

УДК 66.048.5:577.164.3:661.12

В.В. Саламаха, магістр,  
О.О. Протункевич, канд. біол. наук, доц.,  
К.О. Присяжнюк, спеціаліст,  
Одес. нац. політехн. ун-т

## РОЗРОБКА МЕТОДІВ ВИДІЛЕННЯ РУТИНУ І КВЕРЦЕТИНУ ІЗ КВІТОК СОФОРИ ЯПОНСЬКОЇ

*В.В. Саламаха, О.О. Протункевич, К.О. Присяжнюк.* Розробка методів виділення рутину і кверцетину із квіток софори японської. Вивчено екстрагуючі властивості 70 %-го етилового спирту і киплячої води. Досліджено вплив процесу упарювання на роторному випаровнику під вакуумом на збереження рутину.

*Ключові слова:* рутин, кверцетин, софора японська.

*В.В. Саламаха, О.О. Протункевич, К.А. Присяжнюк.* Разработка методов выделения рутина и кверцетина из цветков софоры японской. Изучено экстрагирующие свойства 70 %-го этилового спирта и кипящей воды. Изучено влияние процесса упаривания на роторном испарителе под вакуумом на сохранность рутина.

*Ключевые слова:* рутин, кверцетин, софора японская.

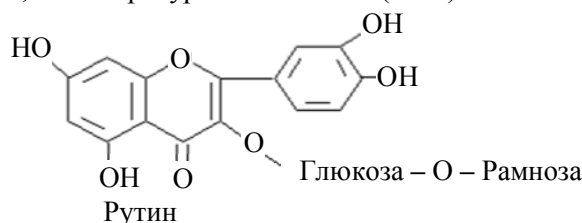
*V.V. Salamakha, O.O. Protunkevich, K.O. Prysiazhniuk.* Development of methods for extracting rutin and quercetin from Japanese pagoda tree flowers. Extraction properties of 70 % ethanol and boiling water are studied. The impact of evaporation process in a rotary evaporator under vacuum on rutin preservation is investigated.

*Keywords:* rutin, quercetin, Japanese pagoda tree.

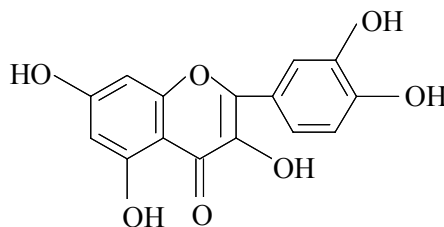
Флавоноїди — біологічно-активні речовини рослинного походження, які широко використовуються в медицині. Вони проявляють антиоксидантну дію, здатні інгібувати процес перекисного окислення ліпідів біологічних мембран, разом з аскорбіновою кислотою беруть участь у синтезі сполучної тканини, проявляють капілярозміцнювальну, протизапальну і спазмолітичну дію.

Рутин і кверцетин — головні діючі речовини рослинної сировини софори японської.

Рутин — 3-рутинозид кверцетину, 3-рамноглікозид-3,5,7,3',4' — пентаоксифлавіон — являє собою світло-жовті голки, з температурою плавлення (т.пл.) 180...190 °С.



Кверцетин — 3,5,7,3',4'-пентаоксифлавіон — являє собою лимонно-жовті кристали с т.пл. 316...317 °С.



Джерелом промислового отримання рутину є софора японська (*Sophora japonica* L.), листопадне дерево родини бобових. Для виготовлення фітопрепаратів зазвичай використовують бутони і плоди, для яких характерний високий вміст рутину (до 20 %).

Заготівля бутонів і плодів пов'язана з певними труднощами: сировину збирають безпосередньо з гілок на висоті до 30 м, після висушування дана сировина стає досить жорсткою і потребує засобів механічного подрібнення. На відміну від бутонів і плодів, квітки софори не мають труднощів, пов'язаних зі збором, дозволений збір опалих квіток, після висушування квітки стають досить крихкими і легко подрібнюються. Тому стало цікавим виділити рутин і кверцетин із квіток софори японської.

Мета дослідження — розробка лабораторного методу виділення рутину з квіток софори. Для цього необхідно вирішити такі питання:

— провести дослідження екстрактивних властивостей води та 70 %-го етилового спирту для виділення рутину з квіток софори;

— визначити кількісний вміст флавоноїдів  $X$ , % у неконцентрованих водних і водно-спиртових екстрактах методом фотоколориметрії в перерахунку на рутин;

— дослідити умови концентрування екстрактів флавоноїдів на роторному випаровнику під вакуумом для запобігання їх розкладення;

ідентифікувати одержані флавоноїди: визначити їх температуру плавлення, провести якісні реакції та якісний аналіз методом тонкошарової хроматографії (ТШХ).

Для дослідження заготовлені квітки софори японської, зібрані в фазу цвітіння в Одеській області. Сировину піддавали тіньовій повітряній сушці протягом 14 діб до залишкової вологості 15 %. Для приготування екстрактів сировину подрібнювали до частинок розміром 3...5 мм. Кількісний вміст флавоноїдів в дослідних екстрактах проводили методом фотоколориметрії. Для запобігання гідролізу рутину концентрування екстрактів здійснювалось в лабораторному роторному випаровнику ІР-1М2 під вакуумом при температурі 40...50 °С. Якісний склад виділених флавоноїдів аналізували методом ТШХ.

Для екстракції рутину з квіток софори як екстрагенти використовувались 70 %-й етиловий спирт та кипляча вода.

Для приготування водного екстракту 20 г мілко подрібнених сухих квіток софори поміщали в конічну колбу місткістю 350 мл і екстрагували рутин три рази киплячою водою по 150, 100 і 50 мл протягом 15 хв. Витяги об'єднували і фільтрували під вакуумом.

Водно-спиртову екстракцію флавоноїдів квіток софори здійснювали таким чином: 2,5 г сухої сировини поміщали в колбу місткістю 250 мл, додавали 75 мл 70 %-го етилового спирту, після чого колбу з'єднували зі зворотним водяним холодильником і нагрівали на водяній бані протягом 20 хв. Готовий екстракт охолоджували і фільтрували [1].

В екстрактах визначали кількісний вміст комплексу флавоноїдів методом фотоколориметрії в процентному перерахунку на рутин.

Водний екстракт концентрували до 1/4, а водно-спиртовий — до 1/5 початкового об'єму на роторному випаровнику і поміщали в холодне місце ( $t = 0$  °С) для кристалізації рутину. Протягом доби утворювалися осади флавоноїдів.

Дослідні осади проявляли жовто-зелену флуоресценцію в УФ-світлі (300...400 нм), що свідчило про наявність флавоноїдів. З насиченими розчинами одержаних речовин провели ряд якісних реакцій на флавоноїди: цианідинова проба, реакція з концентрованою сірчаною кислотою, реакція з хлорним залізом, реакція з гідроксидом натрію. Всі якісні реакції дали позитивний результат.

Визначали масу отриманих осадів. У 70 %-му спиртовому екстракті маса осаду була в 5 разів більше, ніж у водному (рис. 1).

Температура плавлення досліджуваного комплексу флавоноїдів визначена за фармакопейною методикою. Температура плавлення осаду спостерігалась в межах 192...198 °С, що характерно для рутину.

Для розділення комплексу флавоноїдів та їх ідентифікації застосовано метод ТШХ на пластинках "Silyfol" UV-254. Для оцінки хроматографічної поведінки речовини в певних умовах використовували величину  $R_f$ , яка дорівнює відношенню відстані, яка пройдена речовиною, до відстані, яку пройшов розчинник. Хроматографію проводили в системі: бутанол — крижана оцтова кислота — вода (6:1:2) висхідним способом [1]. Для проявлення флавоноїдів пластинки обприскували 10 %-м спиртовим розчином алюмінію хлориду і нагрівали в сушильній шафі 3...5 хв при температурі 100...105 °С. Визначали колір плям флавоноїдів і їх флуоресценцію в УФ-світлі. На хроматограмі виявлялася домінуюча пляма жовтого кольору з  $R_f=0,46$  — рутин і пляма з  $R_f=0,82$ , що відповідає стандарту кверцетин (табл. 1). В УФ-світлі плями проявляли яскраву жовто-зелену флуоресценцію.

Таблиця 1

Результати ТШХ досліджених екстрактів квіток софори японської

Вид екстракту	Величина $R_f$	Досліджувані флавоноїди
Водний	0,46	Рутин
	0,83	Кверцетин
Водно-спиртовий	0,47	Рутин
	0,82	Кверцетин

Кількісний вміст комплексу флавоноїдів в досліджених екстрактах визначали методом фотокolorиметрії за ступенем комплексоутворення з хлоридом алюмінію. У мірну пробірку місткістю 10 мл, вносили 0,1 мл дослідного екстракту і додавали 0,5 мл 10 %-го розчину хлориду алюмінію. Для приготування розчину порівняння в другу пробірку місткістю 10 мл вносили 0,1 мл дослідного екстракту, і в кожену пробірку — по 1 краплі 2 %-го розчину соляної кислоти, після чого об'єми в обох пробірках доводили до 5 мл 60 %-м етиловим спиртом і залишали на 20 хв для розвитку забарвлення.

Оптичну густину вимірювали на КФК-2 в діапазоні 365...400 нм в кюветах з товщиною поглинаючого шару 10 мм. До робочої кювети поміщали пробу, що містила комплекс з хлоридом алюмінію, в другу кювету — розчин порівняння. Як стандарт використовували державний стандартний зразок (ДСЗ) рутину.

Вміст суми флавоноїдів в досліджуваних екстрактах в перерахунку на рутин в процентах розраховували за формулою

$$X = \frac{D \cdot a}{d}$$

де  $D$  — оптична густина досліджуваного екстракту проти розчину порівняння;

$d$  — оптична густина ДСЗ рутину;

$a$  — точна наважка рутину для приготування розчину ДСЗ, 0,05 г [2].

Результати кількісного визначення вмісту флавоноїдів приведені на рис. 2.

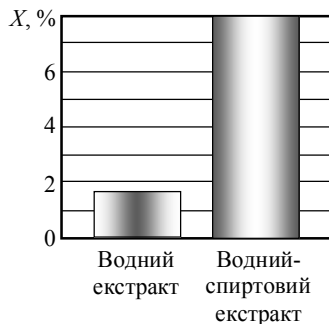


Рис. 1. Маса осадів флавоноїдів з водного та водно-спиртового екстрактів у перерахунку на 5 г сухої сировини

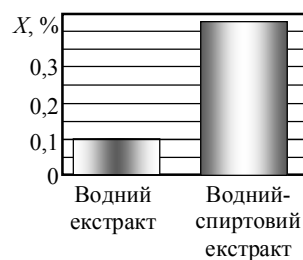


Рис. 2. Вміст флавоноїдів у досліджуваних екстрактах із квіток софори японської

Згідно з одержаними даними можна зробити висновок, що водно-спиртова суміш має більшу екстрагуючу здатність, флаванолідів екстрагується на 23 % більше, ніж киплячою водою.

Досліджені екстракти флаванолідів упарювали на роторному випаровнику під вакуумом при температурі нижче 60 °С для запобігання розщеплення рутину (табл. 2). Досліджено вплив температури при упарюванні на зберігання флаванолідів. Для концентрування на роторному випаровнику використовували водний та водно-спиртовий екстракти (70 %-й).

Таблиця 2

Параметри упарювання екстрактів флаванолідів на роторному випаровнику

Дослідні екстракти	Об'єм екстракту, мл	Температура упарювання, °С	Тиск, мм рт. ст.	Час упарювання, хв	Ступінь концентрування екстракту
Водний	50	42,0	60	30	в 4 рази
Водно-спиртовий (70 %-й)	50	47,5	50	12	в 5 разів

Температура упарювання водно-спиртових екстрактів під вакуумом знаходилася в межах 40...50 °С, що дозволяє запобігти гідролізу рутину. При упарюванні екстрактів без вакууму температура складала 80...90 °С.

Методом ТШХ визначений якісний склад дослідних екстрактів, упарених в різних умовах: під вакуумом і без вакууму (табл. 3).

Таблиця 3

Результати якісного аналізу упарених екстрактів софори японської

Вид екстракту	<i>Rf</i>	
	Екстракт, упарений під вакуумом	Екстракт, упарений без вакууму
Водний	0,46 (рутин) 0,82 (кверцетин)	0,48 (рутин) 0,62 (ізокверцетрин) 0,80 (кверцетин)
Водно-спиртовий (70 %-й)	0,47 (рутин) 0,82 (кверцетин)	0,46 (рутин) 0,62 (ізокверцетрин) 0,82 (кверцетин)

За результатами ТШХ в екстрактах, що концентрувалися під вакуумом при низькій температурі, виявлено плями з *Rf* — 0,46 та *Rf* — 0,82, що відповідають рутину і кверцетину. На хроматограмах екстракту, що упарений без вакууму, крім плям з *Rf* — 0,46 (рутин) та *Rf* — 0,82 (кверцетин) відмічається наявність третьої плями з *Rf* — 0,62. Такий *Rf* характерний для монозиду ізокверцетрину, який утворюється при відщепленні від біозиду рутину залишку моносахариду рамнози [3]. Таким чином, для запобігання розщеплення рутину необхідно витримувати температуру упарювання менш, ніж 60 °С і процес упарювання проводити під вакуумом.

За результатами експерименту можна зробити висновки:

— 70 %-й етиловий спирт має більш високі екстрагуючі властивості у порівнянні з киплячою водою, рутину виділяється в 5 разів більше; вихід рутину складає 7,9 % ;

— процес упарювання необхідно проводити під вакуумом (50...60 мм рт. ст.), який дозволяє упарювати при  $t < 50$  °С.

## Література

1. Химический анализ лекарственных растений: учебн. пособие для фармац. вузов / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова [и др.]; под ред. Н.И. Гринкевича, Л.Н. Сафронич — М.: Высш. шк., 1983. — 176с.

2. Матющенко, Н. В. Кількісне визначення суми флавоноїдів в новому фітопрепараті “Еліма” / Н.В. Матющенко, Т.А. Степанова // Хіміко-фармац. журн. — 2003. — Т. 37, № 5. — С. 42 — 44.
3. Анисимова, М.М. Качественный и количественный анализ флавоноидов гречихи посевной / М.М. Анисимова, В.А. Куркин, В.Н. Ежков // Изв. Самарского научного центра Российской академии наук. — 2010. — Т. 12, № 1(8) — С. 2011 — 2014.

### References

1. Khimicheskiy analiz lekarstvennykh rasteniy: uchebnoe posobie dlya farmats. vuzov [Chemical Analysis of Medicinal Plants: a Textbook for Pharmaceutical Students] / Ye.Ya. Ladygina, L.N. Safronich, V.E. Otryashenkova et al. / ed. by N.I. Grinkevich, L.N. Safronich. — Moscow. 1983. — 176 p.
1. Matiushchenko, N.V. Kilkisne vyznachennia sumy flavonoidiv v novomu fitopreparati “Elima” [Quantitative Determination of the Total Content of Flavonoids in the New Phytopreparation “Elima”] / N.V. Matyushchenko, T.A. Stepanova // Khimiko-farmats. zhurn. [Pharmaceutical Chemistry Journal]. — 2003. — Vol. 37, # 5. — pp. 42 — 44.
2. Anisimova M.M. Kachestvenniy i kolichestvenniy analiz flavonoidiv grechichy posevnoy [Qualitative and Quantitative Analysis of Buckwheat Sowing Flavonoids] / M.M. Anisimova, V. A. Kurkin, VN. Yezhkov // Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoi akademii nauk [News of Samara scientific center of the Russian Academy of Sciences]. — 2010. — Vol. 12, # 1(8). — pp. 2011 — 2014.

Рецензент д-р хим. наук, проф. Одес. нац. политехн. ун-та Куншенко Б.В.

Поступила в редакцию 5 марта 2012 г.