

УДК: 54-144

Бабеков Анарбай Ураимович

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

Исамидин кызы Айгүл

аспирант Ошского государственного
педагогического университета

Ковалева Елена Германовна

к.х.н., доцент Уральского федерального университета

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ИЗОФЛАВОНОВ, ИЗВЛЕЧЕННЫХ ИЗ КРАСНОГО КЛЕВЕРА

УЙ БЕДЕНИН КУРАМЫНАН АЛЫНГАН АР КАНДАЙ ИЗОФЛАВОНДОРДУН САНЫН АНЫКТОО

QUANTIFICATION OF VARIOUS ISOFLAVONES EXTRACTED FROM RED CLOVER

Аннотация. В данной статье описаны методы новой экологичной экстракции изофлавоноидов из цветков красного клевера, основанном на использовании глубоких эвтектических растворителей (NADES), состоящих из лимонной кислоты и хлорида холина, с одновременным извлечением сопутствующих биологически активных соединений. Приведены данные об анализе общего содержания полифенолов и антиоксидантов, включая изофлавоны, которые показывают, что NADES с 30%-ной концентрацией воды оказался наиболее эффективным для экстракции.

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

Аннотация. Бул макалада лимон кислотасынан жана холин хлоридинен турган терең эвтектикалык эриткичтерди (ВЭЖХ) колдонуунун негизинде уй беденин гүлүнөн биологиялык активдүү кошулмаларды экологиялык жактан таза экстракциялоо ыкмалары сүрөттөлөт. Полифенолдордун жана антиоксиданттардын, анын ичинде изофлавонодордун жалпы мазмунун талдоо боюнча маалыматтар келтирилген, бул экстракция үчүн 30% суунун концентрациясы бар ВЭЖХ эң натыйжалуу болгонун көрсөттү.

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

Abstract. This article describes methods of new ecological extraction of isoflavonoids from red clover flowers based on the use of deep eutectic solvents (NADES), consisting of citric acid and choline chloride are described, with simultaneous extraction of associated biologically active compounds. Data are given on. An analysis of the total polyphenols and antioxidants, including isoflavones, showed that NADES with a 30% water concentration was the most effective for extraction.

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

Насколько нам известно, это первое исследование, в котором сочетается использование DES и ультразвука для экстракции и количественного анализа биоханина А, формонетина и их гликозидных конъюгатов из красного клевера. До настоящего времени лишь в нескольких исследованиях NADES применяли при экстракции изофлавонов и соединений флавоноидов [1].

Хроматограмма ВЭЖХ в нашем исследовании, показывающая пики стандартов изофлавонов, используемых в текущем исследовании, была представлена на рисунке 1. NADES, основанный на растворе ChCl/лимонной кислоты, помогла нашей методике извлечь высокие выходы и концентрации изофлавонов из красного клевера. Поэтому мы решили использовать те же 2 компонента

с помощью ультразвука для извлечения целевых типов изофлавонов из красного клевера, как показано на рисунке 1.

Согласно полученным результатам, ультразвуковую экстракцию также использовали для экстракции четырех изофлавоноидов, как показано в 1 и 2. Полученные концентрации экстрагированных даидзеина, генистеина, формонетина и биоханина А составляли 0,17, 0,13, 0,95 и 0,19 мг/г DW (таблица 1). соответственно. Наиболее высокое содержание в образцах красного клевера среди изофлавонов показали формонетин и биоханин А. Таким образом, наши результаты в этом отношении соответствовали ранее полученным результатам. Формонетин и биоханин А составляют более 75% от общего количества изофлавонов, проанализированных в красном клевере (рис. 2).

Таблица 1. - Хроматографические данные стандартной площади пика, соответствующей содержанию изофлавонов в экстрактах

Изофлавоны	Пик	Содержание изофлавонов в экстракте			
		Пик	Время удерживания (мин)	Концентрация (мг/г экстракта)	% содержание
Даидзеин	236.9975	219.52	10.518	0.17	0.017
Генистин	276.2041	205.39	11.476	0.13	0.013
Формонетин	202.7583	1026.55	12.751	0.95	0.095
Биоханин А	257.2404	276.96	13.785	0.19	0.019
СУММА	973.2003	1728.42	48.53	1.44	0.144

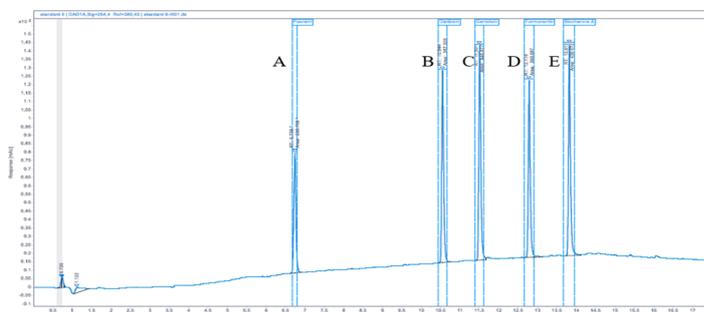


Рис. 1. Типичные ВЭЖХ-УФ хроматографические профили стандартных образцов, включая пуэрин (А), даидзеин (В), генистин (С), формонетин (D) и биоханин А (E)

Оптимизация условий и способов экстракции

Условия экстракции и анализа изофлавонов были оптимизированы для полу-

чения наибольшего выхода изофлавонов. Четыре компонента изофлавонов (даидзеин, генистеин, формонетин и биоханин А) были идентифицированы по времени

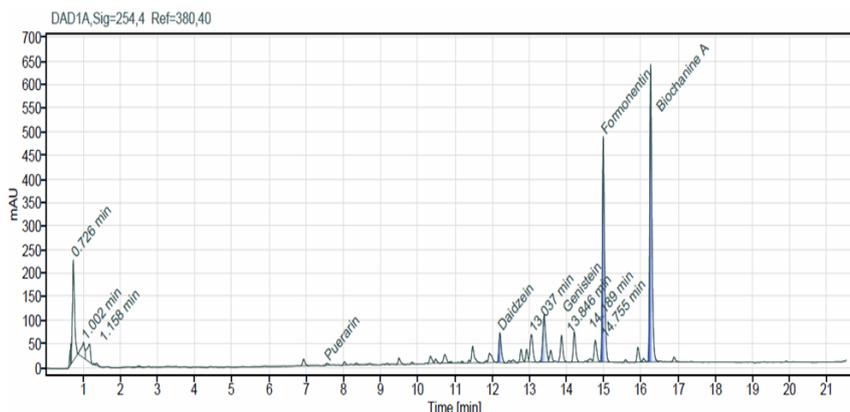


Рис. 3. Типичные ВЭЖХ-УФ хроматографические профили образца красного клевера

удерживания (10.518, 11.476, 12.751 и 13.785 минут соответственно) с выходом экстракции 3.4, 2.6, 19 и 3.8 соответственно. Эти результаты (28,8 мг/г DW) выше, чем результаты, зарегистрированные с использованием основного и кислотного гидролиза (8 мг/г), и ниже, чем результаты, полученные с использованием методов омыления и экстракции Гриффита и Коллисона (75 мг/г) [2]. Интересно, что наша процедура извлечения была более простой, дружелюбной к окружающей

среде и занимала меньше времени. Однако дальнейшие исследования могут быть более информативными при использовании различных условий экстракции с использованием этой новой методики.

Экспериментальные данные показали, что значения коэффициента детерминации (R²) для даидзеина, генистеина, формонетина и биоханина А превышают 0,9995 [Таблица 2]. Это указывает на то, что эта модель оптимизирована и применима для описания реакции эксперимента на четыре изофлавоноида.

Таблица 2. Уравнение регрессии, R² и выход экстракции изофлавоноидов

Изофлавоны	Уравнение регрессии	R ²	Выход экстракции (мг/г сухого веса)
Дайдазин	Y=236.9975 X + 9.2923	0.99995	3.4
Генестин	Y=276.2041X + 19.7115	0.99979	2.6
Формонетин	Y= 202.7583 X + 21.7709	0.99980	19
Биоханин А	Y= 256.2404 X + 13.2775	0.99983	3.8
СУММА	--	--	28.8

Определение степени поглощения DPPH радикалов

Процент поглотительного действия радикалов DPPH в зависимости от различного содержания воды в экстрактах красного клевера показан в таблице 3. Этот параметр был определен методом калибровочной кривой с использованием аскорбиновой

кислоты, как показано на рисунке 3. Было обнаружено, что эквивалентный антиоксидант [мг ASC / г] для всех экстрактов линейно зависел от содержания воды. При концентрации воды 30% экстракт красного клевера показал очистку от DPPH 92,34 ± 2,4%, а при концентрации воды 20% и 10 - 91,97 ± 0,98% удаления DPPH. Активность

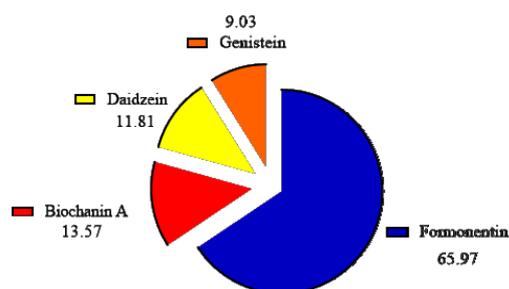


Рис. 3. Доля (%) формононетина, биоханина А, даидзеина и генистеина красного клевера

экстрактов по отношению к радикалу DPPH возрастала до порядка RC30 <K20 <K10, что позволило предположить, что процесс экстракции с использованием DES обладает сильным концентрирующим эффектом для компонентов, поглощающих радикалы. Как правило, экстракционная способность DES для биоактивных соединений из растений зависит от составов (типы акцептора водородной связи и донора водородной связи, молярное отношение и содержание воды) и физико-химических свойств (полярность, рН, вязкость и поверхностное натяжение) DES. [3]. Текущие результаты показали, что высокое содержание воды привело к более высокой активности по удалению DPPH по сравнению с экстрактами, имевшими более низкое содержание воды. Это означает, что DES имеют лучшее взаимодействие с менее вязкими изофлавоновыми соединениями в случае экстракта красного клевера. Это может быть объяснено меньшей вязкостью

DES при 30% содержании воды, приводящей к улучшенной экстрагируемости изофлавонов из красного клевера.

Определение общего выхода полифенолов

Общий выход полифенолов определяли в соответствии с эквивалентностью концентраций галловой кислоты. Общее содержание фенолов в экстрактах из красного клевера определяли с использованием анализа Фолина-Чокальтеу путем построения стандартной кривой с галловой кислотой (GA) с учетом взаимосвязи между поглощением и концентрацией. Калибровочная кривая, полученная из анализа стандарта (галловая кислота), была линейной (рис.5) с $y = 0,00262x + 0,1124$; $R^2 = 0,8173$. Используя уравнение, полученное из калибровочной кривой, установили, что вода RC30 показала самое высокое содержание фенола. Более низкий общий полифенол наблюдался при 20% DES, а затем 10% DES.

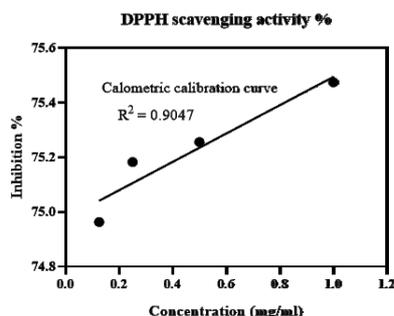


Рис. 5. Стандартная калибровочная кривая DPPH-аскорбиновая кислота для количественного определения поглотительной активности

Было обнаружено, что общее содержание фенолов в экстрактах, полученных из красного клевера, имеет тенденцию к увеличению

при более высокой концентрации воды в растворителях, используемых в качестве экстрагентов. Общее содержание фенолов

Таблица 3. Поглонительная активность, % и эквивалент аскорбиновой кислоты

Образец	RC10*	RC20*	RC30*
Поглощение %	89.19±1.25	91.97±0.98	92.34±2.4
Эквивалент антиоксиданта [мг/мл аскорбиновая кислота]	109.81 ±0.23	131.23±0.15	134.05 ±0.36

* RC10: красный клевер (10% воды), RC20: красный клевер (20% воды) RC30: красный клевер (30% воды)

в экстрактах было порядка 30% DES > 20% DES > 10% (Таблица 4).

Поскольку большинство фенольных соединений являются полярными, они были эффективно извлечены с высоким выходом растворителем с более высокой

полярностью. Это наблюдалось при более высокой концентрации воды. Различия в общем содержании фенола не были достаточно большими, чтобы рассматривать воду как влияющий параметр для общего содержания полифенолов.

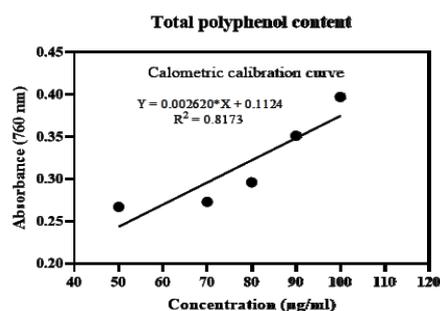


Рис. 5. Стандартная калибровочная кривая галловой кислоты для количественного определения общего содержания полифенолов

Корреляция между общим содержанием полифенолов (TPC) и активностью по удалению DPPH

В некоторых исследованиях сообщалось, что корреляция между общим содержанием полифенолов и анализом ABTS была сильнее, чем анализ DPPH, что согласуется с настоящим исследованием. Корреляционный анализ Пирсона, проведенный для оценки корреляции между TFC и антиоксидантной активностью (рисунок 6), выявил незначительный положительный коэффициент корреляции Пирсона ($r = 0,9402$, $p > 0,01$) между значениями TFC и результатами анализа DPPH, что указывает на присутствие специфических активных изофлавонов в растворе DES, которые могут оказывать существенное влияние на активность по

удалению свободных радикалов DPPH. В соответствии с данными, полученными для выходов изофлавонов, анализы по удалению свободных радикалов DPPH выявили самую высокую антиоксидантную способность и самую высокую TPC в экстрактах, полученных с использованием DES, содержащих 30% воды.

Выводы

1. Установлено, что наибольший выход изофлавоноидов даидзеина, генистеина, формонетина и биоханина А достигнут при их экстрагировании из цветков красного клевера смесью глубоких эвтектических растворителей (NADES) на основе хлорида холина и лимонной кислоты при соотношении вес цветков (г): NADES (мл) 1:20, при 20%-ном содержании H₂O в

Таблица 4. Общее содержание фенолов (мкг / мл в эквиваленте GA)

Образец	RC10*	RC20*	RC30*
Эквивалент галловой кислоты [мкг GA/г]	85.47 ±0.78	90.27±0.65	91.65 ±0.39

* RC10: красный клевер (10% воды), RC20: красный клевер (20% воды) RC30: красный клевер (30% воды)

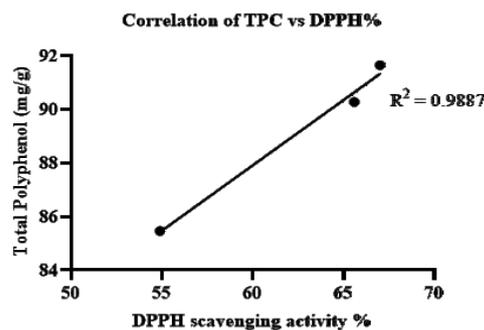


Рис. 6. Анализ корреляции Пирсона между TFC и антиоксидантной активностью

NADES, при воздействии ультразвука в течение 3 ч при температуре 60⁰ С.

2. Содержание формонетина (40,5 %) и биоханина А (45,3 %) в исследуемом природном материале было наибольшим

среди всех идентифицированных изофлавоноидов.

3. Наибольшая антиоксидантная активность и общее содержание полифенолов обнаружены при экстрагировании этих веществ с помощью NADES с содержанием воды 20% и 30% .

Литература

1. Wei Z, Zu Y, Fu Y, Wang W, Luo M, Zhao C, Pan Y. Ionic liquids-based microwave-assisted extraction of active components from pigeon pea leaves for quantitative analysis. Separation and Purification Technology. 2013 Jan 4;102:75-81.
2. Huang J, Guo X, Xu T, Fan L, Zhou X, Wu S. Ionic deep eutectic solvents for the extraction and separation of natural products. Journal of Chromatography A. 2019 Mar 30.
3. Delmonte P, Perry J, Rader JJ. Determination of isoflavones in dietary supplements containing soy, Red Clover and kudzu: extraction followed by basic or acid hydrolysis. Journal of Chromatography A. 2006 Feb 24;1107(1-2):59-69.