

## ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ СУХОГО ОЧИЩЕННОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ СТЕВИИ

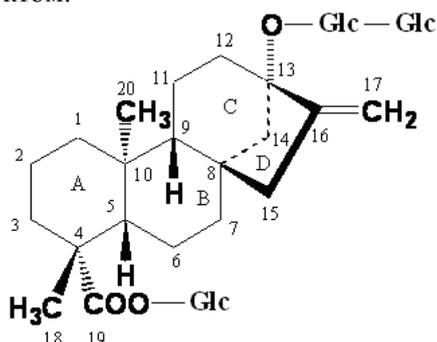
С.А. Кедик, Е.И. Ярцев, И.Е. Станишевская, С.В. Федоров

**П**редложен усовершенствованный метод получения сухого очищенного экстракта из листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni с высоким содержанием стевиозида. Исследованы физико-химические свойства сухого очищенного экстракта стевии.

### Введение

Стевия (*Stevia rebaudiana* Bertoni) – многолетнее травянистое растение из семейства астровых – *Asteraceae* (*Compositae*), произрастающее в Южной Америке (Парагвай, Гвиана, Бразилия). Широко культивируется в странах Южной Америки, Японии, Корее, Тайване.

Листья стевии содержат сладкие дитерпеновые гликозиды, основной из них – стевиозид, который в настоящее время является самым сладким природным продуктом:



Содержание стевиозида в высушенных листьях колеблется в пределах 8–15%. Листья стевии в 10-15 раз слаще обычного сахара, экстракт – в 30-40 раз, стевиозид – в 200-300 раз, но в отличие от сахара дитерпеновые гликозиды стевии содержат очень мало калорий и не повышают уровень глюкозы в крови. При употреблении стевиозида не происходит выброса инсулина в организме, что позволяет существенно снизить дозы

инсулина у инсулинозависимых диабетиков. В настоящее время стевиозид считается идеальным заменителем сахара, как для здоровых людей, так и для страдающих диабетом, ожирением, сердечнососудистыми расстройствами и другими нарушениями обмена веществ [1–3].

Экстракты стевии, известные на мировом рынке под названиями «Steviosin», «Stevix» и «Marumillon 50», широко применяются в пищевой промышленности. Особенно ценно их использование в производстве диетических продуктов, где не требуется высокая калорийность [3–7]. На основании фармакологических исследований сухой экстракт стевии предложен в качестве иммуностимулирующего, антиоксидантного, противовоспалительного, антисклеротического и антидиабетического средства [2, 7].

Задача настоящей работы состояла в усовершенствовании метода получения сухого очищенного экстракта стевии.

### Обсуждение результатов

Сухой очищенный экстракт из листьев стевии получали по схеме, представленной на рис. 1 (методика приведена в «Эксперимент. части»).

Выход в расчете на сырьё составил 87%. Всего было получено 5 лабораторных серий сухого очищенного экстракта общим количеством 10.9 г из 250 г растительного сырья (табл. 1).

Таблица 1. Результаты выделения суммарной фракции дитерпеновых гликозидов из листьев стевии.

Повторность	Вес сырья, г	Потеря в массе при высушивании, %	Масса сухого очищенного экстракта, г	Температура плавления, °С	$[\alpha]_D^{20}$	Содержание стевиозида в суммарной фракции дитерпеновых гликозидов (ВЭЖХ), %
1	50	5.7	2.5	201-202	-31.9°	68.2
2	50	6.1	2.1	203-204	-33.2°	67.3
3	50	5.3	1.5	199-201	-32.5°	71.3
4	50	6.5	2.9	202-204	-31.9°	65.6
5	50	4.9	1.9	200-201	-33.9°	71.8
<b>Среднее</b>		<b>5.7±0.28</b>	<b>2.18±0.24</b>			<b>68.84±1.19</b>
<b>Всего</b>	<b>250</b>		<b>10.9</b>	199-204		

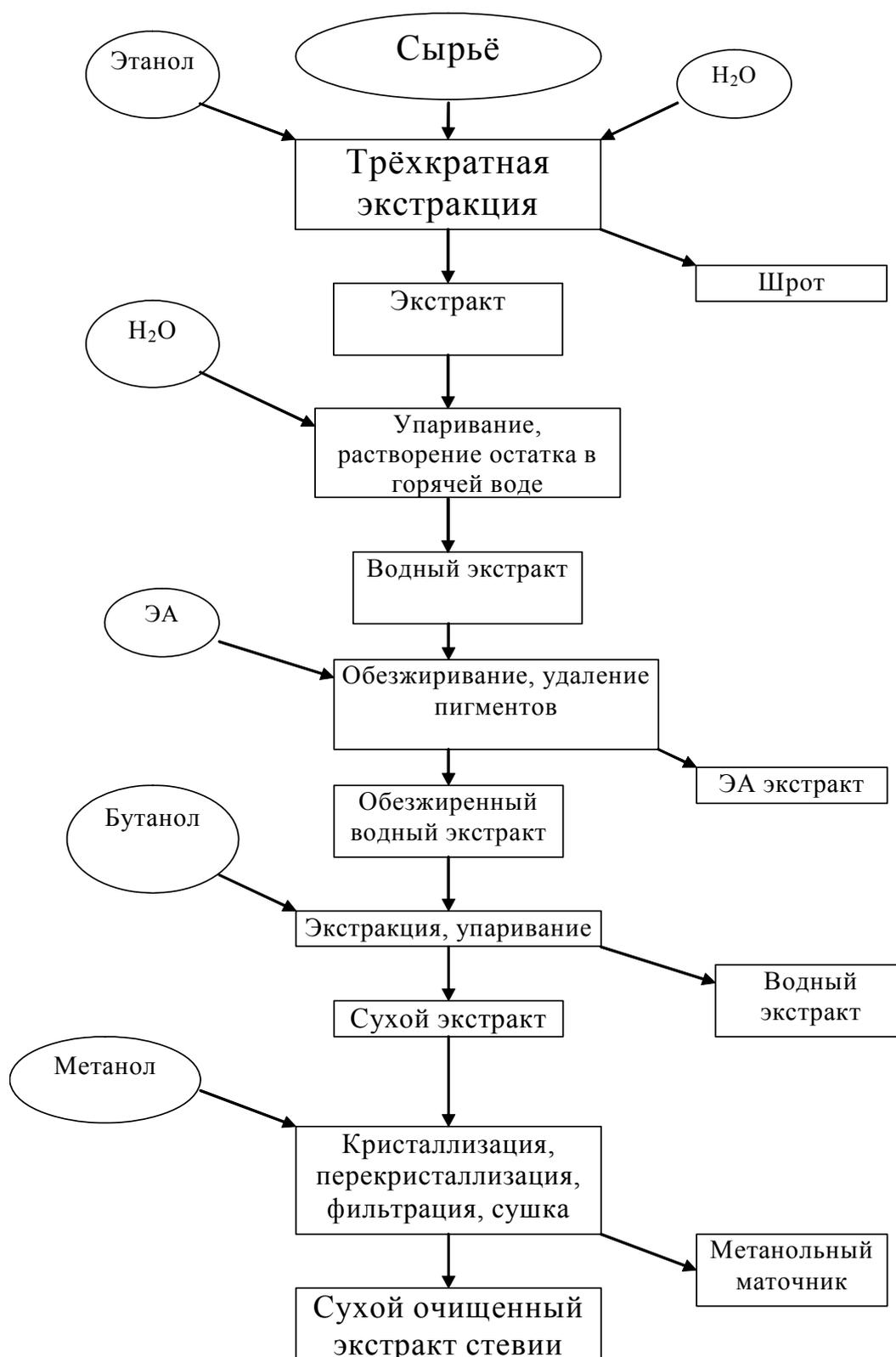


Рис.1. Схема получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии. (ЭА – этилацетат)

Основными достоинствами применённой оптимизированной схемы выделения является исключение токсичного метанола или дорогостоящего хлороформа, классически используемых на стадии первичной экстракции, а также существенное снижение объёмов органических растворителей, используемых на последующих стадиях выделения, по сравнению со стандартными промышленными процессами.

Методом ВЭЖХ было установлено, что содержание стевиозида в сухом очищенном экстракте составляет 66–72%. На хроматограмме (рис. 2) помимо пика стевиозида присутствуют ещё два пика, соответствующих соединениям, принадлежащим к классу дитерпеновых гликозидов, предположительно ребаудиозидам А и С, которым свойственно более сильное удерживание на данном сорбенте [8].

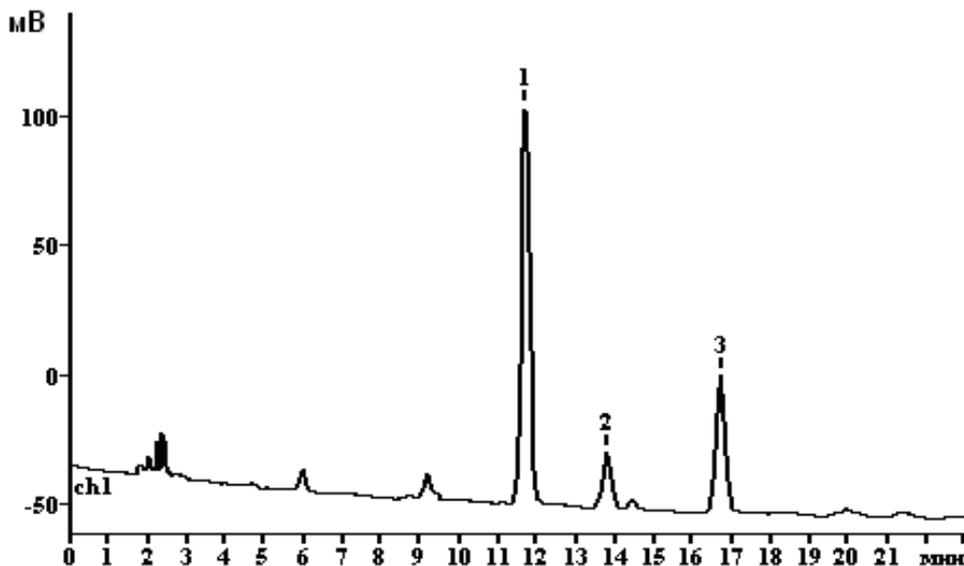


Рис. 2. Хроматограмма сухого очищенного экстракта, выделенного из листьев стевии. 1 – стевиозид, 2 и 3 – примеси дитерпеновых гликозидов.

Подлинность стевиозида была установлена методом  $^{13}\text{C}$ -ЯМР. УФ-спектр 0.01% раствора суммы дитерпеновых гликозидов в метаноле обладал ярко выраженным максимумом при 206 нм и плечом при 224–240 нм, что соответствует литературным данным по поглощению дитерпеновых гликозидов [9–12]. Снятый в таблетках КВг ИК-спектр содержал полосы поглощения при 3390, 2930, 1730, 1620, 1080  $\text{см}^{-1}$ , хорошо согласующиеся с литературными данными. Также были получены следующие общие числовые показатели: удельное вращение 5% раствора в воде  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  составило  $-32 \div -34^\circ$ , а температура плавления 199–204°C.

Препаративное выделение стевиозида из сухого очищенного экстракта проводили методом ТСХ (см. «Эксперимент. часть»). Из 0.5 г высушенного до постоянной массы сухого очищенного экстракта из листьев стевии было получено 7.5 мг стевиозида чистотой 85%. Снятый в таблетках КВг ИК-спектр (рис. 3) содержал полосы поглощения при 3390, 2930, 1730, 1080  $\text{см}^{-1}$ , хорошо согласующиеся с литературными данными [10, 11].

Таким образом, оптимизированы условия лабораторного выделения сухого очищенного экстракта из листьев *Stevia rebaudiana* Bertoni (Mediplantex, Вьетнам) с содержанием стевиозида 66–72%. Исследованы физико-химические свойства сухого очищенного экстракта стевии и индивидуального стевиозида (УФ-, ИК-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектры, удельное вращение), а также общие числовые показатели: температура плавления и потеря в массе при высушивании. Полученные данные могут быть использованы для стандартизации и контроля качества продукции, содержащей сладкие дитерпеновые гликозиды *Stevia rebaudiana* Bertoni.

#### Экспериментальная часть

В настоящей работе использовались следующие реактивы: этанол-ректификат, этилацетат х.ч. (Реахим), бутанол х.ч., серная кислота о.с.ч. (Лекбиофарм), хлороформ х.ч. (Химмед), метанол (Merck, Германия).

Спектры поглощения в УФ-области регистрировали на спектрофотометре модели HP 8452 A (США), ИК-спектры – на приборе Pharmalyzer Digilab FTS 2000 (США) в таблетках КВг и в вазелиновом масле.



Рис. 3. ИК-спектр выделенного индивидуального стевииозид.

Спектры  $^{13}\text{C}$ -ЯМР записывались в дейтерированном пиридине ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) с концентрацией раствора 0.1 г/мл на спектрометре ЯМР «Bruker WP 200» с рабочей частотой на ядрах  $^1\text{H}$  200 МГц. Регистрация спектра проведена в режиме широкополосного подавления спин-спинового взаимодействия с протонами (MOD=1) с помощью автоматической импульсной последовательности WALTZ-16. Для регистрации спектра использованы следующие параметры накопления: частота на ядре  $^{13}\text{C}$  – 50.33 МГц; длительность импульса – 4.1 мкс (45°C); время накопления – 0.82 с; ширина спектрального диапазона – 10000 Гц (200 м.д.); количество накоплений – 10000; температура – 303 К.

Препаративное выделение из сухого очищенного экстракта осуществляли методом ТСХ на пластинах «Fertigplatten Kieselgel 60» (Merck, Германия). В качестве стандарта использовали рабочий стандартный образец стевииозид 95% чистоты, приобретённый в фирме Mediplantex (Ханой, Вьетнам). ТСХ проводили в системе растворителей: хлороформ – метанол – вода (10 : 5 : 1).

Количественное определение стевииозид осуществляли методом ВЭЖХ со спектрофотометрическим детектированием на колонке Luna  $\text{NH}_2$  5  $\mu$  (250 x 4.6 мм) (Phenomenex, США), с установленной в линию предколонкой Security Guard Cartridge  $\text{NH}_2$  (4 x 3 мм) (Phenomenex, США) в универсальном держателе предколонок. Подвижная фаза: деионизированная вода, pH 5.5. ВЭЖХ выполнялась на chromatographic system «Стайер» (ЗАО «НПКФ Аквилон», Россия) состоящей из двух насосов Марафон серии II, динамического смесителя, инжектора Rheodyne 7725i с объёмом петли 10 мкл и

спектрофотометрического детектора с фиксированной длиной волны детектирования UVV-104. Управление, сбор и обработка хроматографической информации осуществлялись с помощью программно-аппаратного комплекса «Мультихром 2.0» («Амперсэнд», Россия). Для обеспечения постоянной температуры разделительной колонки использовался термостат колонок ThermaSphere (Phenomenex, США). Подготовку образца перед вводом в chromatographic system осуществляли на установке для твердофазной экстракции «Vacuum Manifold» (Phenomenex, США).

Концентрирование извлечений, отгонку растворителей проводили с помощью ротационного испарителя «ИР-1М2» (Клин, Россия). Для определения общих числовых показателей использовали: поляриметр «Polomat A» (Германия), прибор для определения температуры плавления (Клин, Россия).

В качестве сырья использовались листья стевии, с содержанием стевииозид 4.04 %, приобретённые у фирмы Mediplantex (Ханой, Вьетнам).

#### Методика получения сухого очищенного экстракта из листьев стевии

Навеску (50 г) измельченного, высушенного до постоянной массы сырья помещали в колбу и приливали 300 мл 80% этилового спирта. Экстрагирование проводили в три приема по одному часу при 20°C с перемешиванием. Объединённые спиртовые экстракты упаривали досуха, а сухой остаток растворяли в 500 мл воды при 80°C. Водный раствор экстрагировали в три приёма 300 мл этилацетата по 10 мин. Слои этилацетата отделяли, объединяли и отбрасывали. Водный слой экстрагировали трёхкратно 100 мл бутанола. Объединённые бутанольные слои

упаривали досуха, сухой остаток растворяли в минимальном объёме метанола при 80°C и оставляли на 12 час. при 5°C. Образовавшийся осадок отфильтровывали, высушивали до постоянного веса в вакуумном шкафу и подвергали перекристаллизации из метанола. Образовавшийся осадок, содержащий суммарную фракцию дитерпеновых гликозидов, отфильтровывали и сушили до постоянного веса в вакуумном шкафу. Выход: 2.18 г ± 0.24 г сухого очищенного экстракта, содержащего в среднем 68.8% стевиозида. Выход в расчет на сырьё 87%.

#### Препаративное выделение стевиозида из сухого очищенного экстракта методом ТСХ

0.5 г высушенного до постоянной массы сухого очищенного экстракта из листьев стевии растворяли в 6 мл смеси метанол – вода, 5 : 1. На стартовую линию пластинки для ТСХ размером 20 x 20 см с толщиной слоя сорбента 0.25 мм микропипеткой наносили 0.2 мл раствора полосой в 10 см. Рядом наносили пятно 1% раствора стевиозида-стандарта в метаноле. Пластинку высушивали на воздухе в течение 10 мин и хроматографировали восходящим способом в камере с системой

растворителей: хлороформ – метанол – вода, 10 : 5 : 1. После того как фронт растворителей проходил около 15 см, пластинку вынимали из камеры и высушивали на воздухе в течение 30 мин., затем часть пластинки с нанесённым раствором стевиозида-стандарта опрыскивали 50% раствором серной кислоты. После выдерживания пластинки в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 15 мин. на хроматограмме идентифицировали пятно чёрного цвета с  $R_f$  0.37, соответствующее стевиозиду. Слой сорбента, находящийся рядом с пятном с  $R_f$  0.37 и соответствующий стевиозиду в растворе сухого очищенного экстракта, соскребали, растворяли в 4 мл воды, фильтровали через бумажный фильтр и упаривали досуха. Выход: 7.5 мг стевиозида чистотой 85.2% (данные ВЭЖХ). Т. пл. 198.5–199.5 °C;  $[\alpha]_D^{20}$  – 31.5° (5%, H<sub>2</sub>O); УФ-спектр (метанол,  $\lambda_{\text{макс}}$  (ε)): 206 нм (59.1); ИК-спектр ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3390, 2930, 1730, 1080 (KBr); <sup>13</sup>C-ЯМР-спектр (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, δ, м.д.): 177.0, 154.2, 106.5, 104.4, 97.7, 95.6, 85.8, 84.3, 79.0, 79.0, 77.9, 73.8, 70.8, 62.5, 61.9, 57.2, 53.8, 47.5, 44.3, 42.4, 43.8, 41.5, 40.6, 39.7, 38.2, 36.5, 28.2, 22.0, 20.4, 19.2, 15.4. Потеря в массе при высушивании: 5.1%.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Муравьева, Д. А. Тропические и субтропические лекарственные растения / Д. А. Муравьева. – М. : Медицина, 1997. – 383 с.
2. Разработка эффективного способа выделения суммы дитерпеновых гликозидов из *Stevia rebaudiana* Bertoni / И. Ю. Ситничук, Е. Н. Стрижева, А. А. Ефремов, Г. Г. Первышина // Химия раст. сырья. – 2002. – № 3. – С.73–75.
3. Chang, S. S. Stability studies of stevioside and rebaudioside A in carbonated beverages / S. S. Chang, J. M. Cook // J. Agricult. & Food Chem. – 1983. – № 31. – P. 409–412.
4. Kroyer, G. Th. The low calorie sweetener stevioside: stability and interaction with food ingredients / G. Th. Kroyer // Lebensm. Wiss. Technol. – 1999. – № 32. – P. 509–512.
5. Мику, В. Е. Стевия – перспективная культура для производства низкокалорийных и диабетических продуктов / В. Е. Мику, Л. П. Кисничан, С. М. Багдасаров // Пищ. пром-сть. – 1999. – № 10. – С. 32.
6. Подпоринова, Г. К. Подсластители и сахарозаменители: технология получения стевиолгликозидов / Г. К. Подпоринова, Н. Д. Верзилина, К. К. Полянский. – Воронеж, ФГОУ ВПО ВГАУ, 2006. – 156 с.
7. Выбор состава и разработка технологии таблеток сухого экстракта стевии / Ф. Т. Холтоев, Н. С. Файзуллаева, М. У. Усуббаев, Х. М. Хакимов // Хим.-фарм. журнал. – 2003. – Т. 37, № 6. – С.42–45.
8. Макапугай, Н. С. Improved high-performance liquid chromatographic separation of the *Stevia rebaudiana* sweet diterpene glycosides using linear gradient elution / Н. С. Макапугай, N. P. D. Nanayakkara, A. D. Kinghorn // J. Chromatogr. – 1984. – № 283. – P. 390–395.
9. Mauri, P. Analysis of Stevia glycosides by capillary electrophoresis // P. Mauri, G. Catalano, C. Gardana // Electrophoresis. – 1996. – № 2. – P. 367–371.
10. Mosettig, E. Stevioside. II. The structure of the aglucon / E. Mosettig, W. R. Nes // J. Org. Chem. – 1955. – № 20. – P. 884–899.
11. Wood, H. Stevioside. I. The structure of the glucose moieties // H. Wood, R. Allerton, W. Diehl // J. Org. Chem. – 1955. – № 20. – P. 875–883.
12. Контроль содержания стевиозида в растительном сырье методом ВЭЖХ и ТСХ / С. А. Кедик, С. В. Федоров, Н. А. Януль, Л. В. Прохорова, Е. В. Смирнова, А. В. Панов // Хим.-фарм. журнал. – 2003. – Т. 37, № 10. – С. 19–22.