



УДК: 547.972+615.322

Салихжан МАУЛЯНОВ,

Доцент кафедры химии природных соединений Национального университета Узбекистана

E-mail: smaulyanov@yandex.ru

Асадбек САРАБЕКОВ,

Ст.преподаватель кафедры химии природных соединений Национального университета Узбекистана

E-mail: asadbeksarabekov@yandex.ru

Бахрам БАБАЕВ,

Зав.кафедры химии природных соединений Национального университета Узбекистана

E-mail: bahrom-nur@rambler.ru

Баходир ОХУНДЕДАЕВ,

Преподаватель кафедры химии природных соединений Национального университета Узбекистана

E-mail: boxundedayev@mail.ru

По рецензии старшего научного сотрудника Института биоорганической химии АН РУз, доктора философии по химии (PhD) Р.Рахимов

ЎзР ФА Биоорганик кимё институти катта илмий ходими, кимё фанлари бўйича фалсафа доктори (PhD) Р.Рахимов тақризи остида

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ЭКСТРАКЦИИ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ЦВЕТКОВ *HELICHRYSUM MARACANDICUM* ФЛОРЫ УЗБЕКИСТАНА

Аннотация

Изучен процесс экстракции суммы флавоноидов из цветков *Helichrysum maracandicum* - бессмертника самаркандского. На основании результатов исследований установлены следующие условия экстракции: экстрагент – 70%-ный этиловый спирт, размер частиц сырья – не более 3-5 мм и температура процесса – 40–50 °С. Методом математического моделирования эксперимента по Боксу-Уилсону определены условия экстракции, обеспечивающие извлечение суммы флавоноидов из сырья с выходом 90%. Качественный и количественный состав космосиина, изосалипурпозид и салипурпозид определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Ключевые слова: Asteraceae, *Helichrysum maracandicum*, космосиин, изосалипурпозид, салипурпозид, экстрактивные вещества, экстракция, оптимизация, математическое моделирование эксперимента.

INVESTIGATION OF THE PROCESS OF EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM THE FLOWERS OF *HELICHRYSUM MARACANDICUM* OF THE FLORA OF UZBEKISTAN

Annotation

The process of extraction of total flavonoids from the flowers of *Helichrysum maracandicum* - Samarkand immortelle has been studied. Based on the research results, the following extraction conditions were established: the extractant is 70% ethyl alcohol, the particle size of the raw material is no more than 3–5 mm, and the process temperature is 40–50 °C. Using the method of mathematical planning of the experiment according to Box-Wilson, the extraction conditions were determined, which ensure the extraction of the amount of flavonoids from raw materials with a yield of 90%. The qualitative and quantitative composition of cosmosiin, isosalipurposide and salipurposide was determined by high performance liquid chromatography (HPLC).

Key words: Asteraceae, *Helichrysum maracandicum*, cosmosiin, isosalipurposide, salipurposide, extractives, extraction, optimization, mathematical modeling of experiment.

ЎЗБЕКИСТОН ФЛОРАСИДАГИ *HELICHRYSUM MARACANDICUM* ЎСИМЛИГИ ГУЛЛАРИНИНГ ФЛАВОНОИДЛАРИНИ ЭКСТРАКЦИЯ ЖАРАЁНИНИ ТАДҚИҚ ҚИЛИШ

Аннотация

Helichrysum maracandicum – Самарканд ўлмас ўти ўсимлиги гулларининг флавоноидларини экстракция қилиш жараёни ўрганилди. Олиб борилган тадқиқотлар натижасида экстракция жараёнининг қуйидаги шароитлари ўрнатилди: экстрагент – 70% ли этил спирти, хом ашё ўлчами – 3-5 мм дан катта бўлмаган ҳолда ва жараён ҳарорати 40–50 °С. Математик моделлашнинг Бокс-Уилсон усули бўйича флаваноидлар йиғиндиси экстракциясининг оптимал шароити (90 %) аниқланди. Космосиин, изосалипурпозид ва салипурпозид флаваноидларининг сифат ва миқдори таркиби юқори самарали суяклик хроматографияси (ЮССХ) усулида аниқланди.

Калит сўзлар: Asteraceae, *Helichrysum maracandicum*, космосиин, изосалипурпозид, салипурпозид, экстрактив моддалар, экстракция, оптималлаш, экспериментни математик моделлаш.

Введение. Род *Helichrysum* относится к семейству Астровые (*Asteraceae*), являющийся одним из самых распространенных видов растения. В Узбекистане этот род представлен 5 видами: *H. tianschanicum*, *H. mussa*, *H. nuratavicum*, *H. arenarium* и *H. maracandicum*. Одним из широко распространенных видов бессмертника является *Helichrysum maracandicum* (бессмертник самаркандский), который произрастает практически на всех горных хребтах, расположенных на территории республики [1].

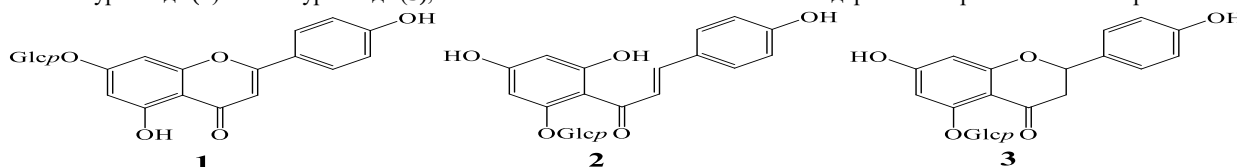
Литературный обзор по теме: *H. maracandicum* является весьма полиморфным видом, отличительные признаки форм меняются в зависимости от среды обитания. Встречаются формы с широкими и узкими листьями, крупными и сравнительно мелкими корзинками, от мохнато опушенных до почти голых экземпляров [2,3]. В связи с явлениями полиморфизма могут наблюдаться различия качественного и количественного состава продуцируемых вторичных метаболитов.

Биологическая ценность данного растения определяется содержанием биологически активных соединений, в частности флавоноидов, которое ранее было выделено из *H. maracandicum* [4,5].

Исходя из выше изложенного, целью исследования являлась разработка метода получения суммы флавоноидов из цветков *H. maracandicum*, произрастающего на территории Республики Узбекистан. Цветки были собраны с широкими листьями, крупными корзинками и опушенными стеблями в конце июня 2019 года в отрогах Пскемского хребта, близ поселка Нанай Бустанлыкского района Ташкентской области.

Экономические показатели получения флавоноидов из растительного сырья во многом зависят от правильного выбора растворителя и проведения экстракции. С целью выбора селективного растворителя и поиска оптимальных режимов процесса экстракции данного растения проводили нижеописанные исследования.

В качестве объекта была выбрана сумма флавоноидов составляющих из биологически активных космосиина (1), изосалипурпозид (2) и салипурпозид (3), так как они являются основными по содержанию в растительном сырье.



Экспериментальная часть

Для оптимизации экспериментальных исследований по повышению эффективности и прогнозированию химико-технологических процессов применяют метод математического моделирования. Исследования проводили на основе однофакторных экспериментов, в каждом опыте изменяя параметры только одного из факторов, влияющих на процесс, остальные оставляли неизменными. Однако известно, что экстрагирование природных соединений зависит от многих факторов, каждый из которых в большей или меньшей степени влияет на выход конечного продукта. Поэтому для оценки степени их влияния на экстракцию фенольных соединений из бессмертника самаркандского применяли метод математического моделирования эксперимента по Боксу–Уилсону [6]. Параметром оптимизации служил выход суммы флавоноидов к массе сырья.

При этом выбрали следующие факторы:

X₁ – степень измельчения сырья;

X₂ – продолжительность процесса;

X₃ – температура экстракции;

X₄ – концентрация экстрагента;

X₅ – соотношение высоты экстрактора к диаметру и интервалы варьирования.

Во всех опытах количество сырья и метод выделения были идентичными. В опытах использовали по 0,5 кг воздушно-сухого сырья в статических условиях.

С целью подбора эффективного экстрагента изучен ряд растворителей. Воздушно-сухое сырьё загружали в экстракторы по 0,5 кг и экстрагировали этиловым спиртом различных концентраций (90, 80, 70, 60 %) [7] при комнатной температуре, производя 5 сливов через каждые 6 ч. Экстракты сливали и заливали свежие порции растворителя. Объединённые экстракты каждого экстрактора упаривали в вакуум-циркуляционном аппарате при температуре 30-40°C и вакууме 0.6-0.8 кгс/см² до густой массы и обрабатывали горячей водой и выпавший осадок отделяли путём фильтрации водного раствора. Фильтрат сгустили и полученную очищенную сумму флавоноидов обрабатывали трижды с этилацетатом. Полученные органические извлечения объединяли, упаривали и анализировали на содержание флавоноидов. Качественный и количественный содержание космосиина, изосалипурпозид и салипурпозид определяли методом ВЭЖХ, приведенного в [9], результаты которых приведены таблице 1.

Таблица 1.

Экстрагент	Количество индивидуальных компонентов в % от массы сырья			Количество фенольных соединений в экстракте от содержания в сырье, %
	Космосин*	Изосалипурпозид*	Салипурпозид*	
Этанол, %				
70	0,92	1,70	1,51	90,98
60	0,77	1,52	1,37	75,30
50	0,55	1,55	1,32	67,76
40	0,54	1,55	1,61	86,96

* - данные по ВЭЖХ

По результатам экстракции определено, что для получения экстракта с высоким содержанием фенольных соединений необходимо использовать в качестве экстрагента 70%-ный этиловый спирт.

Далее изучали влияние степени измельчения сырья на выход суммы флавоноидов в процессе экстракции. Измельчённое сырьё калибровали на размеры частиц менее 1.0; 1-3; 3-5; 5-7 мм и не измельчённое сырьё. По 0.5 кг сырья экстрагировали 70%-ным спиртом пятикратно. Объединённые экстракты из каждого экстрактора отфильтровывали и анализировали. При экстракции не измельчённого и крупно измельчённого сырья поверхность соприкосновения частиц с растворителем мала, процесс проходит медленно, требуется большой расход растворителя. При очень мелком помоле сырья – менее 1 мм процесс ускоряется, однако, из-за плохой фильтруемости слоя сырья возникают трудности в осуществлении процесса. В существующих экстракторах оптимальной степенью помола является 3-5 мм. Результаты исследований приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Выход суммы флавоноидов в зависимости от степени измельчения сырья

Размер частиц, мм	Извлечено фенольных соединений от содержания в сырье, %
менее 1	90,84
1-3	90,84
3-5	90,86
5-7	87,79
Неизмельченное сырье	80,14

При экстрагировании растительных веществ часто положительный эффект играет фактор температуры. С увеличением температуры процесс диффузии ускоряется. С этой целью изучали процесс влияния температуры на выход суммы экстрактивных веществ и фенольных соединений при 20, 30, 40°C. В термостате установили ёмкость вместимостью 2.0 л., который загрузили 0.1 кг воздушно сухое измельчённое сырьё и залили 1.5 л 70%-ного этилового спирта. С целью ускорения процесса экстракции массу перемешивали мешалкой со скоростью вращения 60 об/мин., после 6 часов останавливали процесс, отделили экстракт от шрота и упаривали в вакуум-выпарном аппарате до 100 г и анализировали концентрированный экстракт. При экстракции в разном температурном режиме при прочих одинаковых условиях установили, что повышение температуры существенно влияет на процесс экстракции целевого продукта. С повышением температуры выход экстрактивных веществ увеличивается. Таким образом, оптимальным оказалось экстрагирование растения при температуре 40°C. Данные о влиянии температуры на экстракцию суммы экстрактивных веществ и фенольных соединений приведены в таблице 3.

Таблица 3.

Влияние температуры на процесс экстракции

Температура, °C	Количество индивидуальных компонентов в % от массы сырья			Количество фенольных соединений в экстракте от содержания в сырье, %
	Космосинин	Изосалипурпозид	Салипурпозид	
20-30	0,55	1,30	1,21	84,72
30-40	0,57	1,52	1,37	87,86
40-50	0,94	1,75	1,62	90,76
50-60	0,95	1,75	1,69	90,96

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием «Shimadzu LC-20 AD», оснащённом 4-х градиентным насосом, дегазатором, градиентным смесителем, детектором с переменной длиной волны и ручным петлевым инжектором. Колонка Shim-pack (4.6I.D. x 250 мм), стандартная фаза GIST C18, элюентная система – ацетонитрил : вода в соотношении 25 : 75 с добавлением 1% муравьиной кислоты. Скорость элюирования – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл. В качестве детектора использовали SPD-M20A. Длину волны выбирали с учетом того, что исследуемые вещества имеют следующие максимумы поглощения: при 255 и 290 нм – космосинин (1), 370 нм – изосалипурпозид (2) и 284 нм – салипурпозид (3).

Методика количественного определения флавоноидов 1-3. Точную навеску (космосинина, изосалипурпозид и салипурпозид по 0,02 г) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяли в 20–30 мл 95% этилового спирта, доводили объем раствора 95% этиловым спиртом до метки и перемешивали. К 25 мл ацетонитрила прибавляли 75 мл воды очищенной, 1 мл муравьиной кислоты и тщательно перемешивали. Раствор отфильтровывали под вакуумом через мембранный фильтр с диаметром пор не более 0,4–0,5 мкм. Навеску 20-50 мг сухого остатка, оставшегося после упаривания этилацетатной фракции до постоянной массы, взвешенную на аналитических весах, растворяли в метаноле для ЖХ при легком нагревании на водяной бане в таком объеме, чтобы конечная концентрация вещества была 10 мг/мл (т.е., например, 20 мг разбавляли в 2 мл, 50 мг в 5 мл и т.д.) и анализировали методом ВЭЖХ в условиях, аналогичных анализу стандартных растворов. Концентрацию флавоноидов рассчитывали полученным калибровочным прямым. Результаты количественного анализа флавоноидов 1-3 в экстрактах проведенного методом ВЭЖХ представлены в таблице 4.

Результаты экспериментов и их обсуждение

На основе проведенных результатов согласно матрица планирования и последовательности их расчета получили результаты как показано в таблице 4.

Таблица 1.

Матрица планирования экспериментов

№ опыта	Код фактора					Y ₁ , %	Y ₂ , %	Ŷ _{ср}
	X ₀	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄ =X ₁ X ₂ X ₃			
1	+	+	+	+	–	60,2	59,6	59,9
2	+	+	–	+	–	37,8	38,9	38,35
3	+	–	+	–	–	46,2	48,6	47,4
4	+	–	–	+	–	28,9	29,2	29,05
5	+	+	+	+	+	50,3	50,9	50,6

Каждый из 5 опытов проводили в соответствии с составленной матрицей, используя выбранные уровни каждого фактора, закодированные в матрице знаками «+» или «–» (соответственно верхний и нижний уровни варьирования).

Результаты опытов представлены в виде уравнения регрессии:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + \dots + b_jx_j$$

где $b_0, \dots, b_j$ – коэффициенты регрессии неполного квадратного уравнения.

Выводы:

После оптимизации процесса экстракции выход флавоноидов повысился на 8%. В связи с этим изучали каждый слив, экстрагируя под влиянием факторов, найденных при оптимизации, и установили, что пятикратная экстракция в этих условиях дает возможность экстрагировать более 90% сумму флавоноидов от содержания в сырье.

ЛИТЕРАТУРА

1. Флора Узбекистана [Текст]. – Ташкент: Изд-во АН УзССР, – Т.6. – С. 79.
2. Определитель растений Средней Азии, т. X, под ред. Адылова Т. А., Цукерваника Т. И., Фан, Ташкент, 1993, 466-467 с.
3. Ganiev A.K., Ergashova D.S. Samarqand bo'znochi (*Helichrysum maracandicum* M.Pop) O'simligini ko'paytirish va yetishtirish texnologiyasini ishlab chiqishning ahamiyati // Agrar sohoni barqaror rivojlantirishda fan, ta'lim va ishlab

chiqarish integratsiyasi" 2020-yil ilm marifat va raqamli iqtisodiyotni rivojlantirish yiliga bag'ishlangan masofaviy ilmiy amaliy konferensiyasi materiallari, 21-may 2020-yil 395-398-betlar.

4. Сарабеков А.Т., Бобакулов Х.М., Охундедаев Б.С., Маулянов С.А., Бабаев Б.Н., Шамьянов И.Д., Абдуллаев Н.Д. Terpenoids and flavonoids from *Helichrysum maracandicum* of the flora of Uzbekistan // *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 58, No. 5, September, 2022
5. Yagura T., Motomiya T., Ito M., Honda G., Iida A., Kiuchi F., Tokuda H., Nishino H. Anticarcinogenic compounds in the Uzbek medicinal plant, *Helichrysum maracandicum* // *Journal of Natural Medicines*, Vol. 62, No.2, 174-178 (2008)
6. Nat. J. Med., 62, 174 (2008).
7. Babin A.V., Rakipov D.F. Organization and mathematical planning of the experiment. Yekaterinburg, 2014, pp. 85-94.
8. Патент № 2327481 (РФ). Способ получения средства, обладающего антидепрессантной активностью / Куркин В.А., Правдивцева О.Е., Дубищев А.В., Кадацкая Д.В.. –2008.
9. Патент No 2623084 (РФ). Способ одновременного получения гиперицина и псевдогиперицина / Пунегов В.В., Чуча К.В., Эчишвили Э.Э.. –2017.
10. Куркин А.В. Исследование компонентного состава цветков *Helichrysum arenarium* (L.) Moench. Химия растительного сырья . 2011. №2. С. 113–116.
11. Куркин А.В., Рыжов В.М. Содержание изосалипурпозидов в цветках.