

УДК 625.322

DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3251637>

**ОПТИМАЛЬНІ УМОВИ СЕЛЕКТИВНОЇ ЕКСТРАКЦІЇ
ФЛАВОНОЇДІВ З FLORES SOPHORAE JAPONICAE**

**Протункевич О.О., Присяжнюк К.О., Ракіпов І.М., Марченко С.І.,
Пономарьова Л.А.**

Одеський національний політехнічний університет
o.o.protunkevych@opu.ua

**ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ СЕЛЕКТИВНОЙ ЭКСТРАКЦИИ
ФЛАВОНОИДОВ ИЗ FLORES SOPHORAE JAPONICAE**

**Протункевич О.О., Присяжнюк К.А., Ракипов И.М., Марченко С.И.,
Пономарева Л.А.**

Одесский национальный политехнический университет
o.o.protunkevych@opu.ua

**OPTIMAL CONDITIONS FOR SELECTIVE EXTRACTION OF
FLAVONOIDS FROM FLORES SOPHORAE JAPONICAE**

**Protunkevich O.O., Prisyazhnyuk K.A., Rakipov I.M., Marchenko S.I.,
Ponomareva L.A.**

Odessa National Polytechnic University
o.o.protunkevych@opu.ua

132

Summary /Резюме

Rutin and quercetin are part of many phytopreparations with antioxidant and anti-inflammatory effects. *Flores Sophorae japonicae* contain up to 20 % rutin. The authors investigated the optimal conditions for the selective extraction of rutin and quercetin from *Flores Sophorae japonicae* with alkyls and alkyl acetates. *Flores Sophorae japonicae* was harvested according to the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine. For research, the raw material was ground to particles of 3-5 mm in size. Flavonoids from *Flores Sophorae japonicae* were isolated with 70 % ethanol, the primary aqueous-alcoholic extract was used for further selective extraction of rutin and quercetin with organic solvents (butanol, ethyl acetate and butyl acetate). The quantitative content of total flavonoids (X %, in terms of rutin) in the extracts was determined by the photometric method according to the levels of complexation with aluminum chloride. In the primary water-alcohol extracts, the content of flavonoids was $0,132 \pm 0,06$ %. To evaluate the properties of alkyls and alkyl acetates, to extract rutin from primary extracts, a two-phase selective extraction was performed in a system — water-alcohol extract: organic solvent (butanol, ethyl acetate and butyl acetate). The selective properties of solvents were evaluated by the quantitative content of flavonoids in organic phases. For crystallization of flavonoids, organic phases were concentrated using a rotary evaporator. Based on experimental data for butanol, ethyl acetate and butyl acetate, quantitative extraction characteristics were calculated, such as the distribution coefficient (D) and the levels of rutin extraction (R , %). It was determined that butyl acetate showed the most pronounced ability of selective

extraction ($R = 82.7 \%$). In the ethyl acetate and butanol phases in the cold, crystallization of flavonoids was observed during the day. The precipitates were studied by TLC, IR spectrophotometry and mass spectrometry. Chromatograms showed spots with yellow-green fluorescence and corresponding $R_f = 0.5$ (rutin) and $R_f = 0.81$ (quercetin). In the infrared spectra of flavonoid precipitation, absorption bands characteristic of phenolic and alcoholic hydroxyl groups are visible (lanes 1660, 1610, 1580, 1510, 1460 cm^{-1}) and the "fingerprint" area of 800-1200 cm^{-1} , which confirm the presence of rutin. The mass spectrum of precipitation has a peak 60, which corresponds to the mass of glucose and a peak 302, which confirms the presence of quercetin. It was determined that butanol proved to be the optimal selective extractant of flavonoids.

Key words: rutin, quercetin, flavonoids, selective extraction.

Флавоноиды, рутин и кверцетин, входят в состав многих фитопрепаратов с выраженными капилляроукрепляющим, антиоксидантным и противовоспалительным эффектами. *Flores Sophorae japonicae* содержат до 20 % рутина. Исследовали оптимальные условия селективной экстракции рутина и кверцетина из *Flores Sophorae japonicae* алкилами и алкилацетатами. Заготовку *Flores Sophora Japonica* проводили согласно требованиям ГФУ. Для исследований сырье измельчали до частиц размером 3-5 мм. Флавоноиды из *Flores Sophorae japonicae* выделяли 70 % этанолом, первичное водно-спиртовой извлечение использовали для дальнейшей селективной экстракции рутина и кверцетина органическими растворителями (бутанолом, этилацетатом и бутилацетатом). Количественное содержание суммы флавоноидов ($X \%$, в пересчете на рутин) в экстрактах определяли фотометрическим методом по степени комплексообразования с алюминия хлоридом. В первичных водно-спиртовых вытяжках содержание флавоноидов составило $0,132 \pm 0,06 \%$. Для оценки свойств алкилов и алкилацетатив извлекать рутин из первичных вытяжек, проводили двухступенчатую селективную экстракцию в системе -водно-спиртовой извлечение: органический растворитель (бутанол, этилацетат и бутилацетат). Выборочные свойства растворителей оценивали по количественному содержанию флавоноидов в органических фазах. Для кристаллизации флавоноидов органические фазы концентрировали на роторном испарителе. На основании экспериментальных данных для бутанола, этилацетата и бутилацетата были рассчитаны такие количественные экстракционные характеристики, как коэффициент распределения (D) и степень извлечения рутина ($R, \%$). Установлено, что бутилацетат проявил наиболее выраженную способность селективной экстракции ($R = 82,7 \%$). В этилацетатной и в бутанольной фазах на холоду в течение суток наблюдалась кристаллизация флавоноидов. Осадки исследовали методом ТСХ, ИК-спектрофотометрии и масс-спектрометрии. На хроматографах были обнаружены пятна с желто-зеленой флуоресценцией и соответствующими $R_f = 0,5$ (рутин), и $R_f = 0,81$ (кверцетин). В ИК-спектрах осадков флавоноидов видны полосы поглощения, характерные для фенольных и спиртовых гидроксильных групп (полосы 1660, 1610, 1580, 1510, 1460 cm^{-1}) и область «отпечатка пальцев» 800-1200 cm^{-1} , которые подтверждают присутствие рутина. На масс-спектре осадков имеется пик 60, который соответствует массе глюкозы и пик 302, который подтверждает наличие кверцетина. Установлено, что бутанол проявил себя оптимальным селективным экстрагентом флавоноидов.

Ключевые слова: рутин, кверцетин, флавоноиды, селективная экстракция

Флавоноїди, рутин і кверцетин, входять до складу багатьох фітопрепаратів з вираженим капіляррозміцнюючим, антиоксидантним та протизапальним ефектами. *Flores Sophorae japonicae* містять до 20 % рутину. Досліджували оптимальні умови селективної екстракції рутину і кверцетину з *Flores Sophorae japonicae* алкілами та алкілацетатами. Заготівлю *Flores Sophorae japonicae* проводили згідно вимогам ДФУ. Для досліджень сировину подрібнювали до частинок розміром 3-5 мм. Флавоноїди з *Flores Sophorae japonicae* виділяли 70 % етанолом, первинний водно-спиртовий витяг використовували для подальшої селективної екстракції рутину і кверцетину органічними розчинниками (бутанолом, етилацетатом та бутилацетатом). Кількісний вміст суми флавоноїдів (X %, у перерахунку на рутин) у екстрактах визначали фотометричним методом по ступеню комплексоутворення з алюмінію хлоридом. У первинних водно-спиртових витягах вміст флавоноїдів склав $0,132 \pm 0,06$ %. Для оцінювання властивостей алкілів та алкілацетатів виділяти рутин із водно-спиртових витягів, проводили двохступеневу селективну екстракцію системи водно-спиртовий витяг: органічний розчинник (бутанол, етилацетат і бутилацетат). Вибіркові властивості розчинників оцінювали по кількісному вмісту флавоноїдів в органічних фазах. Для кристалізації флавоноїдів органічні фази концентрували на роторному випаровнику. На підставі експериментальних даних для бутанолу, етилацетату і бутилацетату, були розраховані такі кількісні екстракційні характеристики, як коефіцієнт розподілу (D) та ступінь витягання рутину (R , %). Встановлено, що найкращу здатність селективно вивільняти рутин і кверцетин з водно-спиртового витягу проявив бутилацетат ($R = 82,7$ %). В етилацетатної і в бутанольної фазах на холоді протягом доби спостерігалась кристалізація флавоноїдів. Осади досліджували методом ТШХ, ІЧ-спектрофотометрії та мас-спектрометрії. На хроматографах були виявлені плями жовто-зеленою флуоресценцією та відповідними $R_f = 0,5$ (рутин), і $R_f = 0,81$ (кверцетин). В ІЧ-спектрі осадів флавоноїдів наявні смуги поглинання, характерні для фенольних та спиртових гідроксильних груп (ряд смуг 1660 см $^{-1}$: 1610 , 1580 , 1510 , 1460 см $^{-1}$) і область «відбитка пальців» $800-1200$ см $^{-1}$, які підтверджують присутність рутину. На мас-спектрі дослідного осаду наявний пік 60 , який відповідає масі глюкози і пік 302 , який підтверджує наявність кверцетину. Встановлено, що бутанол проявил себе оптимальним селективним екстрагентом флавоноїдів.

Ключові слова: рутин, кверцетин, флавоноїди, селективна екстракція

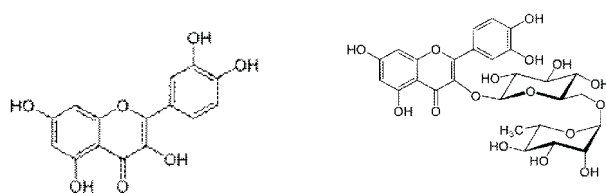
Актуальність

Важливе місце у сучасної фармації займають фітопрепарати на основі рослинних пігментів — флавоноїдів. Ці сполуки відносяться до групи вітаміну Р і широко використовуються як джерело для створення лікарських засобів протизапальної, капілярпротекторної, гепатозахисної, антибактерицидної дії. Найчастіше у фітотерапії застосовують

рутин і кверцетин, які проявляють виражений капіляррозміцнюючий, антиоксидантний та протизапальний ефекти.

Кверцетин s 3,5,7,3,4 — пентаоксіфлавіон, представляє собою лимонно-жовті кристали s т. пл. $316-317$ °С. Рутин s 3-рутинозид кверцетину, 3-рамноглікозид-3,5,7,3,4 s пентаоксіфлавіон, світло-жовті голки, s т. пл. $180-190$ °С.

Основними джерелами для їх от-



Кверцетин

Рутин

Рис. 1 Флавоноїди *Sophorae japonicae*

римання є бутони і плоди софори японської (*Alabastrae Sophorae japonicae*, *Fructus Sophorae japonicae*), зелена маса гречихи посівної (*Fagopyrum sagittatum Gilib*), плоди аронії чорноплідної (*Fructus Aroniae melanocarpaе*). Для розширення сировинної бази значний інтерес представляють квітки софори японської (*Flores Sophorae japonicae*), які містять до 20 % рутину [1].

Мета дослідження - оптимізація умов селективної екстракції рутину і кверцетину з *Flores Sophorae japonicae* алкілами та алкілацетатами.

Матеріали і методи дослідження

Дослідна рослинна сировина була заготовлена в 2018 році в Одеській області. Збір *Flores Sophorae japonicae* проводили протягом часу цвітіння (липень-серпень). Сировину висушували повітряно-тіньовим методом протягом 14 діб до остаточної вологості 12 %. Для проведення дослідів квітки подрібнювали до частинок розміром 3-5 мм [2].

Комплекс флавоноїдів виділяли методом одноступеневої мацерації, екстрагентом служив 70 % етиловий спирт, співвідношення сировина: екстрагент складало 1: 15. Екстракцію проводили в установці з оборотним холодильником на киплячій водянній бані протягом 30 хвилин. Одержаний первинний водно-спиртовий витяг фільтрували під вакуумом і використовували для подальшої селективної екстракції рутину і кверцетину [2]. Кількісний вміст

суми флавоноїдів (X %, у перерахунку на рутин) у екстрактах оцінювали фотометричним методом по ступеню комплексоутворення з алюмінію хлоридом [3].

Проводили порівнювальний аналіз властивостей алкілів та алкілацетатів вибірково виділяти рутин і кверцетин з водно-спиртових витягів. В якості селективних екстрагентів були використані органічних розчинники: бутанол, етилацетат і бутилацетат. З метою виділення чистих флавоноїдів до водно-спиртових витягів додавали рівні об'єми певних органічних розчинників і проводили двохступеневу селективну екстракцію системі рідина-рідина тривалістю 20 хвилин у режимі струшування. Розділення на органічну та водну фази здійснювали у ділильній лійці. Для бутанолу, етилацетату та бутилацетату отримували відповідно по дві органічні фракції флавоноїдів (Φ_1 і Φ_2). Вибіркові властивості бутанолу, етилацетату та бутилацетату оцінювали по кількісному вмісту флавоноїдів в органічних фазах (X %, у перерахунку на рутин) [4]. З метою одержання осадів рутину і кверцетину органічні фази концентрували до початкового об'єму на роторному випаровнику та витримували протягом 24 години при $t = 2^\circ\text{C}$. Осади флавоноїдів відділяли фільтруванням і висушували на повітрі при $t = 20^\circ\text{C}$ [4]. З осадами проводили якісні кольорові реакції для підтвердження наявності рутину і кверцетину: цианідинову пробу, реакцію з концентрованою сірчаною кислотою, хлорним залізом, гідроксидом натрію. Якісний склад виділених флавоноїдів аналізували методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) в системі — бутанол: крижана оцтова кислота: вода (6: 1: 2). Плями флавоноїдів проявляли 10 % розчином алюмінію хлориду. Також якісний аналіз осадів досліджували методом ІЧ-спектрофотометрії та мас-

спектрометрії [5].

Результати дослідження та їх обговорення

У первинних водно-спиртових витягах методом фотоколориметрії, по ступеню комплексоутворення з алюмінієм хлоридом, визначали кількісний вміст флавоноїдів; він склав $0,132 \pm 0,06$ % від маси сухої сировини (у перерахунку на рутин).

В отриманих органічних фракціях кількісно визначили вміст рутину.

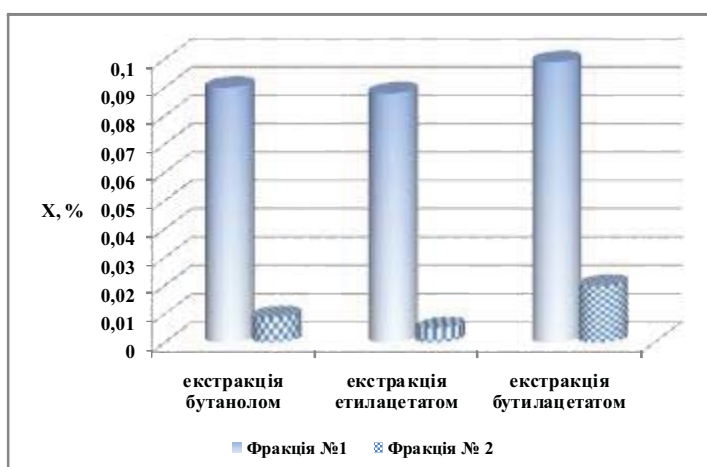


Рис. 2 Вміст флавоноїдів у фракціях органічних фаз при двократній вибірковій екстракції з первинного водно-спиртового витягу (X, в % від маси сухої сировини, у перерахунку на рутин)

Дослідні органічні розчинники проявили близькі властивості вилучати комплекс флавоноїдів, найкращі екстрагуючі властивості виявив бутилацетат.

За експериментальними даними для дослідних органічних розчинників були розраховані такі кількісні екстракційні характеристики, як коефіцієнт розподілу (D) та ступінь витягання рутину (R , %). Бутанол проявив здатність витягувати 75,8 % всіх флавоноїдів з первинного екстракту, етилацетат — 65,7 %, бутилацетат — 82,7 %. Таким чином, бутилацетат проявив кращі властивості вибірково екстрагувати рутин. Результати представлені у таблиці 1.

В етилацетатній і в бутанольній фазах на холоді протягом доби спостерігалась кристалізація флавоноїдів і поява осаду, в бутилацетатній фазі осадження не спостерігалось. Дослідні осадки проявляли жовто-зелену флуоресценцію в УФ-світлі (300-400 нм), притаманну для флавоноїдів і дали

Встановлено, що основна кількість флавоноїдів переходила в органічну фазу вже на першій ступені екстракції.

позитивний результат при проведенні якісних реакцій.

Якісний аналіз осадів методом

Таблиця 1

Кількісні екстракційні характеристики органічних розчинників

Органічні розчинники	Коефіцієнт розподілу (D)	Ступінь витягання, R , %
Бутанол	3,10	75,8 %
Етилацетат	2,7	67,5
Бутилацетат	3,71	82,7

Таблиця 2

Результати якісного аналізу осадів флавоноїдів, кристалізованих з бутанолу та етилацетату, методом ТШХ

Досліджуваний осад	Величина R_f	Ідентифіковані флавоноїди
Осад №1 (з етилацетату)	0,5	рутин
	0,81	кверцетин
Осад №2 (з бутанолу)	0,49	рутин
	0,80	кверцетин
ДСЗ рутину	0,5	рутин
ДСЗ кверцетину	0,81	кверцетин

ТШХ показав, що осадки із бутанолу і етилацетату містять рутин та кверцетин. Після проявлення хроматограми спиртовим розчином 10 %-го $AlCl_3$ відмічалась наявність жовто-зелених плям з величиною $R_f = 0,5$ (рутин), і $R_f = 0,81$ (кверцетин). R_f стандарту рутину склав 0,5, R_f стандарту кверцетину — 0,81. Дані проведені в таб-

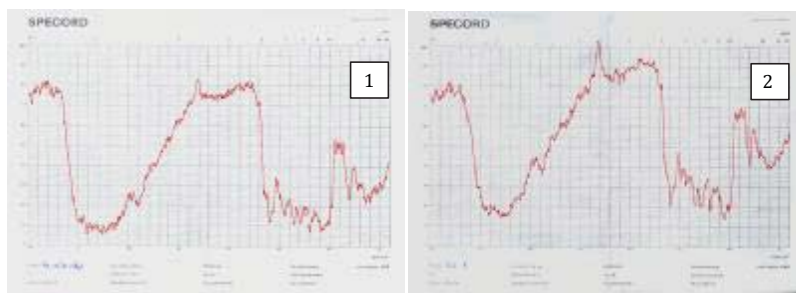


Рис. 3 ІЧ-спектр осадів флавоноїдів
1. Осад з етилацетату (№1) 2. Осад з бутанолу (№ 2)

лиці 2.

В ІЧ-спектрі осадів флавоноїдів наявні смуги поглинання, характерні для різних угруповань. Так, рутин має широкую смугу $3200-3500\text{ см}^{-1}$, обумовлену фенольними та спиртовими гідроксильними групами; смуга 1660 см^{-1} належить карбонільній групі; ароматичні $\text{C}=\text{C}$ зв'язки дають ряд смуг $1610, 1580, 1510, 1460\text{ см}^{-1}$. Важливою для ідентифікації флавоноїдів являється так звана область «відбитка пальців» $800-1200\text{ см}^{-1}$. Збіг смуг вказаних угруповань і області «відбитка пальців» служить надійною ознакою ідентичності речовин.

Методом мас-спектрометрії реєструвалися мас-спектри дослідних осадів та стандартних зразків рутину і кверцетину (рис. 4). На мас-спектрі видно, що рутин розщеплюється на глікон і аглікон, піки 60 і 302.

На мас-спектрі дослідного осаду наявний пік 60, який відповідає масі глюкози і пік 302, який підтверджує наявність кверцетину. Отже, в результаті електронного удару молекула глікозиду рутину розпадається на аглікон кверцетин та моносахаридні залишки глікону.

Висновки

В результаті проведених досліджень встановлено, що найкращу здатність селективно екстрагувати рутин і кверцетин з первинних водно-спиртових витягів проявив бутилацетат,

ступінь витягання флавоноїдів ($R, \%$) склала $82,7\%$. Для повного виділення флавоноїдів з спиртового витягу органічними розчинниками достатньо двох-ступеневої мацерації. Оптимальним

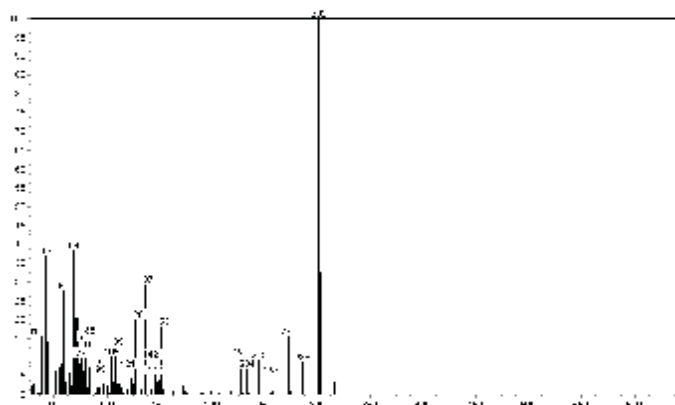


Рис. 4 Мас-спектр осаду флавоноїдів з бутанолу

розчинником для одержання кристалів рутину і кверцетину виявився бутанол. Результати якісного аналізу ТШХ, ІЧ-спектрофотометрії та мас-спектрометрії підтвердили, що осаді містять суміш рутину і кверцетину.

Література

1. Саламаха В.В., Протункевич О.О., Присяжнюк К.О. Розробка методів виділення рутину і кверцетину із квіток софори японської. // Праці Одеського національного політехнічного університету. — 2012. — № 1 (38). — С. 286–290.
2. Солодовніченко Н.М., Журавльов М.С., Ковальов В.М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати. — Харьков: НФаУ, МТК-книга, 2003. — С. 171–184.
3. Матющенко Н.В. Количественное определение суммы флавоноидов в новом фитопрепарате «Элима» / Н.В. Матющенко, Т.А. Степанова // Химико-фармацевтический журнал. — 2003. — Т. 37, №5. — С.42–44.
4. Ерина О.В., Мокшина Н.Я., Селеменов В.Ф., Нечаева Л.С.. Экстракционно-

фотометрическое определение рутина в водных средах/ О.В.Ерина// Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. — 2005. — №1. — с.26– 28.

5. Ладыгина Е.Я., Сафронич Л.Н., Отряшенкова В.Э. и др. Химический анализ лекарственных растений: Учебное пособие для фармац. Вузов; Под ред. Н.И. Гринкевича, Л.Н. Сафронич — М.: Высш. Шк., — 1983. — 176с.

References

1. Salamakha V.V., Protunkevich O.O., Prysiazhniuk K.O. 2012, "Rozrobka metodiv vydilennia rutynu i kvvertsetynu iz kvitok sofory yaponskoi" [Development of methods for extracting rutin and quercetin from Japanese pagoda tree flowers], Pratsi Odesk. politekhn. univers., No 1 (38), pp. 286–290. (in Ukrainian)
2. Solodovnichenko N.M., Zhuravliov M.S., and Kovaliov V.M. 2003, Likarska roslynna syrovyna ta fitopreparaty [Plant raw materials and phyto-preparations], NFaU MTK-knyha, Kharkiv, Ukraine. (in Ukrainian)
3. Yerina O.V., Mokshina N.Ya., Selemenev

V.F., Nechaeva L.S. 2005, "Ekstraktsionno-fotometrisheskoe opredelenie rutina v vodnykh sredakh" [Extractional photometric determination of rutin in aqueous media], Vestnik VGU, Seriya: Khimiya Biologiya Farmatsiya, No 1, pp. 26–28. (in Russian)

4. Matyushchenko N.V., Stepanova T.A 2003, "Kolichestvennoe opredelenie summy flavonoidov v novom preperate "Elima"" [Quantitative determination of the total content of flavonoids in the new phytopreparation "Elima"], Khimikofarmats. zhurnal, Vol. 37, No 5, pp. 42–44. (in Russian)
5. Ladygina Ye. Ya., Safronich L.N., Otryashenkova V. E. et al. 1983, Khimicheskiy analiz lekarstvennykh rasteniy: uchebnoe posobie dlya farmats. vuzov [Chemical analysis of medicinal plants: a textbook for pharmaceutical universities], in Grinkevich, N.I. and Safronich, L.N. (ed.), Vyssh. shkola, Moscow, USSR. (in Russian)

*Впервые поступила в редакцию 02.04.2019 г.
Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования*

УДК 665.6.035.6+577.11

DOI <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3251591>

РЕОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ГЕЛІВ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ

Кравченко І.А.¹, Цепколенко В.О.², Пушкаръов Ю.М.¹, Сайтарли С.В.¹, Нестеркіна М.В.¹

¹ Одеський національний політехнічний університет, м. Одеса

² Інститут пластичної хірургії «Віртус», м. Одеса

РЕОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ГЕЛЕЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Кравченко И.А.¹, Цепколенко В.А.², Пушкарев Ю.М.¹, Сайтарлы С.В.¹, Нестеркина М.В.¹

¹ Одесский национальный политехнический университет, Одесса

² Институт пластической хирургии «Виртус», г. Одесса

RHEOLOGICAL PROPERTIES OF HYALURONIC ACID GELS

Kravchenko I.A.¹, Tsepkoленko V.A.², Pushkarev Yu.M.¹, Saitarly S.V.¹, Nesterkina M.V.¹

¹ Odessa National Polytechnic University, Odessa

² Institute of Plastic Surgery "Virtus", Odessa