

УДК 615.322;582.736

ПЕРЕРАБОТКА ШРОТА КОРНЯ СОЛОДКИ. II. ТРИТЕРПЕНОИДНЫЕ И ФЛАВОНОИДНЫЕ ВЕЩЕСТВА ЭТАНОЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ*

© В.Р. Хабибрахманова**, Ш.М. Халед, А.Р. Габдрахманова, М.А. Сысоева

Казанский национальный исследовательский технологический университет,
ул. К. Маркса, 68, Казань, 420015 (Россия), e-mail: venha@rambler.ru

Проведен подбор условий экстракции шрота корня солодки этанолом для максимального извлечения из него тритерпеноидных и флавоноидных соединений. Исследована зависимость выхода экстрактивных веществ от параметров экстракции (концентрация экстрагента, соотношение шрот : экстрагент, кратность и время экстракции). Установлено, что наибольший выход флавоноидов (4,76%) и глицирризиновой кислоты (0,91%) может быть получен при экстракции шрота кипячением с 80% этанолом при соотношении 1 : 40 в три стадии по 2 ч. Показано, что дополнительное измельчение шрота и его фракционирование позволяют интенсифицировать процесс извлечения флавоноидов и глицирризиновой кислоты. По сравнению с экстракцией исходного шрота из фракции может быть получено сопоставимое количество флавоноидов (4,66%) и глицирризиновой кислоты (0,88%) при кипячении с 80% этанолом с сокращением времени экстракции до 1 ч.

С использованием инструментальной тонкослойной хроматографии «САМАГ» показано наличие в анализируемых экстрактах до 14 флавоноидных соединений, среди которых преобладают ликвиритигенин и формонетин.

Ключевые слова: корень солодки, шрот, глицирризиновая кислота, флавоноиды, углеводы.

Введение

Корень солодки является ценным лекарственным сырьем. Препараты на его основе обладают широким спектром биологической активности, проявляя противовоспалительное, отхаркивающее, иммуномодулирующее, противоязвенное, противоопухолевое и другие виды действия [1]. Основными биологически активными веществами корня солодки являются тритерпеноидные соединения, главным образом глицирризиновая кислота и флавоноиды, содержание которых составляет до 25 и 5% от сырья соответственно [1, 2].

Существующая технология промышленной переработки корня солодки на фармацевтических предприятиях не позволяет извлекать из сырья всю сумму биологически активных веществ. Ранее нами был исследован шрот корня солодки, полученный при производстве лекарственного средства «Сироп корня солодки» на ОАО «Татхимфармпрепараты», г. Казань. Показано, что его экстракция 0,25% раствором гидроксида аммония позволяет извлечь 23% экстрактивных веществ, в том числе 2,8% глицирризиновой кислоты. Также в анализируемом экстракте содержится значительное количество углеводов и аминокислот [3]. Таким образом, шрот корня солодки является перспективным объектом для дальнейшей переработки. На основе фракций биологически активных веществ, извлекаемых из шрота, могут быть разработаны новые лекарственные средства и/или увеличен выпуск уже существующих препаратов.

Шрот корня солодки обеднен веществами, хорошо растворимыми в 0,25% растворе гидроксида аммония. Поэтому для получения биологически активных веществ из шрота наиболее целесообразным является его экстракция органическими растворителями, в первую очередь этанолом. Анализ литературных данных показал, что экстракция сырья корня

Хабибрахманова Венера Равиловна – кандидат химических наук, доцент кафедры пищевой биотехнологии, e-mail: venha@rambler.ru

Халед Шади Мунир – аспирант,
e-mail: Shadi-pharm80@hotmail.com

Габдрахманова Алия Рафитовна – магистрант,
e-mail: bananzru1993@gmail.com

Сысоева Мария Александровна – доктор химических наук, заведующая кафедрой пищевой биотехнологии,
e-mail: oxygen1130@mail.ru

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcrpm.2016021121s.

** Автор, с которым следует вести переписку.

солодки этанолом, в зависимости от его концентрации и параметров проведения процесса, позволяет извлечь 4–12% экстрактивных веществ. Получаемые экстракты содержат в основном тритерпеноиды, углеводы и различные классы фенольных соединений [4, 5].

Экстракция этанолом шрота корня солодки ранее не проводилась. В связи с этим актуальной задачей является определение оптимальных условий экстракции шрота этанолом, что позволит максимально извлечь из него ценные биологически активные соединения.

Цель работы – подбор условий экстракции шрота корня солодки этанолом для максимального извлечения из него тритерпеноидных, флавоноидных соединений и исследование их состава.

Экспериментальная часть

Объектом исследования является шрот корня солодки – отход производства при получении лекарственного средства «Сироп корня солодки» на ОАО «Татхимфармпрепараты», Казань. Экстракцию шрота этанолом проводили кипячением в круглодонной колбе с обратным водяным холодильником при различных условиях процесса. Содержание экстрактивных веществ определяли весовым методом [6]. Количественное определение суммы углеводов осуществляли спектрофотометрическим методом с применением антронового реактива (стандарт – глюкоза) [7]. Содержание общей суммы флавоноидов определяли спектрофотометрическим методом, измеряя оптическую плотность продуктов комплексообразования с хлоридом алюминия [8]. В качестве стандарта использовали ликвиритигенин («SIGMA–ALDRICH», CAS 578-86-9). Качественный состав экстрактов анализировали методом инструментальной тонкослойной хроматографии (лабораторный комплекс «САМАГ») на пластинах ПТСХ-АФ-А-УФ «Sorbfil» в системе растворителей: этилацетат – муравьиная кислота – уксусная кислота – вода (15 : 1 : 1 : 2). В качестве проявителя применяли 10% раствор H_2SO_4 в метаноле. Денсиметрическую обработку хроматограммы осуществляли при длине волны 254 нм до и после проявления. Количественное определение глицирризиновой кислоты осуществляли по площади пятна на хроматограмме с применением градуировочного графика, построенного по растворам стандарта глицирризиновой кислоты («ACROS ORGANICS», CAS 53956-04-0) [9].

Микроскопический анализ фракций шрота осуществляли на видеомикроскопе «MC 100 (LDC)» при увеличениях 4x, 10x. Препараты для микроскопии готовили согласно [10]. Для обнаружения глицирризиновой кислоты применяли качественную реакцию с 80% раствором H_2SO_4 , для флавоноидов – 1% раствор хлорида железа [10].

Для обработки экспериментальных данных использовали программный пакет «Statistica 6.0».

Обсуждение результатов

Известно, что состав соединений, извлекаемых этанолом из корня солодки, главным образом зависит от его концентрации. Например, показано, что при использовании 96% этанола преимущественно извлекаются гидрофобные агликоны флавоноидов, а при снижении концентрации спирта в составе экстракта начинают преобладать гликозидные формы флавоноидов. Кроме того, эти экстракты содержат в качестве сопутствующих соединений углеводы, в том числе полисахариды [4, 5].

Проведена исчерпывающая экстракция шрота корня солодки при подобранных параметрах [7]: кипячение в течение 2 ч с этанолом различной концентрации в соотношении шрот : экстрагент 1 : 40. Показано, что независимо от концентрации этанола максимальный выход экстрактивных веществ из шрота достигается за три стадии. При этом, как видно из таблицы 1, наибольший выход экстрактивных веществ из шрота – около 15% – наблюдается при его экстракции 40% этанолом. При использовании в качестве экстрагента 70, 80 и 96% спирта выход экстрактивных веществ ниже на 8–37%.

Таблица 1. Содержание и состав экстрактивных веществ в этанольных экстрактах из шрота корня солодки (n = 5)

Экстракт из шрота корня солодки:	Содержание, % от шрота			
	экстрактивных веществ	флавоноидов*	суммы углеводов	глицирризиновой кислоты
40% этанолом	15,06±0,21	0,89±0,12	9,93±0,21	0,35±0,02
70% этанолом	11,98±0,11	2,90±0,07	5,31±0,16	0,86±0,01
80% этанолом	13,88±0,21	4,76±0,09	5,65±0,06	0,91±0,02
96% этанолом	9,42±0,12	3,74±0,13	3,14±0,29	0,51±0,03

* в пересчете на ликвиритигенин.

Анализ состава экстрактивных веществ в полученных экстрактах показал, что с увеличением концентрации этанола в экстрагенте в них возрастает содержание флавоноидов в 5,3 раза, и при этом снижается содержание сопутствующих веществ – углеводов – в 3,2 раза.

На основании полученных данных для экстракции шрота корня солодки целесообразным является применение в качестве экстрагента 80% этанола, позволяющего извлечь максимальное количество флавоноидов и глицирризиновой кислоты.

Качественный состав этанольных экстрактов из шрота корня солодки проанализирован методом инструментальной тонкослойной хроматографии на лабораторном комплексе «САМАГ». Показано, что данные экстракты, вне зависимости от концентрации этанола в экстрагенте, содержат до 14 соединений (табл. 2).

С использованием стандарта подтверждено наличие глицирризиновой кислоты во всех экстрактах и проведено ее количественное определение путем денситометрической обработки хроматограммы. Как видно из данных таблицы 1, экстракция шрота 80% этанолом позволяет получить максимальное количество не только флавоноидов, но и глицирризиновой кислоты – 0,91%. Следовательно, эту концентрацию экстрагента следует считать оптимальной для экстракции шрота с целью максимального извлечения из него тритерпеноидных и флавоноидных соединений.

Все остальные соединения, обнаруженные на хроматограмме, по специфической окраске могут быть отнесены к разным классам флавоноидов [11]. С использованием стандарта подтверждено наличие во всех экстрактах ликвиритигенина. На его основе разработан «Ликвиритон», получаемый из корня солодки [8]. Также стоит отметить, что во всех экстрактах преобладает соединение с $R_f = 0,92$. Анализ литературных данных по исследованию флавоноидов корня солодки [4], а также использование специфического окрашивающего реактива (раствор H_2SO_4 в метаноле) позволили отнести это соединение к изофлавану – формонентину. Известно, что этот агликон обладает антиоксидантной, гиполлипидемической, эстрогенной и другими видами биологической активности [1, 2].

Исчерпывающая экстракция шрота корня солодки занимает 6 ч (три стадии по 2 ч). Для сокращения продолжительности процесса проведена экстракция шрота при кипячении в течение 1 ч с 80% этанолом и в соотношении шрот : экстрагент – 1 : 40, 1 : 50, 1 : 60, 1 : 80, 1 : 100. Показано, что наибольший выход экстрактивных веществ – 10,9% – наблюдается при использовании соотношения 1 : 100. В сравнении с исчерпывающей экстракцией полученный выход экстрактивных веществ в 1,3 раза меньше. Это свидетельствует о том, что на увеличение выхода экстрактивных веществ влияет продолжительность экстракции шрота.

Таблица 2. Описание хроматограмм анализа этанольных экстрактов из шрота корня солодки

R_f пятна	Окраска пятен на хроматограмме анализа экстрактов из шрота корня солодки:				Отнесение
	40% этанолом	70% этанолом	80% этанолом	96% этанолом	
0,05	темно-коричневая	темно-коричневая	темно-коричневая	темно-коричневая	–
0,09–0,11	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	–
0,13–0,14	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	–
0,17–0,18	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	–
0,20	желтая	–	–	–	–
0,22–0,25	светло-розовая	светло-розовая	светло-розовая	светло-розовая	глицирризиновая кислота*
0,31–0,33	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	–
0,41–0,42	–	ярко-желтая	ярко-желтая	ярко-желтая	–
0,44–0,45	ярко-желтая	ярко-желтая	ярко-желтая	ярко-желтая	–
0,61	светло-коричневая	–	–	–	–
0,64	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	светло-коричневая	–
0,71	светло-коричневая	–	–	–	–
0,83	желтая	желтая	желтая	желтая	ликвиритигенин**
0,92	красно-коричневая***	красно-коричневая***	красно-коричневая***	красно-коричневая***	формонентин [11]

* идентификация путем сопоставления окраски и R_f пятна стандарта глицирризиновой кислоты;

** идентификация путем сопоставления окраски и R_f пятна стандарта ликвиритигенина;

*** очень высокая интенсивность окраски пятна.

Тритерпеноидные и флавоноидные соединения в корне солодке локализируются преимущественно в верхнем пробковом слое, и, соответственно, их значительная часть уже была извлечена в ходе промышленной переработки сырья. Часть этих соединений содержится в сердцевинных лучах корня [1]. Поэтому для повышения их доступности к извлечению проведено измельчение шрота. При просеивании были получены две фракции, сильно различающиеся по морфологии: фракция 1 – преимущественно тонкие волокна; фракция 2 – тонкодисперсный порошок с размером частиц менее 2 мм. Проведен микроскопический анализ полученных фракций. По качественной реакции с 80% раствором H_2SO_4 и 1% раствором хлорида железа показано, что фракция 2 в большем количестве содержит глицирризиновую кислоту и флавоноиды (электронное приложение). В связи с этим проведена исчерпывающая и одностадийная экстракция фракции 2 80% этанолом при соотношении фракция 2 : экстрагент 1 : 40 и 1 : 100. Результаты анализа полученных экстрактов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Содержание и состав экстрактивных веществ в этанольных экстрактах фракции 2 (n=5)

Экстракт фракции 2, полученный при соотношении	Содержание, % от шрота			
	экстрактивных веществ	флавоноидов*	суммы углеводов	глицирризиновой кислоты
Исчерпывающая экстракция				
1 : 40	14,00±0,21	2,04±0,05	3,90±0,06	0,56±0,01
1 : 100	14,09±0,22	1,70±0,14	6,06±0,31	0,46±0,03
Одностадийная экстракция				
1 : 40	10,73±0,15	3,52±0,08	3,32±0,05	0,88±0,02
1 : 100	10,93±0,51	4,66±0,60	3,87±0,22	0,62±0,01

* в пересчете на ликвиритигенин.

Экстракты, полученные исчерпывающей экстракцией фракции 2, выделенной из шрота, содержат больше на 3,4% экстрактивных веществ по сравнению с экстрактами, полученными одностадийной экстракцией (табл. 3). Однако в последних наблюдается на 3,0% больше флавоноидов и 0,4% глицирризиновой кислоты, и в то же время меньше на 2,7% балластных веществ в виде углеводов. Полученные результаты подтверждают результаты микроскопического исследования шрота.

Сопоставляя результаты, приведенные в таблицах 1 и 3, можно сделать вывод о том, что дополнительное измельчение шрота позволяет получить экстракт с содержанием флавоноидов и глицирризиновой кислоты близко к тем значениям, которые получены при исчерпывающей экстракции шрота. Таким образом, проведение экстракции фракции 2 в течение 1 ч позволяет сократить время проведения процесса в 6 раз, снизить расход экстрагента в 1,5–3 раза и, соответственно, энергозатраты для извлечения флавоноидов и глицирризиновой кислоты из шрота корня солодки.

Анализ качественного состава экстрактов фракции 2 методом инструментальной тонкослойной хроматографии показал, что, в отличие от экстрактов из шрота, в них содержится меньше фенольных веществ. На хроматограмме отсутствуют пятна с R_f , равным 0,20; 0,12–0,14; 0,17–0,18; 0,41–0,42, 0,44–0,45. Основными флавоноидами в полученных экстрактах являются ликвиритигенин и формонетин.

С использованием стандарта подтверждено наличие глицирризиновой кислоты во всех экстрактах из фракции 2. Проведено количественное определение глицирризиновой кислоты путем денситометрической обработки хроматограммы (табл. 3). По-видимому, длительное температурное воздействие при исчерпывающей экстракции фракции 2 приводит к разрушению части глицирризиновой кислоты, так как ее содержание в экстракте в 1,6 раза ниже по сравнению с экстрактом, полученным одностадийной экстракцией фракции 2.

Таким образом, на основе полученных данных показано, что для извлечения флавоноидов и глицирризиновой кислоты из шрота корня солодки эффективно проводить одностадийную экстракцию измельченного шрота (фракция 2) 80% этанолом. Однако для получения высокого выхода флавоноидов целесообразно использовать соотношение измельченный шрот : экстрагент 1 : 100, а для высокого выхода глицирризиновой кислоты – соотношение 1 : 40.

Выводы

1. Подобраны оптимальные условия экстракции шрота корня солодки этанолом, позволяющие дополнительно получить 4,66% флавоноидов и 0,88% глицирризиновой кислоты.

2. Определен качественный состав веществ, извлекаемых из шрота этанолом. Установлено, что среди них преобладают флавоноиды (ликвиритигенин, формонетин) и глицирризиновая кислота.

Список литературы

1. Толстикова Г.А., Балатина Л.А., Гранкина В.П., Кондратенко Р.М., Толстикова Т.Г. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск, 2007. 311 с.
2. Оболенцева Г.В., Литвиненко В.И., Аммосов А.С. Фармакологические и терапевтические свойства препаратов солодки // Химико-фармацевтический журнал. 1999. Т. 33, №8. С. 24–31.
3. Халед Ш.М., Голубина Е.И., Хабибрахманова В.Р., Сысоева М.А. Переработка шрота корня солодки. I. Анализ экстрактивных веществ // Вестник Казанского технологического университета. 2014. Т. 17, №14. С. 426–427.
4. Денисова С.Б. Жидкостно-твердофазная экстракция основных классов биологически активных веществ корня солодки : дис. ... канд. хим. наук. Уфа, 2000. 166 с.
5. Гагиева Л.Ч., Ваниев А.Г., Габеев В.Н., Цугкиев Б.Г., Макиев О.Н. Определение технологических параметров получения жидкого экстракта из солодки голой // Известия Горского государственного аграрного университета. 2011. Т. 48, №2. С. 266–268.
6. Северин С.Е., Соловьева Г.А. Практикум по биохимии. М., 1989. 509 с.
7. Ермаков А.И., Арасимович В.В., Смирнова-Иконникова М.И. и др. Методы биохимического анализа растений. Ленинград, 1972. 456 с.
8. Бибикова Н.Е. Комплексная технология переработки корня солодки : автореф. дис. ... канд. фарм. наук. М., 1999. 24 с.
9. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. 1st edition. New-York, 2006. 280 p.
10. Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С. Практикум по фармакогнозии. Харьков, 2003. 512 с.
11. Коруткин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычкина Р.А., Толстикова Г.А. Природные флавоноиды. Новосибирск, 2007. 232 с.

Поступило в редакцию 7 февраля 2016 г.

После переработки 13 апреля 2016 г.

*Khabibrakhmanova V.R.**, *Khaled S.M.*, *Gabdrakhmanova A.R.*, *Sysoeva M.A.* PROCESSING OF LICORICE ROOT MEAL. II. TRITERPENOIDS AND FLAVONOIDS OF ETHANOLIC EXTRACTS

Kazan State Technological University, ul. Karla Marxa, 68, Kazan, 420015 (Russia), e-mail: venha@rambler.ru

The selection of extraction conditions of licorice root meal with ethanol to remove maximum of triterpenoids and flavonoids was conducted. The study of yield of extractive substances depending on the extraction parameters (concentration of extracting agent, licorice root meal:extracting agent ratio, frequency and time of extraction) was carried out. It was found that maximum yield of flavonoids (4,76%) and glycyrrhizinic acid (0,91%) can be obtained during boiling of licorice root meal with 80% ethanol at 1 : 40 ratio in 3 stages for 2 hours. It was shown that additional milling of licorice root meal and its fractionation can intensify the process of flavonoids and glycyrrhizinic acid extraction. In comparison with extraction of initial licorice root meal comparable amount of flavonoids (4,66%) and glycyrrhizinic acid (0,88%) can be obtained using boiling with 80% ethanol and reduced extraction time 1 hour.

Using thin layer chromatography complex «CAMAG» allowed to show presence up to 14 flavonoids in extracts. Liquiritigenin and formononetin were predominate flavonoids in analyzed extracts.

Keywords: licorice root, meal, glycyrrhizinic acid, flavonoids, carbohydrates.

Reference

1. Tolstikov G.A., Balatina L.A., Grankina V.P., Kondratenko R.M., Tolstikova T.G. *Solodka: bioraznoobrazie, khimiia, primeneniye v meditsine*. [Licorice: biodiversity, chemicals, medical applications]. Novosibirsk, 2007, 311 p. (in Russ.).
2. Obolentseva G.V., Litvinenko V.I., Ammosov A.S. *Khimiko-farmatsevticheskii zhurnal*, 1999, vol. 33, no. 8, pp. 24–31. (in Russ.).
3. Khaled Sh.M., Golubina E.I., Khabibrakhmanova V.R., Sysoeva M.A. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2014, vol. 17, no. 14, pp. 426–427. (in Russ.).
4. Denisova S.B. *Zhidkostno-tverdogaznaia ekstraktsiia osnovnykh klassov biologicheskii aktivnykh veshchestv kornia solodki : dis. ... kand. khim. nauk*. [Liquid-solid phase extraction of the main classes of bioactive substances of licorice root: diss. cand. chem. sciences]. Ufa, 2000, 166 p. (in Russ.).
5. Gagieva L.Ch., Vaniev A.G., Gabeev V.N., Tsugkiev B.G., Makiev O.N. *Izvestiia Gorskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*, 2011, vol. 48, no. 2, pp. 266–268. (in Russ.).
6. Severin S.E., Solov'eva G.A. *Praktikum po biokhimi*. [Biochemistry Workshop]. Moscow, 1989, 509 p. (in Russ.).
7. Ermakov A.I., Arasimovich V.V., Smirnova-Ikonnikova M.I. i dr. *Metody biokhimicheskogo analiza rastenii*. [Methods of biochemical analysis of plants]. Leningrad, 1972, 456 p. (in Russ.).
8. Bibikova N.E. *Kompleksnaia tekhnologiya pererabotki kornia solodki : avtoref. dis. ... kand. farm. nauk*. [Complex technology of licorice root: Abstract. Dis. Cand. Pharm. sciences]. Moscow, 1999, 24 p. (in Russ.).
9. Reich E., Schibli A. *High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. 1st edition*. New-York, 2006. 280 p.
10. Kovalev V.N., Popova N.V., Kislichenko V.S. *Praktikum po farmakognozii*. [Workshop on Pharmacognosy]. Khar'kov, 2003, 512 p. (in Russ.).
11. Korul'kin D.Iu., Abilov Zh.A., Muzychkina R.A., Tolstikov G.A. *Prirodnye flavonoidy*. [Natural flavonoids]. Novosibirsk, 2007. 232 p. (in Russ.).

Received February 7, 2016

Revised April 13, 2016

* Corresponding author.