

УДК: 54 - 116

**Исамидин кызы Айгүл**

аспирант Ошского государственного  
педагогического университета

**Бабеков Анарбай Ураимович**

к.х.н., доцент Ошского государственного  
педагогического университета

**Ковалева Елена Германовна**

к.х.н., доцент Уральского федерального университета

**ЖОГОРКУ ЭФФЕКТИВДҮҮ СУЮК ХРОМАТОГРАФИЯ АРКЫЛУУ  
ТАБИГЫЙ ТЕРЕҢ ЭВТЕТИКАЛЫК ЭРИТКИЧТЕРДИ КОЛДОНУУ МЕНЕН  
УЙ БЕДЕНИН КУРАМЫНДАГЫ БИОЛОГИЯЛЫК АКТИВДҮҮ ЗАТТАРДЫ  
ЭКСТРАКЦИЯЛОО, ИДЕНТИФИКАЦИЯЛОО ЖАНА САНДЫК АНЫКТОО  
ЭКСТРАКЦИЯ, ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
ИЗОФЛАВОНОИДОВ КРАСНОГО КЛЕВЕРА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРИРОД-  
НЫХ ГЛУБОКИХ ЭВТЕКТИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ МЕТОДОМ ВЭЖХ  
EXTRACTION, IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF RED CLOVER  
ISOFLAVONES USING NATURAL DEEP EUTECTIC SOLVENTS BY HPLC**

**Аннотация.** Бул илимий макалада өсүмдүктөрдүн географиялык жайгашуусу жана уй беденин өсүү өзгөчөлүктөрү каралган. Уй беденин химиялык курамы жана уй беденин гүлүнүн курамында кездешкен изофлавоноиддер көрсөтүлөт. Уй беденин курамынан бөлүнүп алынган активдүү заттардын биологиялык жана фармакологиялык таасири жөнүндө көрсөтүлгөн.

**Негизги сөздөр:** өсүмдүк каражаты, фитоэстрогендер, изофлавоноиддер, экстракция ыкмалары, уй беденин гүлүн экстракциялоо

**Аннотация.** В данной статье представлены сведения о географическом расположении растительности и особенностях вегетативного роста красного клевера. Изучены химический состав красного клевера, наличие изофлавонов в цветках. Приведены данные о современных сведениях биологических и фармакологических эффектов флавоноидов, выделенных из красного клевера.

**Ключевые слова:** растительный материал, фитоэстрогены, изофлавоноиды, методы извлечения, экстракт цветков красного клевера.

**Abstract.** This article presents the geographical location of vegetation and the characteristics of the vegetative growth of red clover. Chemical composition of red clover, presence of isoflavones in flowers. Data on the current information on the biological and pharmacological effects of flavonoids isolated from red clover are presented.

**Key words:** plant material, phytoestrogens, isoflavonoids, extraction methods, extract of red clover flowers.

В последние годы питательные и биоактивные свойства различных биологически-активных веществ активно исследуются с целью введения в продукты питания, в связи с их потенциальным положительным влиянием на здоровье человека. В связи с этим существует растущий спрос на эффективные методы экстракции, особенно при использовании нового класса растворителей, не обладающих токсичными свойствами [1].

Изофлавоны представляют собой вещества с противораковой, антиоксидантной активностью, которые могут использоваться для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний и улучшения здоровья костей. Они обладают также эстрогенной активностью, т.е. являются фитоэстрогенами. Традиционными методами экстракции изофлавонов из растительного и пищевого сырья являются экстракции из метанола, этанола, водных смесей этилацетата и др. Новые глубокие эвтектические растворители являются альтернативой токсичным традиционным растворителям. Они представляют собой системы, образованные из эвтектической смеси кислот и оснований Льюиса или Бренстеда, которые могут содержать различные анионные или катионные вещества, включают одно или несколько соединений в виде смеси, чтобы получить эвтектику с температурой плавления намного ниже, чем любой из отдельных компонентов [2].

Красный клевер (*Trifolium pratense* L.) является наряду с соей одним из богатых источников изофлавонов. Сообщалось, что концентрация изофлавонов в красном клевере в 2–10 раз выше, чем в семенах сои, которые являются более распространенным источником изофлавонов [3].

Цель статьи – выбор оптимальных условий для экстракции даидзеина, генистеина, формонетина и биоханина А из цветков высушенного красного клевера с использованием природных глубоких эвтектических растворителей с оценкой антиоксидантной

активности полученных экстрактов и общего содержания полифенольных веществ в них.

Научно-практическая значимость. Нами было осуществлено количественное определение даидзеина, генистеина и пуэарина, извлеченных из соевой мелассы (отходной продукт переработки сои) и красного клевера с использованием природных глубоких эвтектических растворителей (NADES) методом ВЭЖХ-УФ с идентификацией биоханина А и формонетина в экстрактах красного клевера (*Trifolium pratense*) методом газовой хроматографии. Смесь NADES состояла из водного раствора хлорида холина и лимонной кислоты (мольное соотношение 1:2, соответственно). Наибольшее содержание изофлавонов было обнаружено в экстрактах при хранении при  $-18^{\circ}\text{C}$  по сравнению с хранением при комнатной температуре. Наибольший выход изофлавонов и наивысшая антиоксидантная активность были достигнуты при соотношении образцов: растворитель 1:20. Антиоксидантная активность измерялась методом ЭПР-спектроскопии с использованием нитроксильного радикалаДФПГ (дифенилпикрилгидразил). У крыс с диабетом 2-го типа, получавших экстракт красного клевера в дозе 100 и 200 мг/кг массы тела животного, наблюдалось улучшение основных биохимических показателей крови и восстановление гистологической структуры пораженных органов по сравнению с контрольной группой крыс, не получавших экстракт.

Красный клевер (*Trifolium rubens*) является травянистым видом цветущего растения в семействе бобовых. Он удовлетворительно растёт в прохладном климате на хорошо дренированных почвах. Он является родным для Европы, Западной Азии и Северо-Западной Азии и Северо-Западной Африки, но в настоящее время был натурализован и произрастает в различных частях мира. Является кормовым растением для крупного рогатого скота. Считается, что красный клевер обладает мочегонными

и отхаркивающими свойствами. Красный клевер помогает снизить уровень холестерина, сбалансировать эстроген, улучшить кровообращение, мочеиспускание, повышает иммунитет, здоровье костей, снижает артериальную гипертензию и поддерживает здоровье сердечно-сосудистой системы.

Красный клевер – травянистое, опушенно-глябристое и многолетнее растение, достигает в высоту до 91 см. Листья в очертании яйцевидные, листочки ланцетные 4-8 см длиной и 1-1,5 см шириной, по краю неравномерно зубчатые, снизу с сеткой жилок. Стебли прямостоячие или восходящие. Цветки шаровидные или яйцевидные, розовые, фиолетовые или красные по цвету и от 2 до 4 см в диаметре. Бобы яйцевидно-шаровидные, плёчатые, односемянные. Цветение в июне-июле, плодоношение в июле-августе [4].

Красный клевер является вторым идентифицированным источником изофлавонов с соответствующими концентрациями. В красном клевере найдены различные изофлавоны (не менее 31), такие как даидзеин, формонетин, генистеин, глицитин, каликозин, прунетин, биоханин А, ирилон и пратенсеин. Эти соединения являются эстрогенными *in vitro* и *in vivo*, однако в литературе мало информации об оптимальном времени для сбора красного клевера с полей, соответствующем максимальному содержанию изофлавонов [5].

Красный клевер содержит несколько общих классов соединений, но особенно богата изофлавонами, флавонами и флавонолами - соя. Красный клевер содержит изофлавоны даидзеин и генистеин, а соя может содержать небольшое количество формо-

нетина и биоханина А. Красный клевер, однако, содержит значительно больше формонетина и биоханина А по сравнению с соей относительно генистеина и даидзеина [6].

В настоящее время инъекции инсулина и пероральное введение антидиабетических препаратов являются основным средством лечения сахарного диабета. Антидиабетические препараты на западном рынке можно классифицировать как сенситизаторы, секретогоги, инсулиновые аналоги, ингибиторы  $\alpha$ -глюкозидазы, амилиновые аналоги и другие, которые используются в качестве монотерапии или в сочетании с другими средствами для лучшего регулирования уровня глюкозы в крови [7]. К сожалению, большинство из них имеют заметные побочные эффекты и, более того, не способны предотвратить развитие диабетических осложнений. По всему миру фармакологи занимаются поиском альтернативных терапевтических подходов к этому метаболическому заболеванию [8].

Наряду с увеличением числа естественных флавоноидов с подтвержденной потенциальной антидиабетической активностью, механизмы воздействия этих веществ тщательно исследуются.

Воздействие флавоноидов на диабет было подробно изучено в рамках общего процесса метаболизма углеводов, а также их роли в комплексной сигнальной сети инсулинового действия. В последнее время был достигнут значительный прогресс в уменьшении воздействия натуральных продуктов на диабет, однако основные механизмы воздействия отдельных флавоноидов [9] можно кратко описать ниже, а информация о соответствующих флавоноидах приведена в таблице 1.

**Таблица 1.** Механизмы воздействия естественных флавоноидов для лечения диабета

| Флавоноиды | Механизм   |
|------------|--|
| Генистеин  | защита $\beta$ -клеток от повреждения [10];<br>Распространение островковых Бета-клетки [11];<br>стимуляция секреции инсулина [12];<br>сигналы инсулинового рецептора [13];<br>Ингибирование глюкоза 6-фосфатаза [14];<br>сокращение разрыва гликогена [15] |
| Даидзеин   | активация переноса глюкозы [16];<br>сокращение разрыва гликогена [15]  |
| Нарингенин | ингибирование $\alpha$ -глюко시다за [17].  |

Изофлавоны также признаются в качестве мягких антиоксидантов

Изофлавоны документированы исключительно в легиуминозе, самым богатым источником которого является соя. Другими источниками являются морепродукты, красный, белый, жевательные бобы и горошек, расщепленный горох, арахис, подсолнечник. Сырые соевые бобы могут содержать 1,2-4,2 мг изофлавонов на 1г сухого веса, в то время как высокопротеиновая соевая мука может содержать до 1,1-1,4 мг в грамме сухого веса.

Диеты, богатые соевыми бобами, используются для улучшения когнитивных способностей, профилактики остеопороза и различных видов рака, улучшения иммунной функции и поддержания здоровья женщин в период менопаузы, а также с целью подавить ХОГФ (CVD) путем снижения общего холестерина и холестерина ЛПНП (LDL) и повышения ЛПВП (HDL) в кровеносных сосудах. Однако изофлавоновое содержание соевых продуктов варьируется в зависимости от переработки.

Очищенный водой и спиртом концентрат соевых белков и соевые масла имеют

незначительные уровни изофлавонов [18].

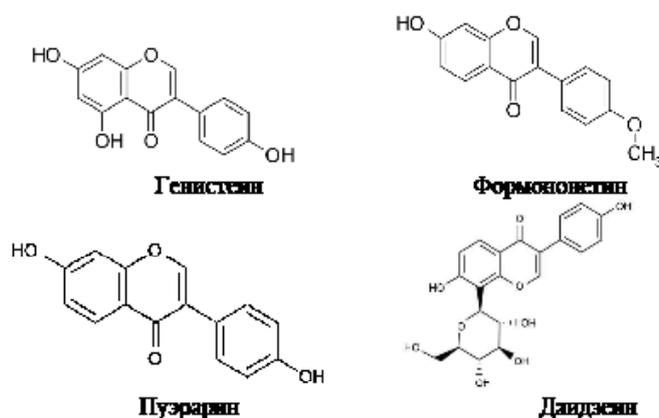
#### **Определение изофлавоноидов в растительном и пищевом сырье**

В настоящее время наибольшее распространение при анализе флавоноидов получили различные физико-химические и спектральные методы анализа, которые имеют ряд существенных преимуществ по сравнению, например, с гравиметрическими и титриметрическими методами, а именно быстрота и точность определения, обнаружение даже незначительных количеств и, что особенно важно, возможность определения отдельных флавоноидов в растительном сырье. К таким методам анализа относятся ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия, фотоэлектроколориметрия, денситометрия с использованием хроматографии на бумаге и в тонком (закрепленном и незакрепленном) слое сорбента. Бумажная хроматография, тонкослойная хроматография, колоночная хроматография используется как для очистки, так и для разделения смеси флавоноидов на отдельные компоненты [19].

## Оценка эффективности извлечения DES

Выбор подходящего типа DES имеет решающее значение для извлечения активных компонентов из растительных матриц. В этой работе были проверены подходящие NADES с соотношением компонентов 1:2 (Таблица 2). HBD и HBA были представлены лимонной кислотой и холинхлоридом, соответственно. Наблюдаются четкие различия в выходах четырех соединений. Кроме того, более высокие выходы соединений были получены с использованием нашего растворителя NADES по сравнению с другими растворителями, упомянутыми в литературе. Содержание даидзеина, генистеина, формонетина и биоханина А с использованием растворителя NADES со-

ставляло 0,017%, 0,013%, 0,095% и 0,019% соответственно, что также было выше, чем при использовании другого растворителя [20]. Предпочтительные выходы экстракции полярных соединений с использованием NADES в качестве растворителя, вероятно, были обусловлены его сильными мульти-взаимодействиями, включая ионный заряд и водородную связь с этими соединениями [21]. Следовательно, NADES можно рассматривать как эффективный растворитель для экстракции четырех вышеупомянутых соединений. Для дополнительного подтверждения эффективность экстракционного растворителя была исследована с использованием антиоксидантной активности и общего содержания полифенолов (TPC). Структурная формула соединений, выделенных из растений красного клевера.



## Выводы

1. В настоящем исследовании комбинация NADES, как многообещающих зеленых растворителей, с альтернативными инновационными методами, поддерживающими экстракцию с использованием ультразвука и подходящего процентного содержания воды, оказалась эффективной средой для извлечения изофлавонов из важного источника, такого как цветы красного клевера.

2. 180-минутное элюирование с градиентом NADES позволило отделить большинство коммерчески доступных изофлавонов, позволяя одновременное количественное

определение изофлавонов, присутствующих в цветках красного клевера, особенно наиболее распространенных, формонетина и биоханина А (анализ HPLC-DAD для цветков красного клевера). 20%-ный экстракт представляется более применимым для количественного определения изофлавонов, существующих в красном клевере.

3. Результаты анализа общего содержания полифенолов и антиоксидантов показали, что ДЭС с концентрацией воды 20% и 30% был наиболее эффективным. Последующая оптимизация экстракции изофлаво-

1. нов показала, что содержание воды в ДЭС может быть ключевой переменной, влияющей на выход при экстракции. Мы ожидаем, что результаты этого исследования могут способствовать установлению красного клевера в качестве сырья для получения естественных биоактивных изофла-

вонов и стимулировать потребление этих растений в качестве функциональной пищи и источника нутрицевтических соединений. Однако необходимы дополнительные исследования с использованием различных условий экстракции, таких как температура, ультразвуковая частота или временные интервалы.

### Список литературы

1. *G. Kroyer and N. Hegedus*, “Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 2, no. 3, pp. 171–174, 2001.
2. *Казаков А. Л., Джумырко С. Ф.* Хемотаксономическое изучение рода *Trifolium L* // *Растительные ресурсы*. – 1979. – Т. 15. – №. 3. – С. 344-355.
3. *Saviranta N. M. M. et al.* Red clover (*Trifolium pratense L.*) isoflavones: determination of concentrations by plant stage, flower colour, plant part and cultivar // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 2008 –Т. 88.–№. 1.–С. 125-132.
4. *Booth N. L. et al.* Seasonal variation of red clover (*Trifolium pratense L.*, Fabaceae) isoflavones and estrogenic activity // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – Т. 54. – №. 4. – С. 1277-1282. <https://www.healthbenefitstimes.com/red-clover/>
5. *Krenn L., Paper D. H.* Inhibition of angiogenesis and inflammation by an extract of red clover (*Trifolium pratense L.*) // *Phytomedicine*. – 2009. – Т. 16. – №. 12. – С. 1083-1088.
6. *Sazdanić D. et al.* Analysis of the factors influencing red clover (*Trifolium pratense L.*, Fabaceae) isoflavone content // *Biologia Serbica*. – 2019. – Т. 40. – №. 2.
7. *Zhang B. B., Moller D. E.* New approaches in the treatment of type 2 diabetes // *Current opinion in chemical biology*. – 2000. – Т. 4. – №. 4. – С. 461-467.
8. *Chen J. et al.* Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications // *Natural product communications*. – 2015. – Т. 10. – №. 1. – С. 1934578X1501000140.
9. *Zhang D. et al.* Kakkalide ameliorates endothelial insulin resistance by suppressing reactive oxygen species-associated inflammation // *Journal of diabetes*. – 2013. – Т. 5. – №. 1. – С. 13-24.
10. *Fu Z. et al.* Genistein ameliorates hyperglycemia in a mouse model of nongenetic type 2 diabetes // *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*. – 2012. – Т. 37. – №. 3. – С. 480-488.
11. *Fu Z. et al.* Genistein induces pancreatic  $\beta$ -cell proliferation through activation of multiple signaling pathways and prevents insulin-deficient diabetes in mice // *Endocrinology*. – 2010. – Т. 151. – №. 7. – С. 3026-3037.
12. *Liu D. et al.* Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway // *Diabetes*. – 2006. – Т. 55. – №. 4. – С. 1043-1050.
13. *Gao X. et al.* Positive and negative regulation of insulin action by genistein in the endothelium // *The Journal of nutritional biochemistry*. – 2013. – Т. 24. – №. 1. – С. 222-230.

14. *Lee J. S.* Effects of soy protein and genistein on blood glucose, antioxidant enzyme activities, and lipid profile in streptozotocin-induced diabetic rats //Life sciences. – 2006. – Т. 79. – №. 16. – С. 1578-1584.
15. *Park S. A. et al.* Genistein and daidzein modulate hepatic glucose and lipid regulating enzyme activities in C57BL/KsJ-db/db mice //Life sciences. – 2006. – Т. 79. – №. 12. – С. 1207-1213.
16. *Meezan E. et al.* Contrasting effects of puerarin and daidzin on glucose homeostasis in mice //Journal of agricultural and food chemistry. – 2005. – Т. 53. – №. 22. – С. 8760-8767.
17. *Zhang D. et al.* Kakkalide ameliorates endothelial insulin resistance by suppressing reactive oxygen species-associated inflammation //Journal of diabetes. – 2013. – Т. 5. – №. 1. – С. 13-24.
18. *Bultosa, G.* (2016). Functional Foods: Overview. Reference Module in Food Science. doi:10.1016/b978-0-08-100596-5.00071-8
19. *Coward L. et al.* Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing //The American journal of clinical nutrition. – 1998. – Т. 68. – №. 6. – С. 1486S-1491S.
20. *Chikezie P.C.*, Total phenolic contents and antioxidant potential of soya bean and maize and their beverages in vitro. Journal of Nutritional Disorders & Therapy. 2016; 6 (4) : 1000198 .
21. *Xu L, Kumar A, Lamb K, Layton L.* Production of an isoflavone concentrate from red clover flowers. Journal of food science. 2005 Oct;70(8):s558-62.