

УДК 66.061.34 + 582.982 + 547.814.5

ЭКСТРАКЦИЯ *C,O*-ГЛИКОЗИЛФЛАВОНОВ ИЗ ЗЕЛЕННЫХ ОТХОДОВ *CUCUMIS SATIVUS* ГЛУБОКИМИ ЭВТЕКТИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ

Д.Н. Оленников, Н.И. Кащенко, К.В. Маркова

ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия

Зеленые отходы тепличного производства огурцов (*Cucumis sativus* L.) содержат различные метаболиты, в том числе флавоноиды из группы *C,O*-гликозилфлавонов, обладающих биологической активностью. В настоящей работе приводятся результаты разработки способа экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* с применением глубоких эвтектических растворителей (DES), среди которых наиболее эффективным оказалась смесь холина хлорид – дипропиленгликоль – вода. Определены оптимальные условия ультразвукового воздействия, состава DES, соотношения сырье:экстрагент и других параметров на эффективность извлечения флавоноидов из растительного сырья. После твердофазной экстракции на макропористой смоле Amberlite XAD-2 получена сумма флавоноидов, содержащая различные *C,O*-гликозилфлавоны с суммарным содержанием 876.07 мг/г. Проведенные исследования впервые показали эффективность DES для экстракции флавоноидов из зеленых отходов *C. sativus*.

Ключевые слова: огурец посевной, сельскохозяйственные отходы, глубокие эвтектические растворители, флавоноиды, *C,O*-гликозилфлавоны.

Глубокие эвтектические растворители (DES) представляют собой новый класс аналогов ионных жидкостей, используемых для извлечения различных соединений из природных матриц и состоящих из акцепторов (HBA) и доноров водородных связей (HBD) [1]. Как растворители для экстракции DES обладают преимуществами в эффективности извлечения, меньшем времени экстракции, низкой стоимости, отсутствии токсичности, биоразлагаемости и улучшенной чистоты продукта, что в результате предполагает широкий спектр их применения [2]. В настоящее время методы, применяющие DES, широко исследуются для извлечения флавоноидов из растительного сырья [3].

Зеленые отходы тепличных хозяйств являются в большинстве своем неиспользуемым побочным материалом, появляющимся при производстве пищевой продукции. Утилизация вегетативных частей растений в сельском хозяйстве проводится в результате компостирования, что не позволяет использовать потенциал биологически активных соединений, которые часто обладают значительно большей экономической привлекательностью в отличие от органических удобрений. Одной из наиболее часто выращиваемых тепличных культур является огурец посевной (*Cucumis sativus* L.) семейства Cucurbitaceae, мировая продукция зеленых отходов от производства которого может достигать до 1 млн. т/год. Зеленые части *C. sativus* являются источником различных флавоноидов, среди которых доминируют *C,O*-гликозилфлавоны, обладающие ингибирующим действием на панкреатическую липазу человека и рассматриваемые в качестве потенциальных терапевтических и лекарственных агентов для лечения заболеваний, связанных с нарушением обмена липидов [4–8]. Ранее DES не применялись для экстракции флавоноидов из *C. sativus*, в связи с чем целью настоящей работы является разработка методики экстракции суммы *C,O*-гликозилфлавонов из зеленых отходов огурца посевного с применением DES.

Листья *C. sativus* (сорт Маша F1) были собраны в экспериментальном тепличном хозяйстве ИОЭБ СО РАН (Республика Бурятия, Россия) и высушены при 45°C до влажности ≤5% в конвекционном сушильном шкафу. Профилирование и количественный анализ экстрактов осуществляли с помощью высокоэффективной хроматографии с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детектированием с ионизацией электрораспылением (ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС) на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), используя

колонку ReproSil-Pur 120 C18-AQ (250 мм × 4,6 мм × 5 мм; Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Germany) и условия анализа описанные ранее [4, 7]

Для создания DES применяются различные комбинации НВА и НВД из возобновляемых, недорогих и легкодоступных ресурсов. В настоящей работе в качестве НВА использовался холина хлорид, являющийся наиболее распространенным компонентом DES, а как НВД использовались различные доступные типы диолов и полиолов (глицерин = Гл, ксилит = Кс, сорбитол = Со, мальтит = Ма, 1,2-этанジオл = ЭтД, 1,3-пропандиол = ПрД, 1,4-бутандиол = Буд, 1,5-пентандиол = ПеД, 1,6-гександиол = ГеД, дипропиленгликоль = ДППГ), в связи с их меньшей вязкостью по сравнению с DES, содержащими карбоновые кислоты или сахара. Молярное соотношение компонентов в DES было 1:1. Применение трех методов экстракции травы *C. sativus* – перемешивание при комнатной температуре, нагревание на водяной бане, ультразвуковая экстракция (УЗЭ), показало, что наиболее эффективным извлечением флавоноидов обладала смесь холина хлорид – дипропиленгликоль в условиях УЗЭ (рис. 1).

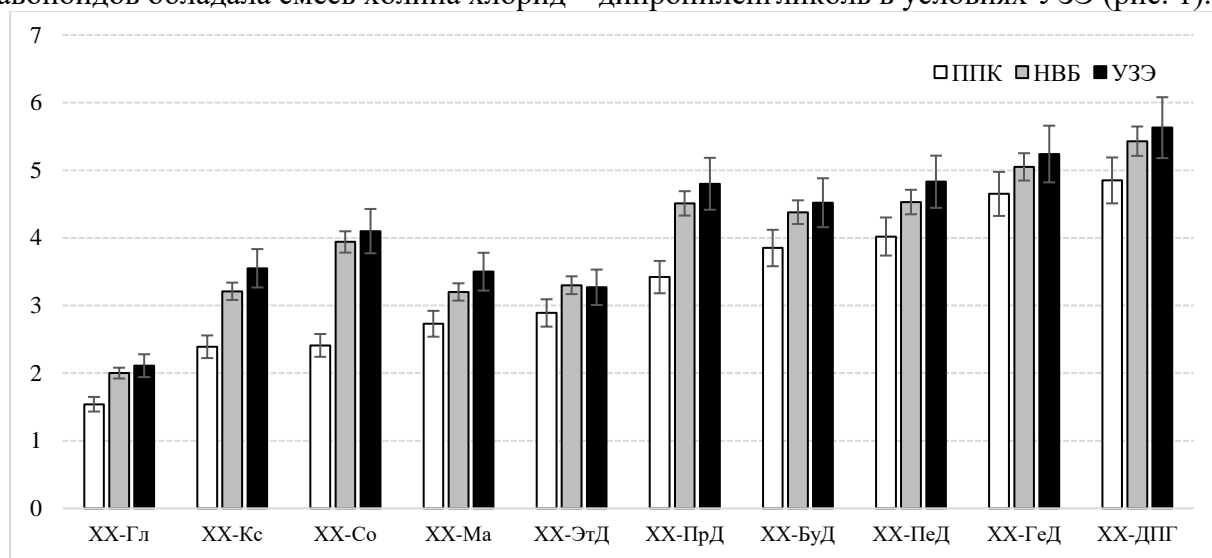


Рис. 1. Эффективность экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* различными DES в условиях перемешивания при комнатной температуре (ППК), нагревания на водяной бане (НВБ, 50°C) и ультразвуковой экстракции (УЗЭ, 50°C). По оси абсцисс – тип экстрагента, по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Очевидно, что на результативность экстракции влияла природа компонентов НВД, особенно это касалось DES на основе диолов, которые были наиболее эффективными для извлечения флавоноидов. Следует отметить, что с увеличением длины углеродной цепи C2 до C6 выход флавоноидов возрастал, что, вероятно, связано с повышенной гидрофобностью НВД.

Возрастание мощности ультразвука с 20 Вт до 450 Вт приводило к повышению выхода флавоноидов (рис. 2а). При большей мощности ультразвука скорость молекулярных колебаний была выше, а межмолекулярные взаимодействия усиливались, что способствовало растворению флавоноидов. Однако дальнейшее повышение мощности ультразвука негативно отражалось на экстракции флавоноидов, что было обусловлено влиянием высокочастотных вибраций на сетчатую структуру, образующуюся внутри DES, приводя к нестабильности, а сильный кавитационный эффект разрушал флавоноиды, тем самым снижая способность экстрагировать целевые соединения из фитоматрицы.

Оптимизация соотношения НВА-НВД в DES имеет решающее значение для повышения скорости экстракции флавоноидов из растительного сырья. Учитывая это была изучена способность к экстракции смесей смесь холина хлорид – дипропиленгликоль с соотношением от 2:1 до 1:8 (рис. 2б). В результате было отмечено, что до соотношения 1:4 скорость извлечения общего количества флавоноидов сначала увеличивалась, а затем снижалась. Причиной этого явления может быть то, что снижение содержания холина хлорида приводило к снижению вязкости и поверхностного натяжения DES, тем самым улучшая эффекты диффузии и массопереноса.

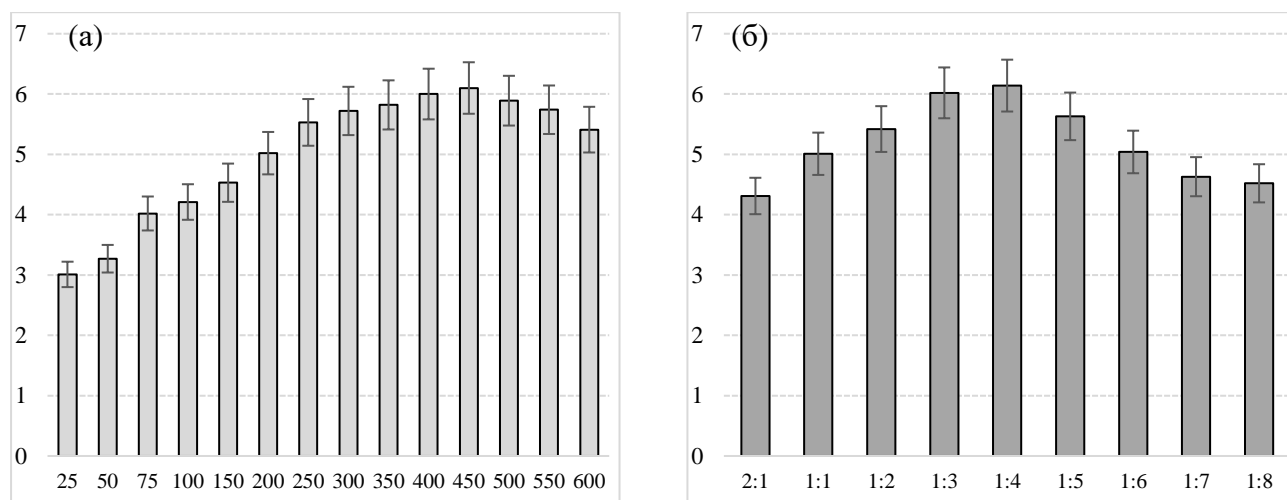


Рис. 2. Влияние мощности ультразвука (а) и соотношения холина хлорид – дипропиленгликоль (б) на выход флавоноидов из травы *C. sativus*. По оси абсцисс – мощность, Вт (а) / соотношение холина хлорид – дипропиленгликоль (б); по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Большинство DES имеют относительно высокую вязкость при комнатной температуре, тем самым негативно влияя на межмолекулярные взаимодействия экстрагируемой жидкости. Оптимизация текучести DES играет ключевую роль в повышении скорости экстракции, на что влияет содержание воды в растворителе. При увеличении содержания воды в DES с 5 до 70% скорость экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* изменялась, возрастая до 35% воды в DES, а затем снижаясь (рис. 3а).

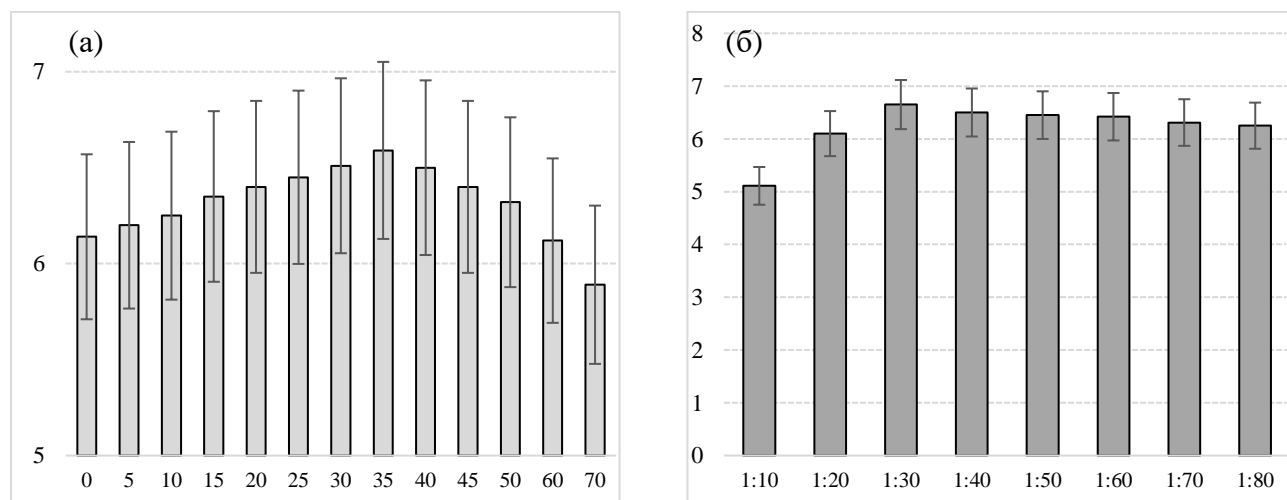


Рис. 3. Влияние концентрации воды в DES (а) и соотношения сырье : DES (б) на выход флавоноидов из травы *C. sativus*. По оси абсцисс – концентрация воды в DES, % (а) / соотношения сырье:DES; по оси ординат – концентрация флавоноидов, мг/г возд.-сухого сырья.

Это, вероятно, было обусловлено тем, что вода как полярный растворитель увеличивала поляризуемость DES, приближаясь к полярности флавоноидов. Дальнейшее разбавление DES водой привело к потере существующих водородных связей вследствие возрастания конкуренции с группами в двух компонентах за образование водородных связей.

Исследование влияния соотношения сырье: экстрагент на эффективность экстракции показало, что с увеличением содержания DES до 1:30 скорость экстракции флавоноидов повышалась, а затем снижалась. Это связано с тем, что при большем содержании растворителя

достигается лучший контакт между растительным сырьем и растворителем, что в свою очередь усиливало массообмен в растворе. Более разбавленный растворитель увеличивал потребление энергии ультразвука и как следствие приводил к неэффективному разрушению клеток. Эффект ультразвуковой кавитации становился менее выраженным и снижался выход целевых компонентов.

После определения параметров температуры (50°C) и времени экстракции (60 мин) была проведена оптимизация процесса экстракции с применением метода Бокса-Бенкена, что позволило повысить эффективность экстракции флавоноидов из травы *C. sativus* до 6.5-6.6 мг/г растительного сырья. Для удаления DES из реакционной среды применялась твердофазная экстракция на макропористой смоле Amberlite XAD-2, как описано ранее [4], в результате чего была получена сумма флавоноидов травы *C. sativus*. Предварительная элюция смолы водой приводила к полному удалению DES, который далее мог быть восстановлен из водных элюатов после удаления воды в вакууме. Предварительные исследования показали, что эффективность экстракции флавоноидов для восстановленного DES составила 95% во втором цикле использования, 92% – в третьем и 86% – в четвертом. Начиная с пятого цикла использования выход флавоноидов снижался до 62% и ниже, что указывало на неэффективность дальнейшего восстановления DES.

Сравнительный анализ данных ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС профилирования и количественного анализа указывали на сходство компонентных составов фракций флавоноидов, полученных с использованием метанола [7] и DES (таблица 1). Суммарное содержание флавоноидов после применения DES в итоговой фракции было выше на 14.5% (876.07 мг/г) в сравнении с таковым в метанол-экстрагируемом продукте (764.50 мг/г). Следует отметить высокое содержание ацилированных *C,O*-гликозилфлавонов 1–5, обладающих выраженным ингибиторным влиянием на активность панкреатической липазы [6–8].

Таблица 1.

Содержание гликозилфлавонов в сумме флавоноидов *C. sativus*, полученной с применением метанольной (MeOH) и DES экстракций, мг/г от массы фракции \pm S.D.

Соединение	MeOH	DES
Изовитексин 7- <i>O</i> -глюкозид	6.03 \pm 0.14	7.26 \pm 0.18
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид	59.73 \pm 1.14	63.38 \pm 1.25
Изовитексин 2''- <i>O</i> -рамнозид	21.44 \pm 0.24	22.89 \pm 0.45
Изовитексин 7,4'-ди- <i>O</i> -глюкозид	47.21 \pm 0.95	50.15 \pm 0.98
Изовитексин 4',2''-ди- <i>O</i> -глюкозид	33.18 \pm 0.69	35.63 \pm 0.71
Изовитексин 7- <i>O</i> -гентиобиозид	2.86 \pm 0.06	3.22 \pm 0.06
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (1)	51.26 \pm 1.01	53.86 \pm 1.07
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(4'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (2)	7.11 \pm 0.15	9.27 \pm 0.20
Изовитексин 2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> -ферулоил)-глюкозид (3)	115.03 \pm 2.34	159.37 \pm 2.58
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид-2''- <i>O</i> -(6'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (4)	104.82 \pm 2.14	128.82 \pm 2.18
Изовитексин 4'- <i>O</i> -глюкозид-2''- <i>O</i> -(4'''- <i>O</i> - <i>n</i> -кумароил)-глюкозид (5)	105.39 \pm 2.16	140.39 \pm 2.49
Кукумерин D	210.44 \pm 4.22	211.83 \pm 4.23
Суммарное содержание флавоноидов	764.50	876.07

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показана эффективность экстракции флавоноидов из зеленых отходов огурца посевного с применением глубоких эвтектических растворителей как экологически чистых и экономичных растворителей для получения природных фенольных соединений, что обеспечивает теоретическую основу для их дальнейшего практического применения.

Благодарности. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-26-00063 (<https://rscf.ru/project/23-26-00063>).

Библиографический список

1. Smith E.L., Abbott A.P., Ryder K.S. Deep eutectic solvents (DESs) and their applications // Chem. Rev. – 2014. – Vol. 114. – P. 11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
2. Serna-Vázquez J., Ahmad M.Z., Boczkaj G., Castro-Muñoz R. Latest insights on novel deep eutectic solvents (DES) for sustainable extraction of phenolic compounds from natural sources // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – No. 5037. DOI: 10.3390/molecules26165037.
3. Hao Y., Pei P., Huang J., Li G. Application of deep eutectic solvents on extraction of flavonoids // J. Sep. Sci. – 2024. – Vol. 47. – No. 2300925. DOI: 10.1002/jssc.202300925.
4. Olennikov D.N. Separation, characterization and mammal pancreatic lipase inhibitory potential of cucumber flower flavonoids // Separations. – 2023. – Vol. 10. – No. 255. DOI: 10.3390/separations10040255.
5. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. New flavonoids from *Cucumis sativus* // Chem. Nat. Comp. – 2023a. – Vol. 59. – P. 651–654. DOI: 10.1007/s10600-023-04079-4.
6. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Acylated flavonoids from *Cucumis sativus* inhibit activity of human pancreatic lipase // Appl. Biochem. Microbiol. – 2023b. – Vol. 59. – P. 530–538. DOI: 10.1134/S0003683823040099.
7. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. Green waste from cucumber (*Cucumis sativus* L.) cultivation as a source of bioactive flavonoids with hypolipidemic potential // Agronomy. – 2023c. – Vol. 13. – No. 2410. DOI: 10.3390/agronomy13092410.
8. Olennikov D.N., Kashchenko N.I. New acylated *C,O*-glycosylflavones from *Cucumis sativus* // Chem. Nat. Comp. – 2024. – Vol. 60. – P. 235–240. DOI: 10.1007/s10600-024-04295-6.