
УДК 542.06.542.61.542.46.808.542.97.542.93

ЭКСТРАКЦИЯ АНТИОКСИДАНТОВ РУТИНА И КВЕРЦЕТИНА ИЗ БУТОНОВ СОФОРЫ ЯПОНСКОЙ (*SOPHORA JAPONICA* L.) В СРЕДЕ СУБКРИТИЧЕСКОЙ ВОДЫ

**Е. В. Ветрова, Е. В. Максименко, С. Н. Борисенко, А. В. Лекарь,
Н. И. Борисенко*, В. И. Минкин**

*Научно-исследовательский институт физической и органической химии Южного
федерального университета, Ростов-на-Дону, Россия*

*boni@i.poc.rsu.ru

Поступила в редакцию 14. 06.2016 г.

Предложен метод экологически чистой экстракции растительных антиоксидантов рутина и кверцетина из бутонов софоры японской без использования дорогостоящих органических растворителей в среде субкритической воды в статическом режиме. Содержание целевых веществ в полученных экстрактах определено методом высокоеффективной жидкостной хроматографии. Продемонстрирована эффективность предложенного метода: сопоставимые с традиционным методом результаты могут быть получены при 10-кратном уменьшении времени экстракции.
Ключевые слова: субкритическая вода, экстракция, антиоксидант, рутин, кверцетин, софора японская (*Sophora japonica* L.).

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время лавинообразно растет число работ, нацеленных на изучение вторичных растительных метаболитов — широкого спектра соединений природного происхождения, которые продуцируются высшими растениями как защитная реакция на неблагоприятные факторы внешней среды (загрязнение, колебания температуры, воздействие патогенных микроорганизмов и пр.) и традиционно используются в медицине различных народов мира. Одним из наиболее часто используемых в народной медицине классов вторичных метаболитов является семейство биофлавоноидов, включающее рутин (витамин Р), кверцетин, кемпферол (см. рис. 1) и др. [1]. Благодаря широкому спектру биологической активности эти соединения представляют интерес и как субстанции для получения новых фармацевтических препаратов, и как нутрицевтики (биологически активные пищевые добавки). Благодаря химической структуре флавоноиды проявляют себя как мощные антиоксиданты. Известно, что окислительный стресс, обусловленный появлением активных форм кислорода, прямым или косвенным образом приводит к повреждению нуклеиновых кислот, белков и липидов и участвует в активации процессов канцерогенеза, нейродегенерации, атеросклероза, диабета и старения [2]. По этой причине регулирование окислительно-восстановительного статуса природными соединениями [3] остается на сегодняшний день одним из перспективных подходов к терапии и профилактике таких процессов. Этим обусловлена актуальность разработки методов экстракции и химической модификации флавоноидов растительного происхождения.

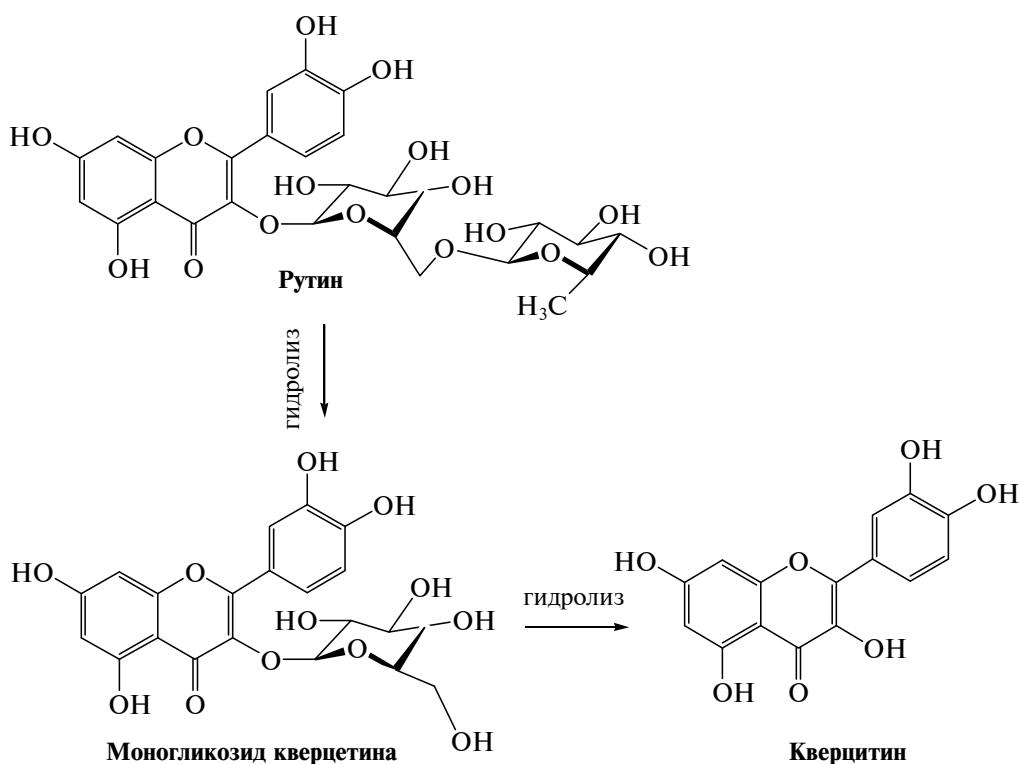


Рис. 1. Схема взаимных превращений рутина, кверцетина и его моногликозида

В настоящее время в качестве исходного растительного материала для получения флавоноидов (в частности, рутина) часто используется софора японская (*Sophora japonica* L.) из семейства бобовых, которая широко распространена в Азии и в культуре выращивается в южных регионах России. Листья, цветы и цветочные бутоны софоры японской используются в традиционной китайской медицине, поскольку содержат широкий спектр биологически активных соединений: флавоноевые гликозиды, изофлавоны, кумаронохромоны, сапонины, тритерпеновые гликозиды, фосфолипиды, алкалоиды, аминокислоты, полисахариды и жирные кислоты [4].

Извлечения из листьев и цветов софоры проявляют антиоксидантные, цитотоксические и противодиабетические свойства благодаря присутствию в них суммы полифенольных соединений. Так, исследования фракций, полученных хроматографическим разделением метанольного экстракта листьев софоры, показали высокую антиоксидантную активность, сопровождающуюся некоторыми цитотоксическими и противодиабетическими свойствами [5].

Основным флавоноидом, присутствующим в бутонах софоры, является рутин, содержание которого в зависимости от условий и места произрастания может составлять до 25 % [6]. Показано, что именно рутин из софоры устраниет повышенную ломкость и проницаемость кровеносных сосудов, в том числе капиллярных сосудов мозга, восстанавливает их эластичность, очищает и укрепляет стенки сосудов, положительно влияет на липидный обмен при атеросклерозе [7].

Для извлечения флавоноидов из растительной матрицы и, в частности, бутонов софоры разработаны различные методы. Как правило, традиционная экстракция проводится с использованием различных органических растворителей. Наиболее

Экстракция антиоксидантов рутина и кверцетина из бутонов софоры японской (*Sophora japonica* L.) в среде субкритической воды

распространенной методикой является извлечение 70–95 %-ным этанолом от 20 минут до 4 часов [8] с выходом рутина от 0,2 до 18 %. Широко распространено также извлечение метанолом, например, кипячением с обратным холодильником [9], настаиванием в течение 48 часов [10], настаиванием в течение 18 часов с предварительным встряхиванием в течение 6 часов [11], а также экстракцией с применением ультразвука [12]. При этом выход рутина в метанольных экстрактах выше (15–18 %), чем в этанольных.

В качестве альтернативы применению дорогостоящих и зачастую токсичных органических растворителей представляется переход к использованию среды суб- и сверхкритических флюидов. Описан способ экстракции цветов софоры сверхкритическим CO_2 с добавлением этанола в качестве сорасторителя с выходом 6,4 % [13]. Интенсивно развивается подход, состоящий в использовании для экстракции биофлавоноидов субкритической воды [14]. В последние годы субкритическая вода (СБВ) используется в качестве дешевого, экологически чистого растворителя для экстракции, химического синтеза и переработки различных видов органического сырья, как, например, растительного материала или отходов сельскохозяйственного производства [15, 16]. Гидротермальные процессы привлекают к себе все возрастающее внимание благодаря уникальным физико-химическим свойствам воды вблизи критической точки. В этих условиях вода характеризуется гораздо более низкой диэлектрической проницаемостью и значительно большей константой ионизации. Вблизи критической точки (начиная с 220–270 °C) константа диссоциации становится на 3 порядка выше, чем для более низких температур [14]. Благодаря высокой концентрации ионов H_3O^+ и OH^- в обсуждаемом интервале температур вода может выступать, с одной стороны, как слабополярный растворитель, а с другой — как кислотно-основный катализатор некоторых органических реакций.

Целью данной работы явилась разработка экологически чистой методики извлечения рутина и кверцетина из бутонов софоры японской в среде субкритической воды и ее оптимизация.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В качестве объекта исследования в работе использованы цветочные бутоны софоры японской (ООО «Азбука трав» г. Барнаул).

Традиционная экстракция бутонов софоры проводилась трехкратным кипячением в этиловом спирте с предварительным кипячением в гексане в следующем порядке: 2 г сырья были обезжирены кипячением в 30 мл гексана в течение 150 минут; основная экстракция проводилась в 30 мл 80 %-го этанола в колбе с обратным холодильником в течение 150 минут. После охлаждения экстракт фильтровали и анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Этанольные вытяжки объединяли, высушивали при комнатной температуре под вентилятором, готовили растворы в 80 % EtOH концентрацией 1 мг/мл и анализировали вновь методом ВЭЖХ. Экстракция в среде субкритической воды выполнена по методике, аналогичной описанной ранее в работе по извлечению полифенолов [15].

Процедура извлечения биофлавоноидов в среде субкритической воды состояла в следующем: навеску определенной массы (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 г) сухого среднеизмельченного исходного сырья (диаметр частиц 0,5–1,0 мм) помещали в экстрактор (цилиндрический толстостенный сосуд из нержавеющей стали внутренним объемом 10 мл), в который добавляли 7 мл дистиллированной воды. Экстрак-

тор герметично закрывали и устанавливали в сушильный шкаф с заданной температурой в диапазоне 100—250 °C (точность термостатирования ± 1 °C) на 1 час. Затем экстрактор охлаждали до комнатной температуры в емкости с проточной холодной водой. Содержимое экстрактора фильтровали через складчатый бумажный фильтр. Пробу экстракта очищали фильтрованием под вакуумом для последующего анализа. Изучена зависимость выхода рутина и кверцетина из бутонов софоры японской от температуры, продолжительности экстракции, соотношения сырье : реагент и массы загрузки сырья.

Содержание целевых веществ в пробе определяли методом ВЭЖХ в обращенно-фазовом варианте на жидкостном хроматографе «Agilent 1200 LC» со спектрофотометрическим детектором, работающем в диапазоне длин волн от 195 до 950 нм. Для определения количественного содержания рутина и кверцетина были использованы следующие условия хроматографирования: колонка ZORBAX SB C18 2,1×150 мм, 3,5 мкм; состав подвижной фазы — однопроцентная муравьиная кислота с метанолом в соотношении 65 : 35 по объему; температура колонки 35 °C; скорость потока подвижной фазы 0,14 мл/мин; длина волны УФ-детектора 254, 280, 360 нм; время анализа 50 мин; объем вводимой пробы 1 мкл. Количественное определение рутина и кверцетина проводили по методу абсолютной калибровки по стандартным растворам различной концентрации. В качестве стандарта использовали растворы в метаноле смеси кверцетина (фирмы ДИАЭМ, чистота препарата 98,2 %) и рутина (96,6 % чистоты).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Зависимость выхода рутина и кверцетина от температуры экстракции представлена на рис. 2 совместно с данными, полученными традиционным методом. Как видно из диаграммы на рис. 2, температура 120 °C является оптимальной для

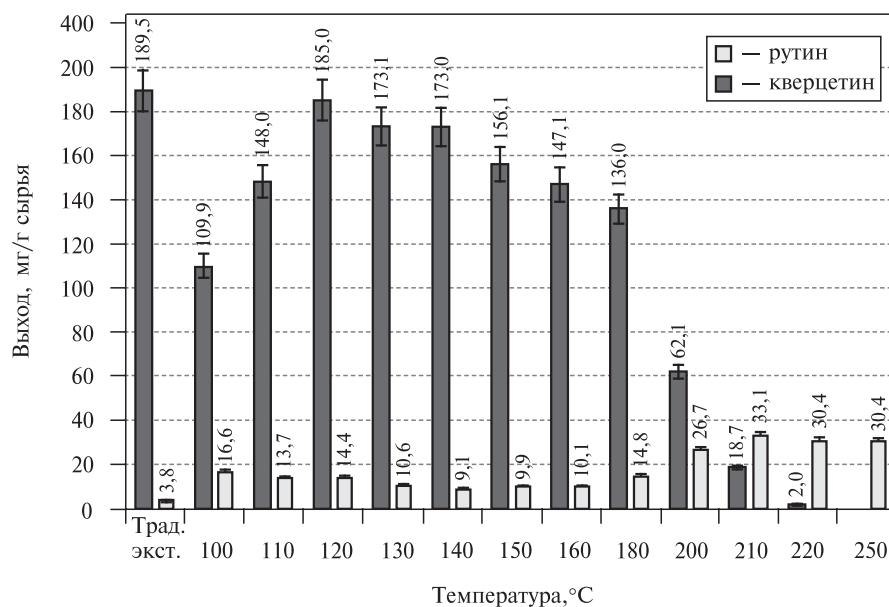


Рис. 2. Зависимость количества извлекаемых флавоноидов от температуры воды

водной экстракции рутина. Более низкая температура оказывается недостаточной для полноценного процесса экстрагирования, а повышение температуры выше 120 °С приводит к изменению состава получаемого экстракта, возможно, за счет частичной деструкции исходного рутина в результате гидролиза.

Изучение зависимости выхода рутина и кверцетина от массы загрузки сырья проводили при выбранной оптимальной температуре 120 °С. Полученные данные приведены на рис. 3. Как видно из полученной зависимости, оптимальной в данном эксперименте является загрузка 0,1 г бутонов софоры.

Изучение зависимости выхода рутина от времени экстракции проводили при 120 °С и загрузке сырья 0,1 г. Соответствующие данные приведены на рис. 4. Как видно из полученной зависимости, увеличение времени экстрагирования до 80 минут приводит к снижению концентрации рутина в смеси и незначительному увеличению концентрации кверцетина. Последнее, возможно, связано с упомянутым ранее гидролизом рутина.

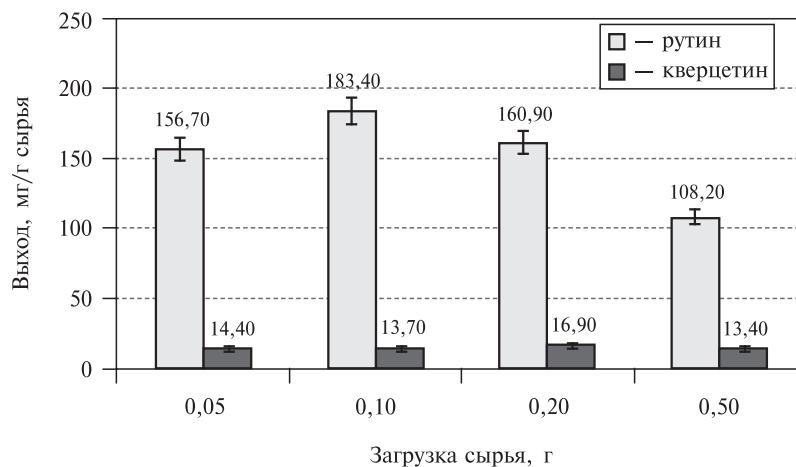


Рис. 3. Зависимость количества извлекаемых флавоноидов от массы загрузки сырья



Рис. 4. Зависимость количества извлекаемых флавоноидов от времени экстракции

Таблица

Сравнение эффективности методик экстракции рутина и кверцетина из бутонов софоры японской

Метод экстракции	Растворитель	Время экстракции, мин	Температура, °C	Количество выделенного вещества, мг/г сырья	
				Рутин	Кверцетин
водная	вода	60	120	183,4	13,7
традиционная	<i>n</i> -гексан, 80 % этанол	600	80	189,5	3,8

Таким образом, оптимальными для водного экстрагирования рутина из бутонов софоры японской являются следующие условия: температура 120 °C, загрузка сырья 0,1 г, время экстрагирования 60 минут. При этом количество экстрактивных веществ составляет 59 % с содержанием рутина до 29 %. Величина относительного стандартного отклонения 5,8 % указывает на хорошую воспроизводимость данного метода извлечения рутина из софоры японской и правомерность его использования для количественного сравнения с другими методами извлечения. Как показывают данные таблицы, указанное количество рутина сопоставимо с извлекаемым по традиционной методике. Однако экстракция водой протекает за более короткое время (в 10 раз) и исключает использование дорогостоящих и токсичных органических растворителей.

Как видно из рис. 2, количество кверцетина в экстрактах, полученных в диапазоне температур от 120 до 160 °C, остается неизменным в пределах ошибки эксперимента. Дальнейшее возрастание температуры приводит к росту концентрации кверцетина. В этом температурном диапазоне наблюдается уменьшение и полное исчезновение хроматографических пиков, соответствующих гликозидам кверцетина — рутина и его моногликозида. Увеличение интенсивности пиков агликонов можно объяснить процессами кислотного гидролиза моно- и дигликозидов в среде субкритической воды (рис. 1), возможность которого может быть обусловлена упомянутым ранее существенным (на 3 порядка) увеличением константы диссоциации воды в области температур 200—270 °C [14]. Это свойство уже отмечалось нами в работах [15, 16] и было использовано при разработке методики синтеза глицирретиновой кислоты [17].

Полученные результаты открывают перспективу разработки технологии селективной экстракции флавоноидов путем управления составом экстракта посредством изменения параметров процесса (температура и время) с целью получения смеси, содержащей гликозиды и агликоны в заданном соотношении и имеющей регулируемую биологическую активность.

В перспективе предлагаемая методика может быть использована для разработки экологически чистой технологии получения из бутонов софоры японской рутина и кверцетина для дизайна новых препаратов с Р-витаминной активностью.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке внутреннего гранта Южного федерального университета (проект № 213.01-2014/005 ВГ) и гранта Президента РФ для государственной поддержки ведущих научных школ НШ-8201.2016.3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pietta P., Gardana C., Pietta A. Flavonoids in Herbs. In: Flavonoids in Health and Disease. New York: Marcel Dekker Inc., 2003. P. 43.
 2. Ray P.D., Huang B.W., Tsuji Y. Cellular Signalling. 2012. Vol. 24. P. 981.
 3. Maté J.M., Segura J.A., Alonso F.J., Márquez J. Archives of Toxicology. 2012. Vol. 86. P. 1649.
 4. He X., Bai Y., Zhao Z., Wang X., Fang J., Huang L., Zeng M., Zhang Q., Zhang Y., Zheng X. J. Ethnopharmacol. 2016. Vol. 187. P. 160.
 5. Abdelhady M.I.S., Kamal A.M., Othman S.M., Mubarak M.S., Ben Hadd T. Med. Chem. Res. 2015. Vol. 24. P. 482.
 6. Bahchevanska S., Koleva I. Biotechnology & Biotechnological Equipment. 1996. Vol. 10. No. 1. P. 56.
 7. Paulickova I. e-Publication, Ireland, ISBN-13: 978-1-905254-53-8. 2010. P. 168. <http://www.ucd.ie/t4cms/ffnet%20funct%20fds%20final%20e-publication%20jan%202011.pdf>
 8. Mihaylova D., Schalow S. Braz. Arch. Biol. Technol. 2013. Vol. 56. P. 431.
 9. Xu J., Zhang H., Cheng G. Talanta. 2007. Vol. 73. P. 932.
 10. Hermans-Lokkerbol A., Ingkaninan K. Naresuan University Journal. 2004. Vol. 12. P. 25.
 11. Великородов А.В., Шевцова И.А., Федорович В.В. Экспериментальная химия. 2010. № 2. С. 164.
 12. Paniwnyk L., Beaufoy E., Lorimer J.P., Mason T.J. Ultrasonics Sonochemistry. 2001. Vol. 8. P. 299.
 13. Yin J., Shi W., Xu Q., Wei W., Wang A. e-Publication. 2008. <http://www.isasf.net/fileadmin/files/Docs/Colmar/Paper/N28.pdf>
 14. Galkin A.A., Lunin V.V. Russ. Chem. Rev. 2005. Vol. 74. No. 1. P. 21.
 15. Lekar A.V., Filonova O.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Russ. Journal of Phys. Chem. B. 2013. Vol. 7. No. 7. P. 1.
 16. Lekar A.V., Borisenko S.N., Vetrova E.V., Filonova O.V., Maksimenko E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Natural Product Communications. 2015. Vol. 10. No. 11. P. 1801.
 17. Lekar A.V., Borisenko S.N., Maksimenko E.V., Vetrova E.V., Borisenko N.I., Minkin V.I. Russ. Journal of Phys. Chem. B. 2015. Vol. 9. No. 8. P. 1153.
-

EXTRACTION OF ANTIOXIDANTS RUTIN AND QUERCETIN FROM THE BUDS OF SOPHORA JAPANESE (*SOPHORA JAPONICA* L.) BY SUBCRITICAL WATER

**E.V. Vetrova, E.V. Maksimenko, S.N. Borisenko, A.V. Lekar,
N.I. Borisenko, V.I. Minkin**

Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

The environmentally friendly method of rutin and quercetin extraction from the flower buds of *Sophora japonica* L. by subcritical water in the static mode is developed. Concentrations of the target compounds in extracts are determined using the HPLC method. The developed method demonstrates a high efficiency compared to the traditional one: similar yields of the target compounds can be obtained for a 10 times shorter time of extraction.

Key words: subcritical water, extraction, antioxidant, rutin, quercetin, *Sophora japonica* L.
