intensification of processes of processing of medicinal plant raw materials.

The graduation work consists of an introduction, two chapters, a conclusion and a list of 22 references, including 5 foreign sources. The work contains 11 tables and 12 formulas.

The first part of the work is dedicated to the history of the use of medicinal plants containing essential oils is considered. The basic properties of plants are listed, the brief characteristic of the main representatives of the ether-containing plants (thyme, oregano, fennel, anise, clove) is given. The methods of intensification of processes of processing of medicinal plant raw materials are described. The methods of extraction of medicinal raw materials (active substance) from medicinal herbs are characterized.

The second part of the work contains an experimental part, which presents the objects and methods of the study.

In the discussion of the results, the obtained chromatographic data are analyzed.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	5
1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР .....	6
1.1 История использования эфирносодержащих растений в медицинской практике .....	7
1.2 Краткая характеристика основных представителей, содержащих эфирные масла (чабрец, фенхель, анис, гвоздика, душица) .....	9
1.3. Методы извлечения лекарственного сырья (действующего вещества) из лекарственных трав .....	12
1.4 Хроматографические методы .....	26
1.5. Интенсификация химических процессов воздействием микроволнового излучения и ультразвука .....	30
2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	34
2.1 Оборудование и объекты исследования .....	34
2.2 Методика выполнения эксперимента .....	34
2.2.1 Хроматографический анализ .....	34
3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....	36
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	44
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ .....	45

## ВВЕДЕНИЕ

В современной фармацевтической практике в последнее время наблюдается устойчивый интерес к фитопрепаратам и биологически активным добавкам на основе растительного сырья. Наряду с традиционными методами экстракционного извлечения компонентов, все чаще применяются такие методы интенсификации, как воздействие на раствор УЗ и СВЧ излучениями.

Основной целью выпускной квалификационной работы является исследование влияния УЗ и микроволнового излучения на степень извлечения действующих компонентов растительного сырья.

Контроль за количественным содержанием компонентов вели с помощью метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

В настоящее время это самый значимый и широко применяемый метод в различных областях науки и промышленности. Преимущества данного метода в отличие от многих других: высокая чувствительность, быстрота, мягкость условий проведения анализа, эффективное разделение и высокая скорость анализа.

В связи с целью были поставлены следующие задачи:

- Подготовить литературный обзор по методам интенсификации процессов, в том числе процессов переработки растительного сырья.
- Исследовать влияние УЗ и микроволнового излучений на извлечение компонентов действующих веществ из образцов некоторых лекарственных растений и растительного сырья.
- Методом жидкостной хроматографии определить количественное содержание действующих компонентов пробы.

## 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

**Экстракция**– это процесс извлечения из твердых тел или жидких смесей одного или нескольких компонентов с помощью растворителя с избирательной растворимостью. Основная цель процесса экстрагирования является получение чистых химических соединений, или разделения близких по свойствам химических веществ [1].

**Фитопрепараты** – любые выдержки или действующие вещества, полученные из ЛРС, или их комбинации в определенной лекарственной форме, что определяет готовый продукт потребления и используется для лечения или профилактики заболеваний. Главное отличие Ф. заключается в том, что они содержат несколько групп веществ, которые условно делятся на действующие, сопутствующие и балластные. Извлечения из ЛРС получают с помощью различных технологических процессов: экстракции, дистилляции, отжима, фракционирование, очистка, концентрирование или ферментации. По способу производства фитопрепараты разделяют на те, что выпускает фармацевтическая промышленность, и экстенпорального (аптечного или домашнего) приготовления [2]. В домашних условиях лекарственные формы готовят на воде, спирте, водке, вине, молоке, минеральных водах, меде, растительных и животных жирах с использованием эмпирического опыта тысячелетий. Из ЛРС готовят экстенпоральные водные настои, отвары или чай, спиртовые настойки, сиропы, мази, выжимают соки из свежего сырья.

**Косметические препараты** - препараты, применяемые для ухода за кожей, ногтями, волосами, полостью рта; выполняются гигиенические, профилактические и эстетические функции. Для достижения максимального положительного косметического эффекта. Косметическим препаратам придается определенная косметическая форма, которая обеспечивает удобство в применении и получения определенной направленности действия [3].

## 1.1 История использования эфирносодержащих растений в медицинской практике

В начале нашего века лекарственные растения составляли 80 % всех используемых лекарственных средств, но затем синтетические, антибиотические и гормональные препараты значительно их потеснили. Однако в настоящее время, несмотря на значительные успехи в создании ценных синтетических лечебных препаратов, лекарства из растений продолжают занимать важное место в современной научной медицине, и соотношение тех и других стабилизировалось. В РФ препараты растительного происхождения составляют примерно 30 % от общего числа в практической медицине [4].

На мировом рынке каждый третий лечебный препарат является препаратом растительного происхождения. Даже в США, где особенно широко применяют антибиотики и гормональные препараты, 26,2 % всех рецептов, реализованных аптеками и больницами, содержат лекарственные растения. Еще шире лекарственные растения используют в Германии, Франции, Японии, Италии, европейских социалистических странах. Во многих странах, особенно в Индии, Пакистане, Шри-Ланке, странах Индокитайского полуострова, Мали, Танзании, лекарства из растений имеют даже большее значение, чем синтетические препараты.

Ассортимент лекарственного растительного сырья в нашей стране, определяется Государственным реестром лекарственных средств, разрешенных для применения в медицинской практике и к промышленному производству.

БАДы – это источник незаменимых питательных веществ, минорных компонентов пищи, про- и пребиотических природных компонентов, которые содержатся в них в пределах физиологических потребностей организма. Основные функции БАД:

- нормализуют обмен веществ, работу ЖКТ, восстанавливают микрофлору кишечника, избавляют от паразитов;

- предупреждают хронизацию воспалительных процессов в организме;
- повышают эластичность сосудов и снижают уровень холестерина в крови [5];
- предупреждают развитие анемии, лейкопении, тромбообразования и поддерживают работу сердца, печени, почек;
- облегчают течение аутоиммунных заболеваний, стимулируют выработку гормонов в организме;
- выводят радионуклиды, соли тяжелых металлов и предотвращают развитие онкозаболеваний.

По данным статистики, сегодня до 70% населения развитых стран мира употребляют БАДы. Главной причиной этого стало стремление людей к здоровому образу жизни. Например, в Японии БАДы с успехом применяются уже более 50 лет и используют их около 40% населения (1000 наименований), в США – более 20 лет, используют 80% населения, зарегистрировано около 3500 БАДов, России – около 10 лет, 3% населения, 30% БАДов отечественного производства (>250 наименований), Казахстан – около 50 добавок (из них 12 отечественных), используют их всего 2 – 3% населения. В РФ регулярно употребляют БАДы лишь 10% населения. На рынке государства в последние годы встречаются 500 – 600 наименований различных БАДов (7% отечественных) в виде различных форм (таблетки, капсулы, порошки, бальзамы, настои и тому подобное). Однако, появившись как в РФ, так и во всем мире, БАДы вызвали настоящий бум у населения, став неотъемлемой частью повседневной жизни. Они раскололи медицинскую общественность на тех, кто «за», и тех, кто «против» использования БАД [6].

Ассортимент фитопрепаратов состоит из:

1. Суммарных фитопрепаратов (нативные, галеновые).
2. Суммарных максимально очищенных фитопрепаратов (новогаленовые).
3. Препаратов индивидуальных веществ (алкалоиды, гликозиды, кумарины).
4. Комплексных (вещества из растений + вещества химические).

## 1.2 Краткая характеристика основных представителей, содержащих эфирные масла (чабрец, фенхель, анис, гвоздика, душица)

### 1. Трава чабреца – *herba serpylli*

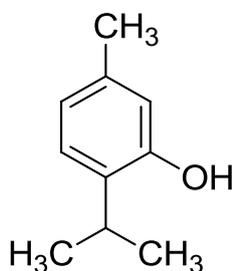
Тимьян ползучий – *Thymus serpyllum* L.

Сем. яснотковые – *Lamiaceae*

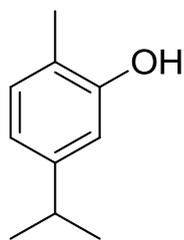
Другие названия: чабрец, богородская трава, боровой перец, материнка, фимиамник

Цветки двугубые, розово-лиловые, в пазушных полумутовках, собраны в головчатые соцветия. Плод состоит из 4 орешков [7].

Химический состав. Трава содержит до до 1% эфирного масла, основным компонентом которого является тимол (до 30%) и карвакрол. Кроме того, эфирное масло содержит *n*-цимол,  $\gamma$ -терпинен,  $\alpha$ -терпинеол, борнеол. В траве обнаружены также дубильные вещества, горечи, камедь, тритерпеновые соединения.



Тимол



Карвакрол

### 2. Плоды фенхеля - *Fructus foeniculi*.

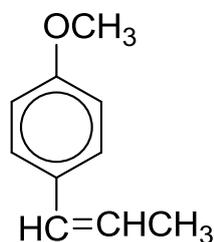
Фенхель обыкновенный - *Foeniculum vulgare* Mill.

Сем. сельдерейные - *Ariaceae*

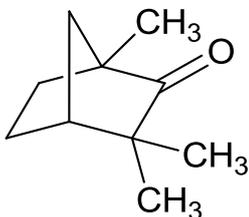
Другие названия: укроп аптечный, укроп волошский

Ботаническая характеристика. Многолетнее, а в культуре - двулетнее травянистое растение. Стебель прямостоячий, кверху ветвистый, высотой 2-1 м. Листья очередные, многократноперистораздельные, с длинными нитевидными долями. Цветки желтые, собраны в соцветие сложный зонтик.

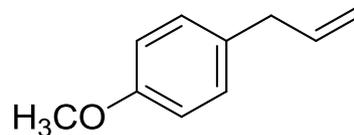
Химический состав. Эфирное масло (не менее 3%). Компонентом его является анетол (50-60%) и фенхол, метилхавикол. Содержатся также жирное масло и белковые вещества [8].



Анетол



Фенхон



Метилхавикол

### 3. Плоды аниса обыкновенного – *fructus anisi vulgaris*.

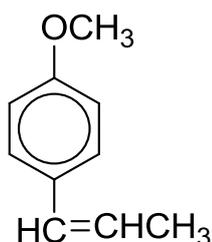
Анис обыкновенный (Бедренец анис) – *Anisum vulgare* Gaertn. (*Pimpinella anisum* L.)

Сем. сельдерейные – *Apiaceae*.

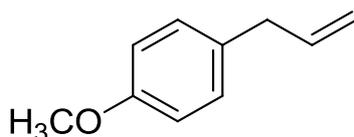
Другие названия: ганус, чанус, чануш.

Анис – однолетнее пряное растение, достигающее в высоту полуметра. Имеет округлый прямостоячий стебель, который ветвится в верхней части. Корень стержневой, тонкий. Нижние листья на длинных черешках, цельные, иногда трехлопастные, округло-почковидные, с крупными зубчатыми краями [9].

Химический состав. Плоды содержат эфирное анисовое масло от 1,2 до 3,2%, реже до 6%. В состав масла входят анетол (до 80-90%), метилхавикол (до 10%), анисовый альдегид, анисовый кетон, анисовый спирт и анисовая кислота. Кроме того, плоды аниса обыкновенного содержат жирное масло (16-28,4%) и белковые вещества.



Метилхавикол



анетол

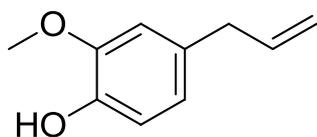
### 4. Гвоздика.

Отдел: *Streptophyta*

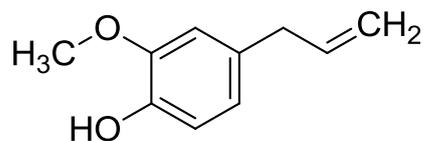
Надкласс: Покритосеменные (Magnoliophyta)  
Класс: Эудикоты  
Подкласс: Розиды (Rosids)  
Порядок: Миртоцветы (Myrtales)  
Семейство: Миртовые (Myrtaceae)  
Подсемейство : Миртовые (Myrtaceae)  
Род: Гвоздика

Крона большая, пирамидальная, высотой 12 м. Листья широколанцетные, мясистые, темно-зеленого цвета. Листья расположены супротивно. Плоды — ягоды, которые содержат одно или два семени.

Химический состав. Почки гвоздики содержат большое количество эфирного масла, в состав которой входит эвгенол, ацетилэвгенол, а также дубильные вещества, органические кислоты (олеаноловая кислота), слизи, жиры [10].



Эвгенол



Ацетилэвгенол

##### 5. Трава душицы – *herba origani*

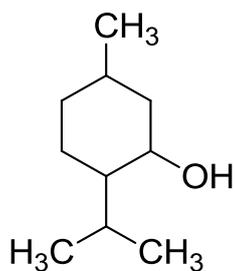
Душица обыкновенная – *Origanum vulgare* L.

Сем. яснотковые – *Lamiaceae*

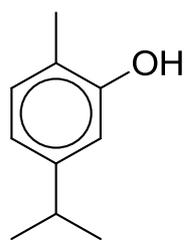
Другие названия: духовой цвет, душица, боровая костоломная трава.

Душица обыкновенная (материнка) семейства губоцветных относится к многолетнее травянистое растение, которое имеет форму полукустарника. Корневище у нее ветвистое и ползучее.

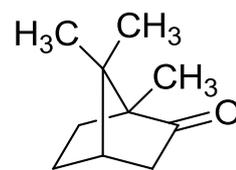
Химический состав. Трава и цветки душицы содержат до 1,2% эфирного масла, в состав которого входят ароматический спирт, фенолы, тимол (до 3,8-10,2%) , карвакрол и камфора.



Тимол



Карвакрол



Камфора

Из травы душицы выделены в фазу цветения полифенольные соединения (до 12-20%) и 5 гликозидов флавоновой природы; в ней найдены также дубильные вещества (1,9-4%).

### 1.3. Методы извлечения лекарственного сырья (действующего вещества) из лекарственных трав

Экстрагирование растительного материала, что имеет клеточную структуру, является сложным физико-химическим процессом, на ход которого влияет ряд факторов, таких как:

- природа экстрагента, степень измельчения растительного материала, температура и продолжительность процесса, разница концентраций веществ в системе и гидродинамические условия, анатомическое строение растительного материала, соотношение сырье-экстрагент.

В качестве сырья для производства экстракционных фитопрепаратов используется сырье мяты и календулы, кроваво-красного боярышника, черноплодной рябины, плодов шиповника, донника лекарственного, тысячелистника обыкновенного, плодов шиповника, боярышника, корней солодки голой, кровохлебки, цветков липы и бузины, листья малины, земляники, смородины, мяты и побегов черники для разработки безалкогольных напитков оздоровительного назначения.

Фитопрепараты промышленного производства содержат [11]:

- 1) сумму БАР (галеновые препараты, настойки, экстракты, соки);
- 2) очищенную сумму действующих веществ (новогаленовые препараты);

3) продукты первичной переработки (эфирные и жирные масла, камеди, смолы).

Лекарственные препараты, содержащие изолированные индивидуальные вещества, полученные из ЛРС (дигоксин, дигитоксин, винкристин, винбластин), не относят к фитопрепаратам, поскольку не имеют тех особенностей поливалентной фармакологического действия, которое обусловлено разнообразным составом БАР и их взаимодействием, присущей природным комбинациям извлечений из ЛРС. Главные признаки Ф. должны отвечать принципам фитотерапии. Много химических соединений, которые изначально были выделены из ЛРС, сейчас получают путем синтеза (атропин, ментол, витамины) или методами биотехнологии (аймалин). Согласно рекомендациям ВОЗ (2002) к фитопрепаратам промышленного производства выдвигаются следующие требования: соответствие стандартам на всех этапах производства для обеспечения постоянного состава растительных БАР; предсказуемость действия благодаря получению однородного сырья; доказана эффективность и безопасность в доклинических и клинических исследованиях.

Требования к экстрагентам. Как растворители для извлечения дубильных веществ используют воду, спирт, водные растворы минеральных кислот, щелочей и тому подобное. Чтобы получить чистые целевые компоненты, экстракты, добытые с помощью различных экстрагентов, подвергают дополнительной очистке от непищевых примесей, иногда их сгущают. Экстрагент в процессе экстракции БАР играет особенно важную роль. Он имеет способность проникать сквозь стенки клетки, избирательно растворять биологически активные вещества и выходить за пределы растительного материала. Поэтому к экстрагентам выдвигают конкретные требования, обусловленные специфическими особенностями фармацевтического производства. Одним из наиболее приемлемых экстрагентов является вода, которая имеет ряд преимуществ, а именно:

- хорошо проникает сквозь клеточные оболочки, непроницаемые для гидрофобных веществ;
- растворяет и вытягивает вещества лучше другие жидкости;
- фармакологически индифферентна;
- очень распространена;
- негорючая и взрывобезопасная;
- доступна по стоимости.

Экстрагирование в системе твердое тело – жидкость является одним из важнейших технологических процессов в химической, фармацевтической, парфюмерной и многих других отраслях промышленности. Весомый вклад в разработку теории и практики экстрагирования внесли Г.А. Аксельруд, Г.Н. Доброхотов, П.Г. Романков, В.М. Лисянский, В.В. Белобородов.

Извлечения целевых компонентов из растительного сырья, является гораздо более сложным по сравнению с экстрагированием целевых компонентов из минерального сырья, поскольку клеточное строение растительного сырья является сложной и недостаточно изученной. Поскольку вещество, что изымается, образует с твердой фазой разнообразные связи, то экстрагирование не сводится к простому промыванию сырья, а сопровождается разрушением этих связей с образованием новых. Процесс тормозят и трудности, связанные с проникновением растворителя в твердую частицу и выход его вместе с веществом из этой частицы. Следовательно, процесс имеет сложный физико-химический характер. Сложность процесса экстрагирования связана с рядом таких процессов как смачивание, набухание, растворение, химическое взаимодействие, адсорбция, абсорбция, диффузия, диализ и тому подобное.

Пропитка растительного материала экстрагентом осуществляется за счет капиллярных явлений. По каналам, которые образуются между частицами измельченного материала, по межклеточным ходам, по микро – и ультрамикропорах экстрагент проникает в толщу сырья и в середину клеток. При проникновении экстрагента в клетке образуется концентрированный

раствор веществ, и этим заканчивается вторая стадия и начинается третья стадия процесса экстрагирования – стадия массообмена [12].

В свою очередь равновесная концентрация зависит от агрегатного состояния целевого компонента, подлежащего изъятию. Если целевой компонент находится в капиллярах (порах) материала в растворенном виде, то в условиях равновесия его концентрация в порах твердого материала и в основной массе растворителя – выравниваются. Если целевой компонент находится в твердом виде, то в процессе его растворения равновесие наступает тогда, когда концентрация  $Q$  в основной массе растворителя достигает концентрации насыщения  $C_s$ . Поэтому при определении движущей силы процесса экстрагирования необходимо в первую очередь выяснить, в каком состоянии находится целевой компонент в порах твердого материала – жидком или твердом. Движущей силой процесса экстрагирования является разность равновесных и рабочих концентраций целевого компонента. Процесс массообмена является диффузионным процессом, и в этом сложном процессе различают две принципиально отличные друг от друга виды диффузии [13]:

- молекулярную диффузию – внутреннюю;
- конвективную диффузию.

На первый взгляд, простым средством интенсификации является уменьшение размеров частиц, поступающих на экстрагирование. Но такой метод вызывает негативные последствия в существующих операциях измельчения (перед экстрагированием) и отделение раствора от твердой фазы (после экстрагирования). Действительно, с уменьшением размера частиц возрастают затраты энергии, расходуемой на работу дробилок или мельниц, а также трудности при реализации фильтрации или отстаивания.

Для расчета процесса массопередачи во время экстрагирования в системе твердое тело-жидкость ставится цель определить концентрацию экстрагированного компонента в растворе и внутри частиц твердой фазы в любой момент времени от начала процесса. Кинетика этого процесса

описывается известными уравнениями нестационарной диффузии. Это задача решается на основе дифференциального уравнения Фика и известных дифференциальных уравнений, граничных и начальных условий. Твердое пористое тело содержит в своем пористом объеме раствор целевого компонента.

Ныне одним из самых распространенных методов интенсификации экстрагирования является использование сжиженных газов. Впервые их начали использовать как растворители в начале 1930-х гг. в бывшем СССР, а с 1960-х гг. – в пищевой отрасли в промышленном масштабе. Наиболее исследованным экстрагентом был сжиженный диоксид углерода  $\text{CO}_2$ , реже применяли пропан и бутан. Извлекаемые вещества имели преимущественно гидрофобный характер: жирные, эфирные масла, каротиноиды, стерины, токоферолы и терпеноиды [14]. На сегодня жидкий  $\text{CO}_2$  остается самым популярным экстрагентом в России и за рубежом.

В РФ, начиная с 1980-х гг., проводили экспериментальные исследования по применению фторпроизводных углеводородов (фреонов) в качестве экстрагентов ЛРС. Установлено, что некоторые марки фреонов (например, хладон-22) благодаря большей полярности извлекают широкий спектр БАВ, чем жидкий  $\text{CO}_2$ : эфирные и жирные масла, жирорастворимые витамины, кумарины, каротиноиды, сложные фенолоспирты, вальтрати, иридоиды, некоторые алкалоиды и флавоноиды. Кроме того, отдельные фреоны (например, С318) имеют очень высокую селективность, позволяя экстрагировать эфирные масла без сопутствующих жирных.

Обычными методами, используемыми в настоящее время для выделения эфирных масел из натуральных продуктов, являются паровая дистилляция и экстракция растворителем. При использовании этих методов извлечения могут встречаться потери некоторых летучих соединений, низкая эффективность экстракции, деградация ненасыщенных соединений за счет тепловых или гидролитических эффектов и токсичный остаток растворителя в экстракте. В последнее время для выделения органических соединений из

разных растений были использованы более эффективные способы экстракции, такие как сверхкритическая экстракция флюидов и ускоренная растворителем экстракция растворителем. Недавний аналитический интерес к перегретой воде в качестве экстракционного растворителя начался с работы Хауторна и др. с экстракцией полярных и неполярных аналитов из образцов почвы. В последнее время для исследования твердых образцов в ряде исследований используется метод непрерывной экстракции перегретой водой (SWE). Совсем недавно переработанная технология экстракции воды была рассмотрена Смитом . Термин «перегретая вода» используется для обозначения области конденсированной фазы между  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$  и критической точкой ( $374\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Давления, необходимые для поддержания конденсированного состояния воды, являются умеренными: 15 бар при  $200\text{ }^{\circ}\text{C}$  и 85 бар при  $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Предыдущие исследователи сообщили, что перегретая вода для экстракции эфирных масел является мощной альтернативой, поскольку она позволяет быстро извлекать и использовать низкие рабочие температуры. Это позволяет избежать потери и деградации летучих и термолабильных соединений. Дополнительными положительными аспектами использования этого метода являются его простота, низкая стоимость и благоприятное воздействие на окружающую среду. Экстракцию эфирного масла листьев душицы мелкоцветковой изучали с использованием перегретой воды при различных температурах. Сбор компонентов из водного экстракта осуществляли с использованием материала C18 SPE. Всестороннее ГХ  $\times$  GC-TOF-MS успешно достигли разделения и идентификации компонентов, которые не могут быть отделены друг от друга, используя одномерную технику. Система GC $\times$ GC-TOF-MS состояла из HP 6890 (Agilent Technologies, Пало-Альто, Калифорния) GC и Pegasus III TOF-MS (LECO, St. Joseph, MI). Первая колонка была неполярный DB5 (10 мкм  $\times$  0,18 мм, 0,18 мкм толщина пленки), а вторая колонка - полярная (1,16 мкм  $\times$  1,18 мм, 0,18 мкм толщина пленки). Обе колонки были приобретены у J & W Scientific (Фолсом, Калифорния). Колонки были соединены с помощью

пресс-разъема. Колонка второго измерения была установлена в отдельный термостат, который поддерживался в основном термостате ГХ. Отдельный термостат предоставлял более гибкую систему, потому что он позволяет сделать точную настройку удержания во второй колонке с использованием более высокой или более низкой температуры относительно колонки первого измерения. В конкретно этой системе необходимость использования системы с двумя термостатами была обусловлена соображениями стабильности детектора, требующего точного и стабильного контроля температуры второй колонки. Контроль температуры обоих термостатов обеспечивает более быстрое и более высокое разрешение. Экстракт перегретой воды при 150 ° С дает выход 0,64%, что почти на 30% выше, чем у дистилляции воды. Состав эфирного масла изменился с изменением температуры. Продукты реакции потемнения наблюдались при температуре 175 ° С. Экстракционные кинетические исследования показали, что экстракция происходит очень быстро при высоких температурах (175 ° С), что дает 100% -ную рекуперацию через 5 мин по сравнению с экстракцией при 100 ° С, при которой такое же восстановление было достигнуто только после 25-минутной экстракции. Метод перегретой воды является значительно более быстрым способом экстракции, чем обычные технологии производства эфирных масел, а также более чистым, дешевым и экологически безопасным. [15].

В последние несколько лет, исследователи начали уделять особое внимание изучению идентификации и определения феноловых соединений в лечебных травах. Множество аналитических процедур (TLC, LC-DAD, LC-FLD, LC-MS, GC и CE) были разработаны для количественного подсчета фенольных соединений в травах. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, связанный с детектированием диодной матрицы, (ВЭЖХ-ДЭД) один из наиболее часто используемых методов, благодаря высокой селективности, репродуктивности и простоты. Существует несколько опубликованных данных, которые посвящены идентификации и

количественному определению компонентов полифенолов, найденных в экстрактах трав. Согласно исследованиям Багдонец, флавоноиды, найденные в Зверобое проломниколистом, представляют собой витамин Р(рутин), гиперозид, кварцетинрамнозид, кварцетин и 3,8<sup>n</sup> биапигенин. Другое количество фенольной кислоты и флавоноидов (кофеиновая кислота, розмариновая кислота, лютеолин, апигенин, нариненин и эриодиктил) были обнаружены в экстрактах душицы обыкновенной, которые были качественно оценены Крумом. Халилом были обнаружены хлорогеновая кислота, кумариновая кислота и феруловая кислота спиртовых экстрактах Календулы лечебной. Другая техника обычно используется для при анализе природных экстрактов ЖХ-МС, что дает быстрое и точное подтверждение химических соединений и широко используется для анализа фенольных соединений в травах.

Для подготовки стандартного раствора, точно взвешенного с расчетом 1 мг растворяли все стандартные вещества в 1 мл метанола. Все растворы разбавлялись в подвижной фазе и нагревались до комнатной температуры до каждого анализа. Высушенные растения Календулы лечебной, Зверобоя проломниколистого, Подмаренника настоящего и Душицы обыкновенной, были куплены на Румынском рынке. Пять миллиграмм каждого растения были вымочены в 50 мл водного раствора этанола [30, 50 и 70% (мас. / об.)] и были оставлены в течение одной недели при температуре 4°C в темноте. Затем экстракт был профильтрован с помощью 0.2 мм хроматографического фильтра. Профильтрованный раствор выдерживался при температуре 4°C перед каждым анализом. Большое количество экстрактов Календулы лечебной, Зверобоя проломниколистого, Подмаренника настоящего и Душицы обыкновенной были куплены у румынских производителей, найденных на продуктовом рынке. Большое количество экстрактов Календулы лечебной были куплены у трех разных поставщиков ((D. Plant, Brasov County, Hof.Завод, Бухарест и P. Санто, Бухарест). Экстракт Зверобоя проломниколистого и был приобретен у D. Plant (Брашовский уезд) и Хоф

Плант. И экстракты Подмаренника настоящего были предоставлены D. Plant. И R. Santo. Поставщики отметили, что все экстракты имеют минимум 40% содержания этанола в своем составе. Все экстракты хранились при температуре 4°C до анализа. Образцы фильтровались через фильтр 0,2 мм и были непосредственно введены в систему ВЭЖХ.

Для идентификации соединений использовались два типа обнаружения соединения: DAD и масс-спектрометрическое обнаружение. Для хорошего разделения различных подвижных фазовых составов (вода / муравьиная кислота: метанол / муравьиная кислота при pH = 2,7; вода / муравьиная кислота: метанол / муравьиная кислота при pH = 3,5; 0,5% муравьиная кислота / вода: муравьиная кислота / ацетонитрил / вода; 0,5% муравьиной кислоты в воде: 0,5% муравьиной кислоты в ацетонитриле при pH 4,0), и было протестировано и обнаружено, что ацетонитрил: вода с муравьиной кислотой при соотношении pH 4,0 является наиболее подходящей для элюирующей системы. Очень важно использовать именно подвижную фазу, в ЖХ-МС методе для того, чтобы улучшить ионизацию. Добавление кислотных модификаторов, таких как слабые кислоты (муравьиная кислота, TFA), распространены при данных методах. При различных концентрациях некоторые добавки, такие как трифторуксусная кислота может определять подавление ионов и уменьшать чувствительность в некоторых методах ЖХ-МС. Чтобы идентифицировать соединения, был использован ИППА в отрицательном режиме. Идентификация и количественная оценка соединений проводили с использованием КЗИ (контроль заданных ионов) детектирующая ионная хроматограмма при значениях  $m/z$ , соответствующих к молекулярному весу идентифицированных фенольных соединений. Условия МС позволили обнаружить молекулярные ионы для каждого соединения и продуцировали фрагментацию в отрицательный режим ИППА. Непротонные молекулярные ионы  $[M-2H]^-$  были обнаружены при  $m/z$  353,31 для хлорогеновой кислоты, 289,20 для (p)-катехина, 179,16 для кофеиновой кислоты, 289,27 для -эпикатехина, 609,52 для рутина,

163,16 для кумарической кислоты , 463,38 для изоккерцитина , 193,18 для феруловой кислоты ,609,56 для гесперицина , 285,23 для физетина , 301,23 для кверцетина , 315,26 для изорамнетина и 253,24 для хризина .[16]

Учитывая важность фенольных веществ, метод ВЭЖХ с использованием фенолов в качестве компонентов маркера был разработан в качестве инструмента стандартизации для «Chyavanprash», широко используемой лекарственной формы в Индии и других странах в качестве пропаганды здорового образа жизни и профилактики заболеваний. Таким образом, имея в виду его биологическую важность, метод быстрой оценки и разделения этих фенолов стал необходимостью в разработке лекарственных трав, нутрицевтиков и фармацевтических препаратов. Хотя в их анализе было много разных подходов, разделение и количественное определение фенольных соединений растительного экстракта остается сложным. Это особенно справедливо для одновременного определения различных групп фенолов в единственном анализе. ВЭЖХ является методом выбора для анализа фенольных соединений из-за его чрезвычайно высокой универсальности, точности и относительно низкой стоимости . Наиболее часто предпочтительным методом являются колонки с обращенной фазой (RP) C18, бинарная система растворителей, содержащая подкисленную воду, полярный органический растворитель (ацетонитрил или метанол) и детектирование ультрафиолетовой диодной матрицы (DAD), которые составляют решающее и надежный инструмент в рутинном анализе фенольных растений . Получение хорошего разрешения рассматривается как предпосылка для метода, направленного на разделение множественных фенольных групп . Согласно наиболее актуальной библиографии, хроматографический метод ВЭЖХ-ДАД представляется подходящим инструментом для разделения и количественного определения фенольных соединений в растительных экстрактах . Альтернативно, спектрофотометрический метод идеально подходит для количественной оценки, но недостатком этого метода является то, что суммарные фенолы

измеряются без разбора. Полифенолиты является довольно широким термином, который охватывает множество различных подгрупп фенольных кислот и флавоноидов. Было идентифицировано более 5000 полифенолов, в том числе более 2000 флавоноидов, и число продолжает расти. Полифенолов различаются по структуре: гидроксibenзойная кислота и гидроксикоричные кислоты имеют одну кольцевую структуру, в то время как флавоноиды могут быть дополнительно классифицированы на антоцианы, флаван-3-олов, флавоны, флавонолы и флаванонов. Некоторые из флавоноидов, таких как флаван-3-олы, можно найти в димерах, тримерах и полимерах. Флавоноиды представляют собой производные бензо- $\gamma$ -пирона, состоящие из фенольных и пирановых колец. Они состоят из бензольных колец, содержащих кислородсодержащее пирановое кольцо. Различия в замещении на кольце выделяют неодинаковые классы флавоноидов. Был разработан метод ВЭЖХ для разделения и количественного определения шести различных типов фенолов с общим количеством 15 различных фенолов в единственном анализе. Спектры каждого из фенолов также регистрировались и анализировались для изучения точности метода и для простой идентификации соединений. Метод ВЭОГО был подтвержден путем определения линейности, пика чистоты, границ количественного анализа и обнаружения, точности, прочности, специфичность и надежности. Для получения качественных целей, метод был оценен, принимая во внимание точность времени удерживания, пиковую чистоту и селективность фенольных соединений, извлеченных из адсорбента. Высокая повторяемость во времени удерживания было получено с РСД значения ниже, чем 5% для обоих стандартов и смеси фенольных соединений, даже при ее высокой концентрации. Пик чистоты изучали в смеси фенолов. Ни в коем случае не наблюдались примеси или взаимосвязи (коэффициент соответствия  $\geq 93\%$ ). Линейность, границы выявления (LOD), предел количественного определения (LOQ), точность и точность были оценены для количественных целей. Значения LOD в диапазоне от 0,6 до 1,97 мкг / мл значения, и ПКО от

3,9 до 7,8 мкг / мл, который предложил полную мощность для количественного определения каждого исследуемого фенольного соединения. Значения R<sup>2</sup> фенольных соединений были выше 0,92, что подтверждает линейность метода. Высокие показатели восстановления из смеси фенолов (около 91%) и также высокая повторяемость показали достаточную точность предложенного метода. Более того, точность не зависела как от концентрации соединения, так и от химической структуры. Наконец, была оценена надежность метода. Незначительные изменения начального подвижного фазового градиента (от 7 до 18% растворителя В вместо 12%) не оказали существенного влияния на пиковое разрешение соединений: все пики были урегулированы надлежащим образом без слитых пиков, хотя был минимальный сдвиг в задержки времени (RT). При уменьшении размера колонки от 250 × 4,6 мм до 150 × 3,9 мм наблюдалось уменьшение RT всех пиков на 1,5-1 мин, но влияние на разрешение (растворение?) пиков было минимальным. То же самое произошло при изменении расхода. Таким образом, этот метод ВЭЖХ можно рассматривать как селективный, точный, четкий и надежный, имеющий широкий объем в области разработки лекарственных препаратов из натуральных продуктов и контроля их качества и стандартизации.[17]

Тимол (2-изопропил-5-метилфенол) и карвакрол (5-изопропил-2-метилфенол) являются двумя основными компонентами тимьянового масла, эфирного масла *Origanum vulgare* (oregano), дикого бергамота и растений, включая *Thymus vulgaris*. Эти соединения в качестве натуральных добавок применяются во многих пищевых продуктах (в качестве ароматизаторов), парфюмерии и фармацевтических препаратах из-за их противокашлевых, антибактериальных, противогрибковых, антиоксидантных, противоопухолевых и антиканцерогенных свойств . Поскольку они используются для стандартизации фармацевтических соединений на основе их содержания тимола или карвакрола, разработка нового утвержденного метода их экстракции и определения является сложным требованием [20]. Различные аналитические методы, такие как

тонкослойная хроматография (ТСХ) в сочетании с денситометрией , газовая хроматография (ГХ) , газовая хроматография-масс-спектрометрия (ГХ-МС) (ВЭЖХ) с флуориметрическим детектированием были применены для их определения в различных матрицах. В некоторых случаях их более низкое содержание в сложных матрицах создает чрезвычайную задачу для предварительного применения методов разделения и прекоцентрации . Эта цель может быть достигнута путем сочетания нового и экологически чистого метода подготовки проб с передовыми инструментами для более эффективного анализа содержимого аналитов . Различные способы, такие как диспергирующая жидкость-жидкостная микроэкстракция (DLLME) , поддерживаемая жидкая мембрана (SLM) , микроэкстракция полых волокон (HF-LPME) , твердофазная микроэкстракция (SPME) , жидкофазная микроэкстракция (LPME) и матричная твердофазная дисперсия (MSPD) описаны и разработаны для предварительного разделения и / или концентрирования целевых соединений. DLLME в качестве методики предварительной обработки миниатюрных образцов с использованием объемов микролитра экстракционного растворителя и нескольких миллилитров диспергирующих растворителей был разработан Ассади и др. Из-за относительно большого объема диспергирующего растворителя в DLLME было уменьшено распределение и экстракция анализируемого вещества в фазу экстрагента. Это ограничение может быть решено путем разработки новых методов и уменьшения и / или устранения содержания и количества диспергирующего растворителя . Для этой цели были разработаны некоторые новые методы микроэкстракции, такие как жидкостно-жидкостная микроэкстракция с вихревой жидкостью (VALLME) и дисперсионная жидкостно-жидкая микроэкстракция с вихревым движением (VADLLME) . Эти методы основаны на дисперсии экстракционного растворителя в водных образцах путем вихревого смешивания в качестве мягкой процедуры эмульгирования. В этих способах основное ограничение DLLME (применение дисперсионного растворителя) и деградация аналитов разрешалось путем пропускания дисперсионного растворителя, уменьшения времени экстракции и потребления растворителя и, наконец, увеличения выхода

экстракции и улучшения качества экстрактов. В последние десятилетия было разработано использование поверхностно-активных веществ (амфифильных молекул) в качестве растворителей для зеленой экстракции. Эти соединения обладают уникальными физико-химическими свойствами, такими как высокая растворимость в воде и органических растворителях, хорошая сольватирующая способность органических и неорганических соединений, высокая термическая стабильность, в качестве эмульгатора для улучшения дисперсии несмешиваемых с водой фаз и ускорения образования мелких капель экстракции растворителя в водном растворе образца. Применение поверхностно-активного вещества в качестве эмульгатора уменьшает межфазное натяжение между двумя фазами (мостик между ними) и может способствовать диспергированию органического растворителя в водной фазе. Существует несколько экспериментальных переменных, влияющих на процедуру диспергирования жидкостно-жидкостной микроэкстракции (VASEDLLME) с использованием вихревой абсорбции. В подходе с одной переменной по времени (OVAT) каждая связанная переменная менялась, а все остальные переменные сохранялись фиксированными в определенном наборе условий без внимания к любому взаимодействию между переменными. Однако для этой процедуры требуется большое количество экспериментов (высокий расход реагента), и это также требует много времени. Хороший выбор моделей проектирования и оптимизации позволяет одновременно оценивать влияние переменных во время процесса извлечения. Многомерные подходы, основанные на экспериментальном проекте, применимы для одновременной оценки взаимодействия основных эффектов и переменных с наименьшим числом прогонов. Стадии процедуры VASEDLLME выполняли следующим образом: 140 мл  $\text{CHCl}_3$  (в качестве экстракционного растворителя) быстро вводили в 5,0 мл водного образца, который содержал 0,02 мг L21 каждого соединения и 0,08 мг / мл Triton X -100 (в качестве эмульгатора) в 10-миллилитровой стеклянной трубке с коническим дном. Пробирку сразу закрывали, и затем смесь энергично встряхивали, используя вихревую мешалку в течение 3,0 мин при 2500 об / мин. Во время процесса вихревого перемешивания

образуются мелкие капельки, которые облегчают массовый перенос аналитов из водного образца в экстракционный растворитель. Разделение фаз было достигнуто путем центрифугирования в течение 6,0 мин при 4500 оборотах в минуту. Фазу СНСІЗ (130 мл) осаждали в нижней части трубки центрифуги, полностью переносили в пробирку для образца ВЭЖХ с использованием 200,0 мл ВЭЖХ-шприца (Гамильтон) и выдували до сухости потоком слабого азота. Остаток (в виде осажденной фазы) растворяли в 250 мл ацетонитрила и 5,0 мл этого образца вводили в систему ВЭЖХ для последующего анализа. Во всех реальных образцах, содержание Тимусов оценивали с помощью стандартного метода сложения.

Результаты, полученные в результате проверочных экспериментов, показывают, что предложенный метод может быть применен для определения карвакрола и тимола в образцах фармацевтических препаратов и тимьянов. В этой работе процедура экспериментального проектирования сначала использовалась для эффективности методологии с помощью скрининга Р-В для изучения основных переменных, а затем ПЗС и РСМ для оптимизации переменных с использованием DF. Кроме того, DF использовался для определения оптимального процент ER путем одновременного вычисления оптимизации конкретной переменной. Применение VASEDLLME вместе с процедурой оптимизации желательности привело к успешному определению карвакрола и тимола с хорошей чувствительностью, повторяемостью и коротким временем экстракции и разделения.[18]

#### 1.4 Хроматографические методы.

Хроматография – это метод разделения и определения веществ, основанный на распределении компонентов между двумя фазами – подвижной и неподвижной. Неподвижной (стационарной) фазой служит твердое пористое вещество (часто его называют сорбентом) или пленка жидкости, нанесенная на твердое вещество. Подвижная фаза представляет собой жидкость или газ, протекающий через неподвижную фазу, иногда под

давлением. Компоненты анализируемой смеси (сорбаты) вместе с подвижной фазой передвигаются вдоль стационарной фазы. Ее обычно помещают в стеклянную или металлическую трубку, называемую колонкой. В зависимости от силы взаимодействия с поверхностью сорбента (за счет адсорбции или по какому-либо другому механизму) компоненты будут перемещаться вдоль колонки с разной скоростью. Одни компоненты останутся в верхнем слое сорбента, другие, в меньшей степени взаимодействующие с сорбентом, окажутся в нижней части колонки, а некоторые и вовсе покинут колонку вместе с подвижной фазой (такие компоненты называются неудерживаемыми, а время их удерживания определяет “мертвое время” колонки). Таким образом, происходит быстрое разделение сложных смесей компонентов. Следует подчеркнуть следующие достоинства хроматографических методов:

1. Разделение носит динамический характер, причем акты сорбции и десорбции разделяемых компонентов повторяются многократно. Этим обусловлена значительно большая эффективность хроматографического разделения по сравнению со статическими методами сорбции и экстракции.

2. При разделении используют различные типы взаимодействия сорбатов и неподвижной фазы: от чисто физических до хемосорбционных. Это обуславливает возможность селективного разделения широкого круга веществ.

3. На разделяемые вещества можно накладывать различные дополнительные поля (гравитационное, электрическое, магнитное и др.), которые, изменяя условия разделения, расширяют возможности хроматографии.

4. Хроматография – гибридный метод, сочетающий одновременное разделение и определения нескольких компонентов.

5. Хроматография позволяет решать как аналитические задачи (разделение, идентификация, определение), так и препаративные (очистка, выделение, концентрирование). Решение этих задач можно сочетать, выполняя их в режиме “on line”.[19]

Для решения аналитических задач используется элюентный метод, он имеет следующие достоинства: – дает наиболее полное разделение, поскольку зоны сорбатов разделены зонами элюента; – сорбент непрерывно регенерируется; – параметры удерживания хорошо воспроизводимы. Элюентная хроматограмма, являющаяся зависимостью сигнала прибора (ось ординат) от времени или объема подвижной фазы (ось абсцисс), представляет собой совокупность пиков разделяемых компонентов.

Газовая хроматография – метод разделения летучих, термостабильных соединений. Этим требованиям отвечает около 5% известных органических соединений, но именно эти соединения оставляют 70-80 % соединений, которые использует человек в сфере производства и быта. Подвижной фазой служит инертный газ (газ-носитель), протекающий через неподвижную фазу, имеющую большую поверхность. В качестве подвижной фазы можно использовать водород, гелий, азот, аргон и углекислый газ. Наиболее часто используют азот, как более доступный и дешевый. Газ-носитель обеспечивает перенос разделяемых компонентов по хроматографической колонке и не взаимодействует ни с разделяемыми веществами, ни с неподвижной фазой. Достоинствами газовой хроматографии являются

: – сравнительная простота аппаратного оформления;

– весьма широкие границы применимости (можно определять соединения, для которых достигается давление насыщенного пара 0,001-1 мм рт.ст.);

- возможность определения с высокой точностью малых количеств газов органических соединений с высокой точностью;
- быстрота анализа;
- широкий выбор сорбентов и неподвижных фаз;
- высокая гибкость изменения условий разделения;
- возможность осуществления химических реакций в хроматографической колонке или детекторе, что расширяет круг анализируемых соединений (реакционная газовая хроматография);
- повышение информативности при сочетании с различными инструментальными методами (масс-спектрометрией и ИК(Фурье)спектрометрией).

Жидкостная хроматография (ЖХ) - метод разделения и анализа сложных смесей веществ, в котором подвижной фазой является жидкость. Подвижная фаза в жидкостной хроматографии выполняет двойную функцию: 1) обеспечивает перенос десорбированных молекул по колонке (подобно подвижной фазе в газовой хроматографии); 2) регулирует константы равновесия, а, следовательно, и удерживание в результате взаимодействия с неподвижной фазой (сорбируясь на поверхности) и с молекулами разделяемых веществ. В ЖХ природа подвижной фазы имеет существенно большее значение. В результате комбинации ограниченного числа сорбентов и неограниченного числа, различных по составу, подвижных фаз возможно решение чрезвычайно большого числа встречающихся на практике задач. Метод ЖХ применим для разделения значительно более широкого круга веществ, чем газовая хроматография, поскольку большая часть веществ не обладает летучестью, а многие вещества неустойчивы при высоких температурах. В ЖХ разделение обычно происходит при комнатной температуре. ЖХ подразделяется на варианты в соответствии с характером

основных проявляющихся межмолекулярных взаимодействий: – в ситовой хроматографии разделение компонентов осуществляется за счет разницы в растворимости молекул при их прохождении (фльтрации) через слой сорбента; – в адсорбционной хроматографии – за счет разницы в адсорбируемости молекул, проходящих через слой частиц сорбента, покрытых неподвижной фазой в виде тонкого слоя или поверхностнопривитых радикальных групп; – в ионообменной и ионной хроматографии – за счет разницы в способности к обмену ионами с ионообменниками; Для анализа объектов окружающей среды наиболее широко используют ВЭЖХ в адсорбционном и ионообменном вариантах. [19]

1.5. Интенсификация химических процессов воздействием микроволнового излучения и ультразвука.

Существует несколько традиционных методов экстракции для получения эфирного масла, такого как прессование, отжиг и дистилляция. Однако, согласно литературным данным, эти методы не могут привести к удовлетворительному качеству конечного продукта. Некоторые летучие соединения могут быть потеряны во время процесса прессования. Отсутствие эффективности экстракционного процесса. И для дистилляции, хотя может быть достигнута относительно более высокая эффективность экстракции, деградация ненасыщенных соединений может произойти из-за тепловых эффектов. Поэтому, с целью получения более высокой эффективности извлечения и снижения деградации продукта, исследователи разработали различные новые методы, среди которых наиболее удобна одновременная экстракция дистилляцией (SDE). Разработанный в 1960-х годах, SDE сочетал преимущества паровой дистилляции и экстракции растворителем. Во время процесса вода и аналит нагревают до образования пара, содержащего газообразные летучие соединения. И органический растворитель также нагревается до газообразного состояния, так что он может взаимодействовать с газообразными летучими соединениями и захватывать их. После

конденсации жидкая вода и растворитель снова разделяются, а летучие соединения в основном содержатся в фазе растворителя. В частности, это весьма полезно, когда анализит содержит низкое содержание летучих соединений, которые трудно сконцентрировать. Следовательно, он стал ключевой технологией анализа летучих соединений в стеблях и, сушеной ветчине, сыре, чае, *Zygodphyllum album L.*, соке желтых персиков, семенах фенхеля и листьях тимьяна, хлорорганических пестицидах в почве и масляных матрицах, жирных спиртах и полициклических мускусах в отложениях. Однако для применения этого метода требуется выбор или дизайн специального оборудования. С другой стороны, поскольку повышенный интерес дизайну и разработке новых зеленых процессов для извлечения природных соединений из биопродуктов, для повышения эффективности экстракции использовались вспомогательные методы, такие как ультразвуковое и микроволновое облучение. В последнее время большое внимание уделяется применению микроволнового диэлектрического нагрева в различных процессах в химической и пищевой промышленности с целью замены обычных методов извлечения.

Микроволна - это бесконтактный источник тепла, который может не только сделать нагрев более эффективным и селективным, но также способствовать ускорению передачи энергии и реакции на управление нагревом и снижению теплового градиента. Процесс основан на теплоте, генерируемой ионной проводимостью и / или дипольном вращении, и его эффективность зависит от диэлектрических свойств материала. Микроволновая экстракция теперь признана в качестве эффективного метода, который значительно сокращает время экстракции, увеличивает выход и улучшает качество экстракта. В типичном микроволновом растворе для экстракции растворителем для анализа ткани растения экстракция происходит, когда вода внутри растительной ткани поглощает энергию, возникающую из микроволны, и давление внутри ткани увеличивается, что приводит к разрушению структуры клетки, что позволяет растворителю

проникать в матрицу. Благодаря достижению целей сокращения потребления энергии и повышения эффективности добычи, достижения в области микроволновой экстракции привели к ряду микроволновых комбинированных методов для экстракции, таких как микроволновая паровая дистилляция, диффузия СВЧ-пара, микроволновое гидродистиллирование, экстракция микроволновым экстрактом без растворителя и микроволновая гидродиффузия и гравитация.[20] Активация ультразвуком — один из современных способов ускорения протекания физических и химических процессов. Общеизвестно, что применение ультразвука приводит не только к увеличению скорости химической реакции, но и увеличивает полноту проведения реакции. Производя ультразвуковую кавитационную обработку жидкой среды можно получить химические реакции невозможные в других условиях. Кавитация — образование в жидкости пульсирующих пузырьков (каверн, полостей), заполненных газом, паром или их смесью. Энергия активации многих химических процессов столь велика, что для их успешного проведения требуются высокие температуры, сложные и дорогостоящие каталитические комплексы, повышенная концентрация исходных веществ. В частности процессы получения непредельных углеводородов, такие как пиролиз и дегидрирование требуют больших затрат. Тем не менее существует ряд литературных свидетельств о лабораторных исследованиях и также технологических процессах в которых сходный эффект достигается применением энергии ультразвука. Ультразвуком из сырья растительного происхождения в диапазоне частот 19 кГц - 1 МГц возможно извлекать практически все известные соединения, продуцируемые растениями. Кинетика ультразвуковой экстракции биологически активных веществ зависит от принадлежности к определенной химической группе, а степень извлечения растет в ряду: масла, алкалоиды, фуранохромы, флавоноиды, сапонины, гликозиды.[21] При использовании ультразвука наблюдается не

только значительное ускорение процесса, но и увеличение по сравнению с другими способами экстрагирования выхода продукта .

Преимущества ультразвуковой экстракции по сравнению с другими способами:

минимальное применение ручного труда;

сокращение времени технологических процессов.

Однако недостатком этого метода является то, что ультразвуковое воздействие, используемое для обработки растительного сырья, является очень мощным и достаточно длительным. Проведение процесса в этих условиях вызывает мощный разогрев раствора, и, следовательно, разрушение некоторых классов БАВ .

Можно выделить несколько основных параметров, которые собственно и делают процесс ультразвукового экстрагирования более эффективным по сравнению с традиционными методами экстракции. К числу факторов, способствующих интенсификации, относятся:

увеличение скорости обтекания;

ускорение пропитки твердого тела жидкостью;

увеличение коэффициента внутренней диффузии;

кавитационный эффект, влияющий на структуру пористых тел и приводящий к появлению микротрещин;

Под действием ультразвуковых колебаний происходит более быстрое и активное разрушение внутриклеточных тканей растительного сырья, что приводит к интенсификации процесса экстракции и дает возможность увеличить содержание биологически активных соединений в растворе. [22]

## 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1 Оборудование и объекты исследования

Оборудование:

1. Жидкостный хроматограф со спектрофотометрическим детектором фирмы Agilent Technologies 1220
2. Хроматографический шприц Agilent 1220;
3. Колонка хроматографическая с октадецилсиликагелем (ZORBAX Eclipse C18), 4.6×100мм, произведена в Agilent;
4. Микроволновая печь;
5. Ультразвуковая ванна «Сапфир»;
6. Аналитические весы.

Объекты исследования: лекарственные травы чабреца, душицы, гвоздики, фенхеля и аниса.

### 2.2 Методика выполнения эксперимента

#### 2.2.1 Хроматографический анализ

ВЭЖХ анализ лекарственных трав осуществляли на жидкостном хроматографе Agilent Technologies 1220, оборудованном УФ-спектрофотометрическим детектором. Образцы исследовали при оптимальных условиях: длина волны составляла от 200 – 600 нм, объем вводимой пробы составил 50 мкл. Обработывали данные в программе LC 1220 OpenLAB online.

В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали метанол-буфер в соотношении 7.5: 2.5.

Для приготовления растворов лекарственных трав брали навески (по 3,0000 г) на аналитических весах и дистиллированной воды 100 мл.

Масс-спектрометры были получены на приборе GCMS-QP2010Ultra (ЭИ, 70 эВ) с капиллярной колонкой Rtx-5MS 30м. Режим анализа: температура испарителя 300°C, термостат колонок 50°C 2 минуты нагрев 10°/мин до 300°C, температура переходной линии 250°C, температура источника ионов 200°C. Газ-носитель: гелий скорость 1,5 мл/мин. Диапазон измеряемых масс 50-400Да.

### 3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существует несколько традиционных методов экстракции для получения эфирного масла, такого как прессование, отжиг и дистилляция. Однако, согласно литературным данным, эти методы не могут привести к удовлетворительному качеству конечного продукта. Некоторые летучие соединения могут быть потеряны во время процесса прессования.

До настоящего времени большое значение в этом сохраняет экстракция дистилляцией. Но появляется все больше работ, в которых исследуются процессы интенсификации микроволновым диэлектрическим нагревом и ультразвуковым воздействием.

В нашей работе мы решили проанализировать изменение количества экстрагируемого действующего компонента эфирного масла при приготовлении отваров лекарственных трав в домашних условиях.

Контроль за процессом осуществляли с помощью метода ВЭЖХ.

Жидкостная хроматография имеет большое значение в современном мире, применяется для анализа различных веществ. Высокоэффективная жидкостная хроматография является точным, быстрым, экономичным, и верным методом для анализа лекарственных растительных трав.

В зависимости от природы подвижной и неподвижной фаз различают нормально – фазовую (НФХ) и обращённо – фазовую (ОФ) хроматографию. В НФ (нормально – фазовой) ВЭЖХ неподвижная фаза – полярная (SIL), ПФ – неполярная (гексан, как классический вариант). Что касается обращённо – фазовой, в ней НФ – неполярная ( $C_6$ ,  $C_{16}$ ,  $C_{18}$ ), а полярная ( $H_2O$ ,  $CH_3CN$ ,  $MeOH$ )

Каждый образец лекарственных трав (чабрец, душица, гвоздика, базилик, фенхель и анис) заваривали в 3 колбах по 15 минут в дистиллированной воде. Затем 1 колбу ставили в ультразвуковую ванну на 5, 10 и 15 минут. 2 колбу ставили в микроволновую печь на 5 и 10 минут. 3

колбу просто оставили настаиваться. После каждой операции проводили ВЭЖХ анализ.

Хроматографическое исследование проводили при комнатной температуре. Длительность анализа одной пробы составила 5-10 минут, тем самым это позволило фиксировать изменения.

В таблицах 1-10 приведены сведения с хроматограмм – площади пиков наших образцов в зависимости от времени и выбора метода воздействия.

После воздействия на образцы ультразвуком мы наблюдали плавную кривую роста площади пиков. По сравнению с ультразвуком, воздействие микроволнового излучения оказалось более эффективным – концентрация выделяемых веществ в наших образцах интенсивно стала расти.

Экспериментальные результаты показали, что площадь пиков увеличивается как от воздействия микроволн, так и от ультразвука. Однако микроволновая печь имеет большее воздействие на выявление веществ в наших лекарственных растениях, чем ультразвук.

Хромато-масс-спектрометрически подтвердили, что основным компонентом эфирного масла гвоздики является эвгенол (п-аллил-2-метоксифенол). Содержание его составляет более 80%. В таблице 1 приведены площади хроматографических пиков, характеризующие количество эвгенола.

#### 1. Гвоздика(278 нм)

Таблица 1 - Площадь пиков эвгенола в пробе после воздействия ультразвуком

Пик	Ультразвуковая ванна			Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	15 минут	
Эвгенол	28 315	28 910	32 379	26 258

Таблица 2 - Площадь пиков эвгенола в пробе после воздействия СВЧ

Пик	Микроволновая печь		Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	
Эвгенол	32 769	33 108	26 258

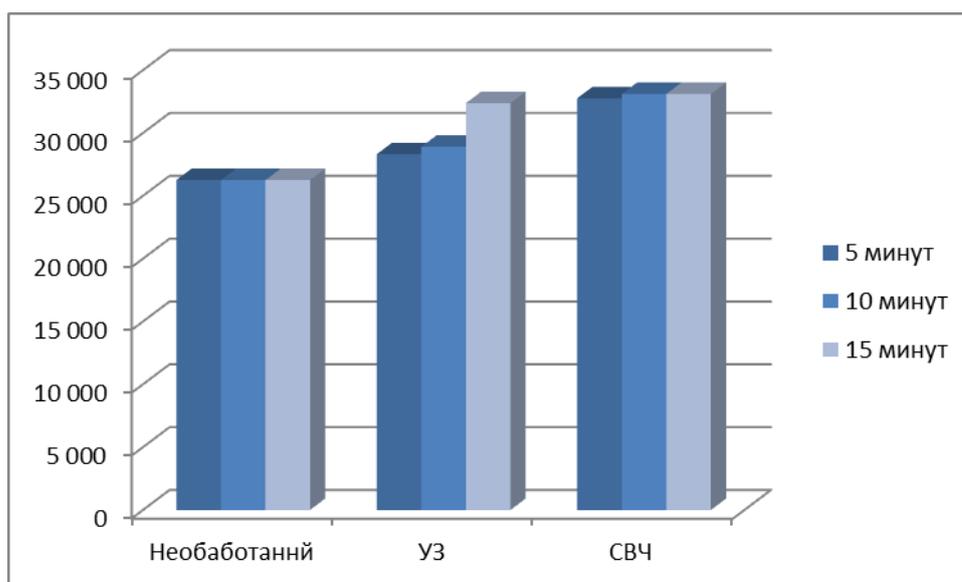


Рисунок 1 – Диаграмма изменения площади пика основного компонента гвоздичного масла от времени воздействия

Основным действующим компонентом душицы, согласно хромато-масс-спектрометрическим данным является карвакрол (2-метил-5-изопропилфенол), он находится в образце с изомерным ему тимолом. По литературным данным [23], при ВЭЖХ оценивается суммарное количество тимола и карвакрола в смеси, но как показывают исследования [23], добавка ТГФ в систему метанол – вода позволяет решить эту задачу, и определить пики этих веществ отдельно. Количественные характеристики показывают, что при воздействии ультразвука на раствор душицы концентрация компонентов растет незначительно, а при воздействии микроволнового излучения наблюдается разрушение действующего компонента.

## 2. Душица (278 нм)

Таблица 3 - Площадь пиков карвакрола в пробе после воздействия ультразвуком

Пик	Ультразвуковая ванна			Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	15 минут	
Карвакрол	49 286	51 706	53 963	49 512

Таблица 4 - Площадь пиков карвакрола в пробе после воздействия СВЧ излучения.

Пик	Микроволновая печь		Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	
Карвакрол	59 706	61 788	49 512

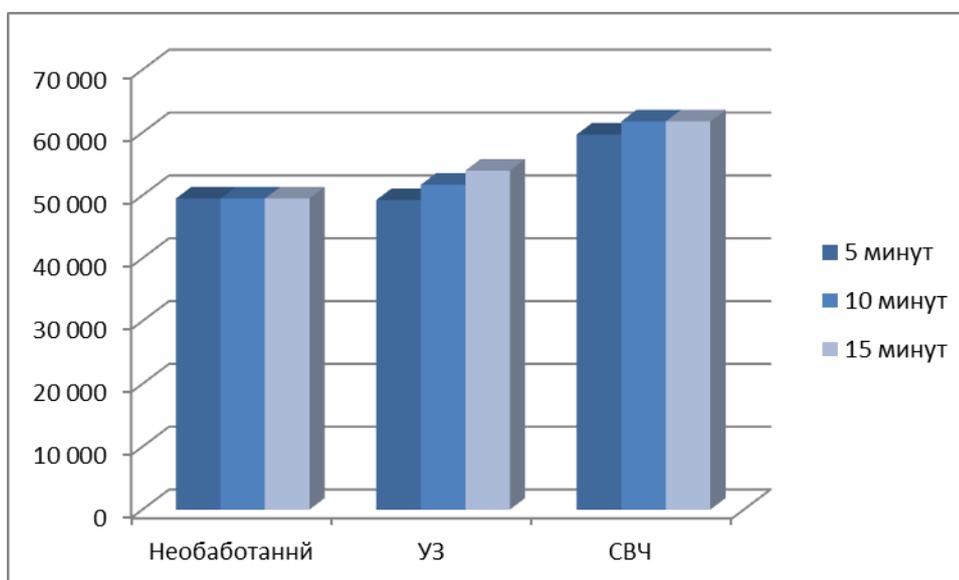


Рисунок 2 - Диаграмма изменения площади пика основного компонента душицы от времени воздействия

Хромато-масс-спектрометрия подтвердила наличие в эфирном масле фенхеля анетола и лимонена. В таблицах 5 и 6 приведены количественные результаты интенсификации процессов экстракции.

### 3.Фенхель (278 нм)

Таблица 5 - Площадь пиков анетола в пробе после воздействия ультразвуком

Пик	Ультразвуковая ванна			Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	15 минут	
Анетол	24 795	27 430	28 750	27 360

Таблица 6 - Площадь пиков анетола в пробе после воздействия СВЧ излучением

Пик	Микроволновая печь		Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	
Анетол	29 051	37 209	27 360

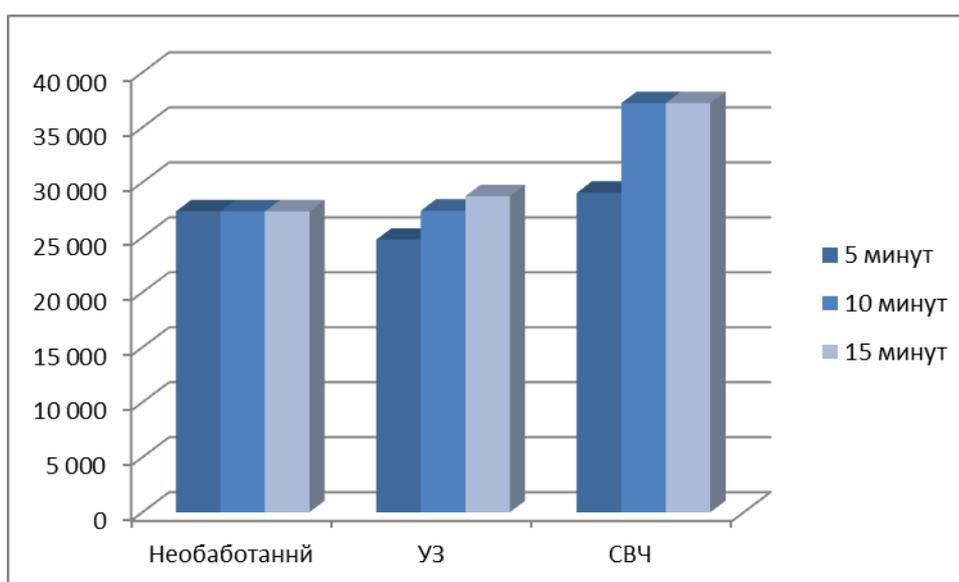


Рисунок 3 - Диаграмма изменения площади пика основного компонента фенхеля от времени воздействия

Основным компонентом аниса является анетол, в составе масла также обнаружен экстрагол. Результаты исследования приведены в таблицах 7 и 8. Как видно, продолжительность воздействия не оказывает сильного влияния, а также и сам процесс интенсификации не намного увеличивает содержание основного вещества по сравнению с обычным завариванием.

#### 4. Анис (278 нм)

Таблица 7 - Площадь пиков анетола в пробе после воздействия ультразвуком

Пик	Ультразвуковая ванна			Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	15 минут	
Анетол	36 778	37 244	37 968	30 192

Таблица 8 - Площадь пиков анетола в анисе после воздействия излучения СВЧ

Пик	Микроволновая печь		Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	
Анетол	36 959	37 870	30 192

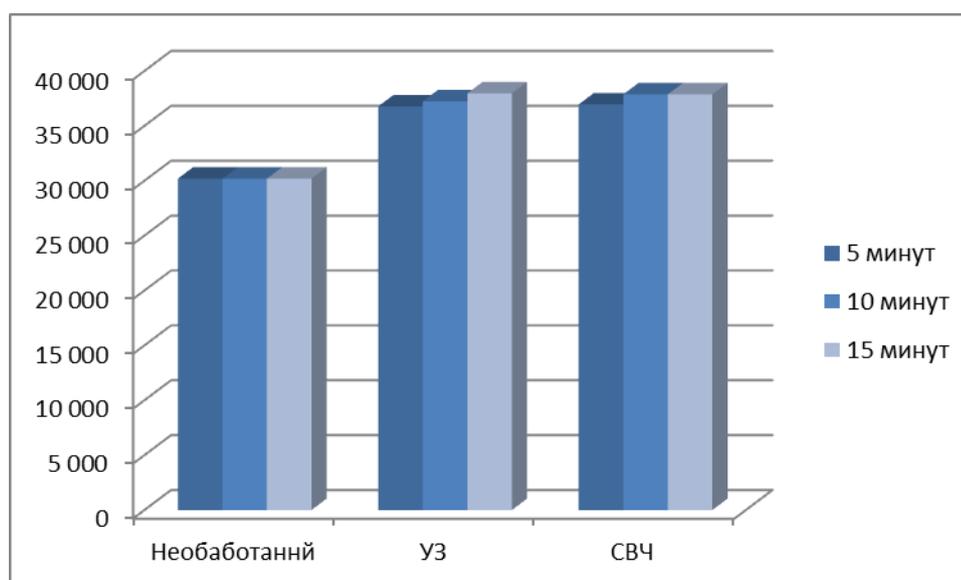


Рисунок 4 - Диаграмма изменения площади пика основного компонента тимол от времени воздействия

Основными компонентами чабреца по данным хромато-масс-спектрометрии являются тимол и карвакрол. В отличие от душицы макрокомпонет здесь тимол. Результаты исследования приведены в таблицах 9 и 10. Как видно, интенсификация ультразвуком приводит не к большому увеличению концентрации действующих веществ, по сравнению с обычным завариванием, не сильно влияет и длительность процесса, а вот воздействие микроволнами значительно способствует экстракции.

#### 5. Чабрец (280 нм)

Таблица 9 - Площадь пиков тимол в чабреце после воздействия ультразвуком

Пик	Ультразвуковая ванна			Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	15 минут	
Тимол	11 220	11 494	12 149	10 860

Таблица 10 - Площадь пиков тимол в чабреце после воздействия СВЧ излучения

Пик	Микроволновая печь		Без воздействия на раствор
	5 минут	10 минут	
Тимол	17 110	27 570	10 860

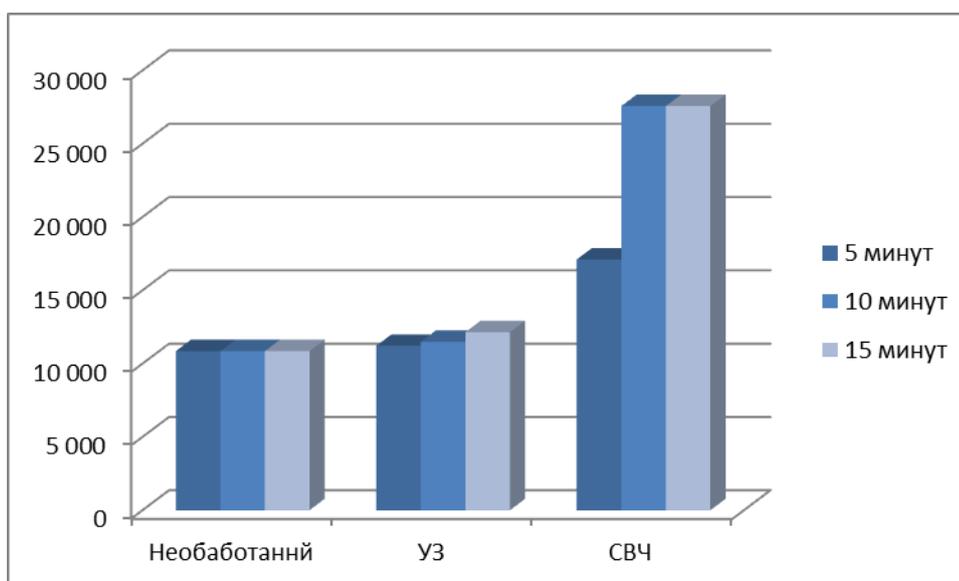


Рисунок 5 - Диаграмма изменения площади пика основного компонента чабреца от времени воздействия

Таблица 11 - Степень извлечение действующего вещества

Раствор	Необработанный	УЗ	СВЧ
Душица	1	1,06	2,54
Чабрец	1	1,08	1,92
Фенхель	1	1,00	1,36
Анис	1	1,23	1,25
Гвоздика	1	1,10	1,26

Таким образом, в работе показаны возможности процессов интенсификации экстракции компонентов эфирных масел из растительного сырья в условиях бытового заваривания лекарственных трав. Максимальный результат достигается при использовании микроволнового излучения. К недостаткам, которого стоит отнести возможность разрушения некоторых компонентов растительного сырья.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведен анализ научной литературы по составу некоторых видов лекарственного сырья и интенсификации процессов его переработки. Рассмотрена история использования эфирносодержащих растений в медицинской практике. Перечислены основные методы интенсификации процессов переработки лекарственного растительного сырья.

Хромато-масс-спектрометрически подтвержден состав действующих компонентов рассмотренных в работе трав (чабрец, фенхель, анис, гвоздика, душица).

Подобраны условия ВЭЖХ для определения основных компонентов эфирных масел рассмотренных в работе трав.

Проведены процессы экстракции и интенсификации экстракции под контролем ВЭЖХ.

Показано, что наиболее эффективным является воздействие СВЧ-излучения. У таких трав, как чабрец и фенхель отмечается незначительное воздействие процессов интенсификации на извлечение действующих веществ. А в случае чабреца наблюдается и разрушение компонента под воздействием микроволнового излучения.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономарева, Е. И., Молохова Е. И., Холов А. К. Применение эфирных масел в фармации / Е. И. Пономарева, Е. И. Молохова, А. К. Холов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С. 567.
2. Бубенчикова В.Н. Исследование эфирного масла тимьяна двуликого. Фармация / Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. – 2015. – № 6. – 7-9 с.
3. Васильченко Н. И. Биология и экология произрастания рода шалфей (*Salvia*) в Акмолинской области республики Казахстан. Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I межд. научн. конф. (21-22 мая 2013 г., г. Новосибирск). / Васильченко Н.И., Бецыв А.В. – Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013. – С. 27-29.
4. Бобкова Н.В. Фармакогностическое изучение комплексных растительных препаратов с использованием микроскопического метода. Сеченовский вестник / Бобкова Н.В., Ермакова В.А., Самылина И.А. – 2014. – №1. – С. 107-108.
5. Макарова А.С. Совершенствование методов стандартизации и разработка антимикробных препаратов эвкалипта прутовидного, шалфея лекарственного и зверобоя продырявленного.: диссертация кандидата фармацевтических наук: 14.04.02 / Макарова А.С. - Казань, 2015. – С. 181.
6. Земская Ю.К. Элементы технологии выращивания чабера огородного и лофанта анисового в Нижнем Поволжье. Овощи России. / Земская Ю.К., Лялина Е.В., Суминова Н.Б. – 2012. – № 1(14). – С. 41-43.
7. Еркин М.А., Фадеева Е.П. Аптека под ногами. Юный ученый. – 2016. – №2. – С. 67.
8. Бобкова, Н. В. Морфолого-анатомическое изучение нового успокоительного сбора. Фармация / Морохина С.Л., Бобкова Н.В., Сорокина А.А., Ермакова В.А. – 2012. – №3. – С. 21-24.

9. Бубенчикова В.Н. Противовоспалительная активность травы тимьяна Пал ласа (*Thymus Pallasianus* Н. Braun). Кубанский научный медицинский вестник. / Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. – 2015. – №5. – С. 25-28.
10. Нгуен Тхи Ньы Куинь [и др]. Анализ эфирного масла мяты перечной и мяты полевой / Традиционная медицина. –2012. – № 5. – С. 278-281.
11. Кузьменко А.Н. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных сборов методами ионо-эксклюзионной и газожидкостной хроматографии.: дисс. докт. фарм.наук: 14.04.02 / Кузьменко А.Н. – 2012. – С. 315.
12. Михайлова П.Г. Эффективность применения средств на основе природных антисептиков в медицинских учреждениях. Научно-практический журнал «Медицинский вестник МВД». / Михайлова С.Г., Чубятова О.П., Копсцкий И.С. – 2012. – №3. – Т. LVIII. – С. 54-60.
13. Романова, О. Фитотерапия против варикоза, тромбофлебита, мозолей и других заболеваний ног / О. Романова. – М.: Вектор, 2010. – С. 465.
14. Е. В. Жохова и др. Фармакогнозия – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – С. 544.
15. Gogus<sup>1</sup> F., Ozel M.Z., and Lewis A.C. Superheated Water Extraction of Essential Oils of *Origanum micranthum* / Journal of Chromatographic Science. – 2005. – №43.
16. Matei<sup>1</sup> A.O, Gatea<sup>1</sup> F. and Gabriel L. Radu G.L. Analysis of Phenolic Compounds in Some Medicinal Herbs by LC–MS / Journal of Chromatographic Science. – 2015.
17. Singh D. P., Govindarajan<sup>1</sup> R., Khare A., and Ajay K. Rawat S. Optimization of a High-Performance Liquid Chromatography Method for the Separation and Identification of Six Different Classes of Phenolics. Journal of Chromatographic Science / 2007. – №45.
18. Ghaedi<sup>1</sup> M., Roosta M. , Khodadoust S. and Daneshfar A. Application of Optimized Vortex-Assisted Surfactant-Enhanced DLLME for Preconcentration of

Thymol and Carvacrol, and Their Determination by HPLC-UV: Response Surface Methodology / Journal of Chromatographic Science. – 2015.

19. Шаповалова Е.Н., Пирогов А.В. Хроматографические методы анализа. Методическое пособие для специального курса / Ответственный редактор Чл.-корр. РАН, профессор Шпигун О.А. – Москва. – 2007.

20. Guo-Wei Yu, Jing Nie, Zhi-Yu Song, Zu-Guang Li, Maw-Rong Lee and Shen-Peng Wang. Microwave-Assisted Simplified Simultaneous Distillation Coupled with Ionic Liquid Pretreatment for the Analysis of Essential Oil in Schisandra sphenanthera. Microwave-Assisted Simplified Simultaneous Distillation Coupled with Ionic Liquid Pretreatment for the Analysis of Essential Oil in Schisandra sphenanthera / Journal of Chromatographic Science. – 2017.

21. URL: [http://studbooks.net/2297395/matematika\\_himiya\\_fizika/intensifikatsiya\\_ekstraktsionnyh\\_protseessov\\_deystviem\\_ultrazvuka](http://studbooks.net/2297395/matematika_himiya_fizika/intensifikatsiya_ekstraktsionnyh_protseessov_deystviem_ultrazvuka)

22. Фролов В.В., Мозговой И.В. Ультразвуковая интенсификация химических процессов в потоке / Технические науки - от теории к практике: сб. ст. по матер. XXIV междунар. науч.-практ. конф. – Новосибирск: СибАК, 2013.