

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83>
УДК 544.165



Оригинальная статья / Research article

Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия

М. А. Джавахян^{1,2}, Ю. Э. Прожогина², О. К. Павельева¹✉, Е. И. Каленикова²

¹ ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова), 119991, Россия, г. Москва, Ленинские горы, д. 1

✉ Контактное лицо: Павельева Олеся Константиновна. E-mail: pavelieva.olesya@yandex.ru

ORCID: М. А. Джавахян – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Ю. Э. Прожогина – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>;

О. К. Павельева – <https://orcid.org/0000-0002-2397-8920>; Е. И. Каленикова – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>.

Статья поступила: 16.11.2021

Статья принята в печать: 18.03.2022

Статья опубликована: 25.08.2022

Резюме

Введение. Природные глубокие эвтектические растворители [deep eutectic solvents (DESs)] являются перспективными экстрагентами для многих биологически активных веществ (БАВ) из растительного сырья. Они биodeградируемы, безопасны, стабильны, их производство доступно и легко осуществимо, а эффективность экстракции сопоставима с известными органическими растворителями. В связи с этим интерес к глубоким эвтектическим растворителям неуклонно растет в последние годы, и они находят применение в различных областях – химии, фармацевтике и пищевой промышленности.

Цель. Целью настоящей работы было изучить возможность экстракции флавоноидов из растительного сырья посредством глубоких эвтектических растворителей, а также сопоставить эффективность их экстракции с традиционными растворителями.

Материалы и методы. Экстракцию флавоноидов проводили из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca* L.), травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), травы Melissa лекарственной (*Melissa officinalis* L.) и травы тимьяна ползучего (чабреца) (*Thymus serpyllum* L.) в соотношении 4:2,5:2,5:1, измельченных до размера частиц 2–3 мм. В качестве экстрагентов использовались 21 эвтектический растворитель на основе бетаина гидрохлорида и холина битартрата в качестве акцепторов водородной связи.

Результаты и обсуждение. Исследована экстрагирующая способность 21-го экспериментального состава DESs. Изучены влияние содержания воды в составе DES, а также воздействие температуры на процесс экстракции. Количественное определение флавоноидов в пересчете на рутин проводилось методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 410 ± 2 нм. Максимальный выход флавоноидов был достигнут при использовании 40%-го водного раствора DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3 при 60 °С.

Заключение. Извлекающая способность полученного DES по эффективности сопоставима и даже незначимо превышает таковую у классического экстрагента для исследуемой композиции – 70%-го этилового спирта. Дальнейшая разработка и оптимизация процесса использования DESs – многообещающее направление развития химии и фармацевтической технологии.

Ключевые слова: глубокие эвтектические растворители (DESs), флавоноиды, дифференциальная спектрофотометрия, пустырник, зверобой, Melissa, чабрец

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. М. А. Джавахян придумала и организовала экспериментальное исследование, поэтапный план работы. Ю. Э. Прожогина разработала технологию получения эвтектического экстракта, провела контроль качества. О. К. Павельева принимала участие в воспроизведении результатов и оформлении статьи. Е. И. Каленикова провела анализ полученных результатов. Все авторы приняли участие в обсуждении результатов и подготовке статьи.

Для цитирования: Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э., Павельева О. К., Каленикова Е. И. Природные глубокие эвтектические растворители как альтернативные экстрагенты флавоноидов из растительного сбора седативного действия. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2022;11(3):75–83. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83>

Natural Deep Eutectic Solvents as Alternative Flavonoid Extractants from the Sedative Plant Composition

Marina A. Dzhavakhyan^{1,2}, Yulia E. Prozhogina², Olesya K. Pavelieva¹✉, Elena I. Kalenikova²

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants, 7/1, Greena str., Moscow, 117216, Russia

² Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie gory, Moscow, 119991, Russia

✉ Corresponding author: Olesya. K. Pavelieva. E-mail: pavelieva.olesya@yandex.ru

ORCID: Marina A. Dzhavakhyan – <https://orcid.org/0000-0003-2673-6203>; Yulia E. Prozhogina – <https://orcid.org/0000-0003-4803-5133>;

Olesya K. Pavelieva – <https://orcid.org/0000-0002-2397-8920>; Elena I. Kalenikova – <https://orcid.org/0000-0003-0068-2788>.

Received: 16.11.2021

Revised: 18.03.2022

Published: 25.08.2022

© Джавахян М. А., Прожогина Ю. Э., Павельева О. К., Каленикова Е. И., 2022

© Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E., Pavelieva O. K., Kalenikova E. I., 2022

Abstract

Introduction. Natural deep eutectic solvents (DESs) are promising extractants for many biologically active substances from plant raw materials. They are biodegradable, safe, stable, their production is affordable and easily feasible, and the extraction efficiency is comparable to known organic solvents. In this regard, interest in deep eutectic solvents has been steadily growing in recent years, and they are being used in various fields of chemistry, pharmaceuticals and the food industry.

Aim. The purpose of this work was to study the possibility of extracting flavonoids from plant raw materials using deep eutectic solvents, as well as to compare the efficiency of their extraction with traditional solvents.

Materials and methods. The extraction of flavonoids was carried out from the collection of a plant composition consisting of the herb of motherwort cordial (common motherwort) (*Leonurus cardiaca* L.), the herb of St. John's wort (*Hypericum perforatum* L.), the herb of lemon balm (*Melissa officinalis* L.) and the herb of creeping thyme (thyme) (*Thymus serpyllum* L.) in a ratio of 4:2.5:2.5:1, crushed to a particle size of 2–3 mm. 21 eutectic solvents based on betaine hydrochloride and choline bitartrate as hydrogen bond acceptors were used as extractants.

Results and discussion. The extracting ability of 21 experimental compositions of DESs was studied. The influence of the water content in the composition of DES, as well as the effect of temperature on the extraction process, has been studied. Quantitative determination of flavonoids in terms of rutin was carried out by differential spectrophotometry at a wavelength of 410 ± 2 nm. The maximum yield of flavonoids was achieved using a 40 % aqueous solution of DES based on betaine hydrochloride and propylene glycol in a molar ratio of 1:3 at 60 °C.

Conclusion. The recovery ability of the obtained DES is comparable in efficiency and even slightly exceeds that of the classic extractant for the investigated composition – 70 % ethyl alcohol. Further development and optimization of the process of using DESs is a promising direction for the development of chemistry and pharmaceutical technology.

Keywords: natural deep eutectic solvents (DESs), flavonoids, differential spectrophotometry, leonurus, hypericum, melissa, thyme

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Marina A. Dzhavakhyan came up with and organized an experimental study, a phased work plan. Yulia E. Prozhogina and developed technologies for obtaining eutectic extract, carried out quality control. Olesya K. Pavelieva participated in the reproduction of the results and the design of the article. Elena I. Kalenikova analyzed the results. All authors took part in the discussion of the results and preparation of the article.

For citation: Dzhavakhyan M. A., Prozhogina Yu. E., Pavelieva O. K., Kalenikova E. I. Natural deep eutectic solvents as alternative flavonoid extractants from the sedative plant composition. *Drug development & registration*. 2022;11(3):75–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-75-83>

ВВЕДЕНИЕ

Глубокие эвтектические растворители [deep eutectic solvents (DESs)] – современная и перспективная альтернатива используемым в настоящее время органическим экстрагентом, таким как этанол, метанол, водно-ацетоновые растворы, углеводороды [1]. Последние являются токсичными, взрыво- и пожароопасными, кроме того, наносят урон окружающей среде, так как не способны к биодegradации. Поэтому появилась необходимость в новых, безопасных и в то же время эффективных растворителях, пригодных для использования в фармации и пищевой промышленности. Глубокие эвтектические растворители соответствуют всем вышеприведенным критериям: они биодegradируемы, безопасны [2–5], стабильны, их производство доступно и легко осуществимо, а эффективность экстракции сопоставима с известными органическими сольвентами [6]. В связи с этим интерес к глубоким эвтектическим растворителям неуклонно растет в последние годы [7], и они находят применение в различных областях химии, фармацевтике и пищевой промышленности [8].

Образование глубокого эвтектического растворителя основано на установлении водородных связей, или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, меж-

ду донором и акцептором водородных связей [9, 10]. В качестве доноров обычно выступают органические кислоты, спирты, сахара, в качестве акцепторов – четвертичные аммониевые соли. Наиболее часто встречающиеся компоненты «зеленых» растворителей приведены в таблице 1. Данные вещества, при комнатной температуре представляющие собой твердые соединения либо вязкие жидкости, при взаимодействии образуют эвтектическую смесь: температура плавления получаемой субстанции оказывается значительно ниже температуры плавления отдельных входящих в ее состав компонентов, в результате чего образуется жидкость надмолекулярной структуры, относящаяся к неводным растворителям. Температура плавления глубокого эвтектического растворителя ниже комнатной, благодаря чему получаемые растворы сохраняют стабильность при хранении в течение долгого времени. Строение, пространственная структура, элементный состав, заряд образующих глубокий эвтектический растворитель молекул влияют на прочность и число возникающих водородных связей, а следовательно, на устойчивость и физико-химические свойства получаемого экстрагента. Процесс экстракции глубокими эвтектическими растворителями основан на замещении молекул растворителя извлекаемыми биологически активными ве-

ществами с разрывом существующих водородных связей и образованием новых, что было доказано методами ядерно-магнитного резонанса при изучении ¹H ЯМР-спектров различных глубоких эвтектических растворителей [11]. Несомненным преимуществом является и огромное число комбинаций, из которых можно составить глубокие эвтектические растворители, причем их свойства будут варьировать в зависимости от входящих компонентов. Примечательно, что эффективность экстракции таким «зеленым» сольвентом будет различаться, исходя как из целевого биологически активного компонента, так и из конкретного глубокого эвтектического растворителя. Так, для фенольных соединений эффективное и полное извлечение из растительного сырья может достигаться одним растворителем, для флавоноидов – совершенно другим по составу «зеленым» экстрагентом. Подбирая определенные комбинации и соотношения компонентов глубоких эвтектических растворителей, изменяя их вязкость и текучесть, разбавляя другими сольвентами, в частности водой, можно изменять выход и характеристики получаемых извлечений. В литературе уже описаны способы экстракции из растительного материала флоротанинов [12], рутина [13], кверцетина и мирицетина [14] и других БАВ. В нашей работе описан способ экстракции флавоноидов из седативной растительной композиции с использованием DESs.

Таблица 1. Доноры и акцепторы водородных связей, наиболее часто образующие глубокие эвтектические растворители

Table 1. Donors and acceptors of hydrogen bonds, most often forming natural deep eutectic solvents

Акцепторы водородных связей Donors of hydrogen bonds	Доноры водородных связей Acceptors of hydrogen bonds
Холина хлорид Choline chloride	Яблочная кислота Malic acid
Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid
Ацетилхолина хлорид Acetylcholine chloride	Щавелевая кислота Oxalic acid
Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Лимонная кислота Citric acid
L-Пролин L-Proline	Глюкоза Glucose
L-Аланин L-Alanine	Глицерин Glycerol
L-Гистидин L-Histidine	Пропиленгликоль Propylene glycol

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительный материал

Экстракцию флавоноидов проводили из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника сердечного (пустырника обыкновенного) (*Leonurus cardiaca* L.), травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), травы Melissa лекарственной

(*Melissa officinalis* L.) и травы тимьяна ползучего (чабреца) (*Thymus serpyllum* L.) в соотношении 4:2,5:2,5:1, измельченных до размера частиц 2–3 мм. Лекарственные растения были доставлены из Северо-Кавказского филиала Ботанического сада Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР). Данный сбор обладает седативными свойствами благодаря содержанию комплекса биологически активных веществ, содержащего в том числе и флавоноиды [15], основным из которых является рутин, что было доказано валидированными методами.

Материалы и реагенты

Холина битартрат (Mw = 253,25) и бетаина гидрохлорид (Mw = 153,61) получены из Suzhou Vitajoy Biotech Co. (Китай), яблочная кислота (Mw = 134,1) доставлена из Anhui Sealong Biotechnology (Китай), молочная кислота (Mw = 90,08), лимонная кислота (Mw = 192,1), щавелевая кислота (Mw = 90,04), глюкоза (Mw = 180,16), пропиленгликоль (Mw = 76,09), глицерин (Mw = 92,09) и порошок рутина (≥94,0%) предоставлены компанией Sigma Aldrich (Китай), алюминия хлорид (PanReac AppliChem, Испания), спирт этиловый 96% (ООО «Константа-Фарм М», Россия), кислота уксусная ледяная (ООО ТД «АльфаХим», Россия).

Изготовление глубоких эвтектических растворителей

Для изготовления различных комбинаций глубоких эвтектических растворителей был использован тепловой метод. Компоненты смешивали в определенных мольных соотношениях в стеклянной конической колбе, закрывали пробкой и нагревали при 60 °C на водяной бане до образования однородной прозрачной жидкости (60–90 мин), устойчивой и стабильной при комнатной температуре.

В данном эксперименте нами получен 21 глубокий эвтектический растворитель. Их описание и состав приведены в таблице 2. Изготовленные DESs представляют собой вязкие прозрачные жидкости.

Экстракция флавоноидов из сбора растительной композиции

В качестве объекта исследования использована экспериментальная растительная композиция, обладающая седативным действием [15].

Около 2 г (точная навеска) исследуемого сырья помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 30 мл полученного глубокого эвтектического растворителя, колбу закрывали пробкой. Затем колбу нагревали при температуре 60 °C в течение 1 ч, содержимое перемешивали с помощью магнитной мешалки. Колбу охлаждали до комнатной температуры, содержимое колбы фильтровали через бумажный складчатый фильтр (синяя лента) для дальнейшего анализа.

Таблица 2. Состав глубоких эвтектических растворителей

Table 2. Deep eutectic solvents compositions

Название Extractant	Компонент Component			Мольное соотношение Molar ratio
	1	2	3	
DES 1	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Молочная кислота Lactic acid	Вода Water	1:1:2
DES 2	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Щавелевая кислота Oxalic acid	Вода Water	1:1:1
DES 2	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Щавелевая кислота Oxalic acid	Вода Water	1:1:2
DES 4	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	Вода Water	1:1:2
DES 5	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	Вода Water	1:1:1
DES 6	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	Вода Water	1:1:2
DES 7	Холина битартрат Choline bitartrate	Глюкоза Glucose	Вода Water	5:2:5
DES 8	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	ПЭГ-400 PEG-400	1:1:0,5
DES 9	Холина битартрат Choline bitartrate	Лимонная кислота Citric acid	ПЭГ-400 PEG-400	1:1:0,5
DES 10	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:1
DES 11	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	2:1:1
DES 12	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:2
DES 13	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Молочная кислота Lactic acid	–	1:1
DES 14	Холина битартрат Choline bitartrate	Яблочная кислота Malic acid	Вода Water	1:1:1
DES 15	Холина битартрат Choline bitartrate	Молочная кислота Lactic acid	–	1:1
DES 16	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Глюкоза Glucose	Вода Water	5:2:5
DES 17	Холина битартрат Choline bitartrate	Яблочная кислота Malic acid	Пропиленгликоль Propylene glycol	1:1:3
DES 18	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Глицерин Glycerol	1:1:3
DES 19	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Яблочная кислота Malic acid	Пропиленгликоль Propylene glycol	1:1:3
DES 20	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Пропиленгликоль Propylene glycol	–	1:3
DES 21	Бетаина гидрохлорид Betaine hydrochloride	Глицерин Glycerol	–	1:3

Оптимизация процесса экстрагирования

Все экстракты на основе DESs были получены в одинаковых условиях: соотношение сырье:экстракт – 1:15 г/мл, время экстракции 1 ч, температура экстракции 60 °С. Для первоначального скрининга экспериментальных образцов DESs, представленных в таблице 2, изготовлены их 50%-е водные растворы (m/m). Усовершенствование процесса экстрагирования осуществлялось после выбора оптимального DES по параметрам содержания воды в растворе DES (30, 40, 50, 60 и 70 %) и температуры экстракции (50, 60, 70, 80 °С).

Количественное определение

Для оценки суммарного содержания флавоноидов в полученных извлечениях был использован метод дифференциальной спектрофотометрии, основанный на реакции комплексообразования флавоноидов с ионами трехвалентных металлов – Al, Zr, Ga и др., и обладающий большей селективностью по сравнению с прямым спектрофотометрическим методом [16, 17]. В результате реакции комплексообразования с алюминия хлоридом происходит bathochromный сдвиг полосы поглощения флавоноидов с 330–350 нм до 390–410 нм, что позволяет количественно

обнаружить искомые действующие вещества по оптической плотности растворов в этой области спектра.

При добавлении 5%-го раствора хлорида алюминия в 70%-ом этиловом спирте к раствору изучаемого извлечения в его спектре наблюдается максимум поглощения, который совпадает с максимумом поглощения раствора рутин с хлоридом алюминия. Это определило выбор длины волны 410 ± 2 нм как характеристической для количественного определения содержания флавоноидов в полученных с помощью глубоких эвтектических растворителей экстрактах.

Измерения проводились на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Статистический анализ

Все эксперименты проводились в трех повторностях. Статистическую обработку осуществляли с использованием программного пакета STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Статистически значимыми признавались различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние состава DES на процесс экстракции флавоноидов

Эффективность DESs для извлечения флавоноидов была доказана ранее проводимыми исследованиями [18–22]. Нами изготовлен и протестирован 21 глубокий эвтектический растворитель на предмет эффективности экстракции флавоноидов из растительного сбора на основе травы пустырника, травы зверобоя, травы мелиссы и травы чабреца. Эффективность процесса извлечения БАВ изучена в сравнении с экстрактами, полученными на основе 70%-го

спирта этилового, 96%-го спирта этилового и воды как наиболее часто применяемых экстрагентов для флавоноидов. Вязкость изготовленных DESs снижена их разбавлением 50 % воды (m/m). В качестве акцептора протона выступали холина битартрат или бетаина гидрохлорид, в качестве донора – органические кислоты, спирты и сахара.

Данные по извлечению флавоноидов из сбора растительной композиции приведены на рисунке 1 и отображены в таблице 3.

Таблица 3. Влияние состава DES на выход флавоноидов

Table 3. Effect of DES composition on flavonoid yield

Экстракт Extractant	Выход флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г) Extraction yields of the target compounds (mg/g)	Экстракт Extractant	Выход флавоноидов в пересчете на рутин (мг/г) Extraction yields of the target compounds (mg/g)
DES-1	3,67 ± 0,15	DES-13	3,68 ± 0,37
DES-2	0,94 ± 0,08	DES-14	3,73 ± 0,21
DES-3	0,94 ± 0,21	DES-15	3,68 ± 0,33
DES-4	4,15 ± 0,35	DES-16	1,01 ± 0,26
DES-5	4,39 ± 0,27	DES-17	6,19 ± 0,35
DES-6	3,56 ± 0,16	DES-18	6,63 ± 0,03
DES-7	0,33 ± 0,17	DES-19	6,70 ± 0,20
DES-8	5,73 ± 0,03	DES-20	9,48 ± 0,23
DES-9	4,51 ± 0,25	DES-21	8,67 ± 0,33
DES-10	5,53 ± 0,53	Этанол 70 % Ethanol 70 %	9,70 ± 0,10
DES-11	4,35 ± 0,09	Этанол 96 % Ethanol 96 %	7,10 ± 0,46
DES-12	5,08 ± 0,42	Вода Water	3,50 ± 0,24

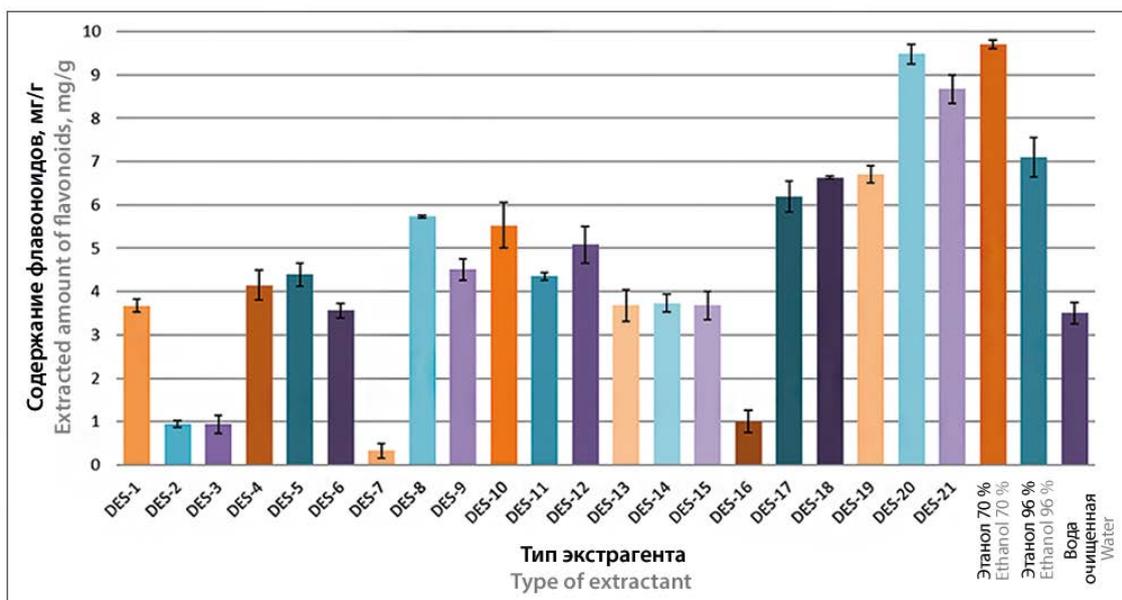


Рисунок 1. Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе 50%-х водных растворов DESs (m/m)

Figure 1. Flavonoid content (mg/g) in extracts from the plant composition based on 50 % aqueous solutions of DESs (m/m)

Как видно из рисунка, способность DES к извлечению флавоноидов зависит от состава конкретного экстрагента. Для DESs, основу которых составлял холина битартрат как акцептор протона, извлекающая способность оказалась в целом ниже, чем для DESs на основе бетаина гидрохлорида. Возможно, это обусловлено особенностью возникновения водородных связей между компонентами DES. Хлорид-анион – более сильный акцептор протонов, чем ион битартрата. Доказано, что флавоноиды конкурируют с донорами протонов в составе DES за образование водородных связей [23]. Чем больше образуется водородных связей в структуре DES, тем большее количество флавоноидов может взаимодействовать с компонентами растворителя и извлекаться из растительного материала. Кроме того, больший размер аниона битартрата по сравнению с хлорид-ионом может способствовать возникновению стерических препятствий к образованию водородных связей.

Важное значение играет и тип донора протонов. Целевые экстрагируемые соединения – флавоноиды, обладающие слабыми кислотными свойствами за счет свободных фенольных гидроксильных групп и поэтому хорошо растворимые в растворах щелочей. DESs, базирующиеся на органических кислотах как донорах протона, имеют более кислую среду [24] и поэтому хуже извлекают флавоноиды, чем DESs, включающие спирты в качестве доноров протонов. Этот эффект доказывает тот факт, что именно DESs на основе полиолов и гликолей (ПЭГ-400, глицерина, пропиленгликоля) обладают наилучшей экстрагирующей способностью. Кроме того, по-видимому, образуемые органическими кислотами водородные связи более устойчивы, и экстрагируемым флавоноидам труднее заменить их в составе растворителя, т. е. энтальпия сольватации полиолов в составе DESs более экзотер-

мична и выгодна для извлечения целевых соединений их растительного материала [25].

Таким образом, оптимальным экстрагентом для извлечения флавоноидов из растительной композиции является DES-20 на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3. С помощью данного экстрагента удалось извлечь $9,48 \pm 0,02$ мг/г сухого сырья флавоноидов в пересчете на рутин, что составляет 97,7 % от количественного содержания флавоноидов в водно-этанольном (70 %) экстракте, взятом в качестве стандарта.

Влияние содержания воды в составе DES на процесс экстракции флавоноидов

Далее нами изучен эффект содержания воды в составе DES на его экстрагирующую способность. Получены DESs на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля в мольном соотношении 1:3 (DES-20), содержащие 30, 40, 50, 60 и 70 % воды (m/m), которые использовали в качестве экстрагентов флавоноидов из растительного сбора. Экстракция осуществлялась при температуре 60 °C в течение 1 ч при соотношении сырье:экстрагент – 1 : 15 г/мл. Выход флавоноидов из растительного материала в зависимости от концентрации DES графически представлен на рисунке 2.

Как видно из рисунка, с разбавлением DES экстрагирующая способность растворителя сначала увеличивается, что может быть вызвано повышением полярности растворителя, а также уменьшением его вязкости. Это облегчает процесс диффузии согласно уравнению Стокса – Эйнштейна [26]:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R},$$

где D – коэффициент диффузии; k – постоянная Больцмана; T – абсолютная температура; η – вязкость среды; R – гидродинамический радиус молекулы.

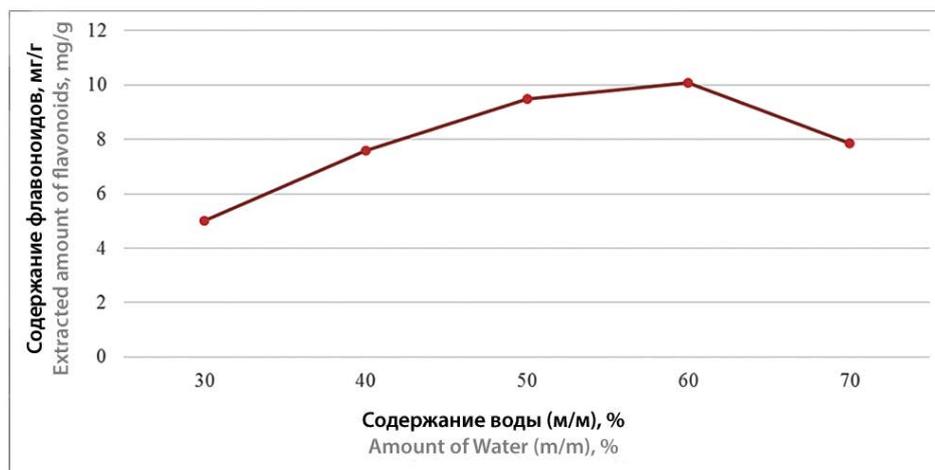


Рисунок 2. Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе водных растворов DES-20 с различным содержанием воды

Figure 2. Flavonoid content (mg/g) in extracts from plant composition based on aqueous solutions of DES-20 with different water content

Однако после определенного значения дальнейшее увеличение содержания воды приводит к уменьшению выхода флавоноидов из растительного сырья, что можно объяснить разрывом существующих водородных связей и нарушением надмолекулярной структуры DES.

Таким образом, было установлено, что оптимальное содержание воды в DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля (молярное соотношение 1:3) составляет 60 %.

Влияние температуры на процесс экстракции флавоноидов

Чтобы определить оптимальную температуру экстракции, была осуществлена экстракция флавоноидов из сбора растительной композиции при температурах 50, 60, 70 и 80 °С. Эффект, оказываемый температурой на извлечение БАВ, представлен на рисунке 3.

Повышение температуры экстракции, с одной стороны, ведет к увеличению скорости диффузии, но, с другой стороны, приводит к разрушению флавоноидов как термолабильных соединений [27].

Экстракцию флавоноидов из растительного сбора проводили с помощью 40%-го раствора DES-20 на основе бетаина гидрохлорида – пропиленгликоля (молярное соотношение 1:3) при температурах 50, 60, 70 и 80 °С в течение 1 ч. На основании полученных экспериментальных данных было установлено, что оптимальная температура, позволяющая извлечь из сырья и сохранить наибольшее количество флавоноидов, составляет 60 °С.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования из природных, безопасных и доступных веществ нами изготовлен и изучен на предмет экстрагирующей способности

21 глубокий эвтектический растворитель. Наилучшим экстрагентом для флавоноидов из сбора растительной композиции, состоящей из травы пустырника, травы зверобоя, травы мелиссы и травы чабреца, оказался DES на основе бетаина гидрохлорида и пропиленгликоля в молярном соотношении 1:3. Оптимизация условий процесса, а именно экстракция 40%-м раствором DES-20 при температуре 60 °С, позволила добиться увеличения выхода флавоноидов из растительного сырья: количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило 10,09 мг/г сухого сырья, что сопоставимо и даже незначительно превышает выход флавоноидов при классическом методе экстракции 70%-м этиловым спиртом (9,7 мг/г сухого сырья). Таким образом, можно прийти к заключению, что новый, экологичный и безопасный способ экстракции БАВ из растительного материала перспективен и может являться достойной альтернативой классическим методам экстракции органическими растворителями. Дальнейшая разработка и оптимизация процесса использования DESs – многообещающее направление развития химии и фармацевтической технологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Turkmen N., Sari F., Velioglu Y.S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chem.* 2006;99:835–841. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.034.
2. Hayyan M., Hashim M.A., Hayyan A., Al-Saadi M.A., Alnashief I.M., Mirghani M.E. et al. Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* 2006;90(7):2193–2195. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.004.
3. Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R.L., Duarte A.R.C. Natural deep eutectic solvents solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014;2(5):1063–1071. DOI: 10.1021/sc500096j.
4. Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srcek V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Radojčić Redovniković I. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep

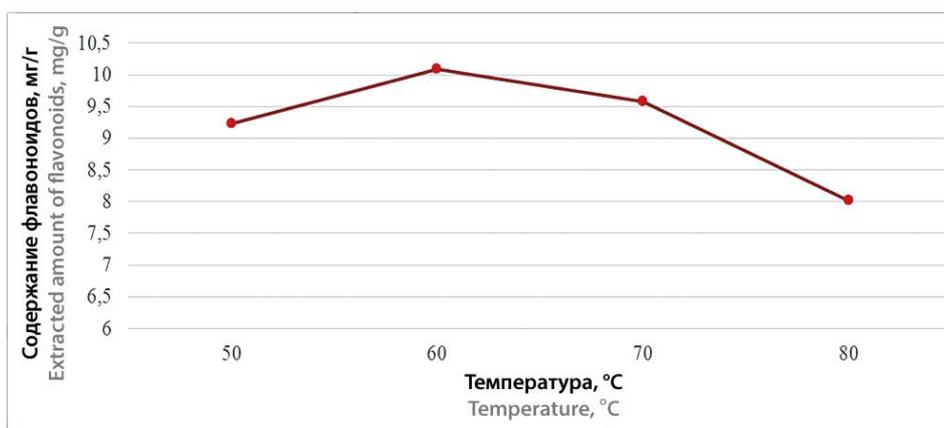


Рисунок 3. Содержание флавоноидов (мг/г) в экстрактах из растительного сбора на основе 40 % водного раствора DES-20, полученных при различных температурах

Figure 3. Flavonoid content (mg/g) in extracts from plant collection based on 40 % aqueous solution of DES-20 obtained at different temperatures

- eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015;112:46–53. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
5. Wen Q., Chen J. X., Tang Y. L., Wang J., Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere.* 2015;132:63–69. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.
 6. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
 7. Andrew C., Etim E. E., Ushie O. A., Job J. N. Deep eutectic solvents: an overview of its application as a "green" extractant. *IJARCS.* 2017;4(6):23–30. DOI: 10.20431/2349-0403.0406003.
 8. Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESS) and their applications. *Chem. Rev.* 2014;114(21):11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
 9. Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., Wu H., Zong M.-H., Lou W.-Y. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2015;3(11):2746–2755. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00619.
 10. Tang W., Li G., Chen B., Zhu T., Row K. H. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba*. *Sep. Sci. Technol.* 2016;52(1):91–99. DOI: 10.1080/01496395.2016.1247864.
 11. Obluchinskaya E. D., Daurtseva A. V., Pozharitskaya O. N., Fli-syuk E. V., Shikov A. N. Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from brown algae. *Pharm. Chem. J.* 2019;53(3):243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.
 12. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* 2003;70–71. DOI: 10.1039/b210714g.
 13. Mele A., Tran C. D., De Paoli Lacerda S. H. The structure of a room-temperature ionic liquid with and without trace amounts of water: the role of C–H...O and C–H...F interactions in 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Angew. Chem. Int. edit.* 2003;115(36):4500–4502. DOI: 10.1002/ange.200351783.
 14. Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. edit.* 2013;52(11):3074–3085. DOI: 10.1002/anie.201207548.
 15. Токарева М. Г., Прожогина Ю. Е., Каленикова Е. И., Джавахян М. А. Фармакогностические и фармакологические аспекты создания новых седативных препаратов на основе лекарственного растительного сырья. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2018;21(3):3–11. DOI: 10.29296/25877313-2018-03-01.
 16. Tursymatova O. I., Dilmakhanova M. M. Flavonoid physicochemical properties. *Science and world.* 2015;5(21):30–31.
 17. Бабаджанян А. А., Кайшева Н. А., Умняхина И. В. Применение фотометрических методов в анализе растительных лекарственных средств. *Беликовские чтения: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции.* 2015. 17–18 с.
 18. Shang X., Tan J.-N., Du Y., Liu X., Zhang Z. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljin-skaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules.* 2018;23(9):2110. DOI: 10.3390/molecules23092110.
 19. Dai Y., Row K. H. Application of natural deep eutectic solvents in the extraction of quercetin from vegetables. *Molecules.* 2019;24(12):2300. DOI: 10.3390/molecules24122300.
 20. Bajkacz S., Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Anal. Methods.* 2017;11:1330–1344. DOI: 10.1007/s12161-017-1118-5.
 21. Peng F., Zhao Y., Li F.-Z., Zong M.-H., Lou W.-Y. The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases. *Bioresources and Bioprocessing.* 2018;5:5. DOI: 10.1186/s40643-018-0191-y.
 22. Huang Y., Feng F., Jiang J., Qiao Y., Wu T., Voglmeir J., Chen Z.-G. Green and efficient extraction of rutin from tartary buck-wheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* 2017;221:1400–1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.013.
 23. Mulia K., Muhammad F., Krisanti E. Extraction of vitexin from bina-hong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). *AIP Conf. Proc.* 2017;1823. DOI: 10.1063/1.4978091.
 24. Bi W., Tian M., Row K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* 2013;1285:22–30. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.02.041.
 25. Abbott A. P., Al-Murshedi A. Y. M., Alshammari O. A. O. Thermodynamics of phase transfer for polar molecules from alkanes to deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilib.* 2017;448:99–104. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.05.008.
 26. Świergiel J., Bouteiller L., Jadzyn J. Compliance of the Stokes–Einstein model and breakdown of the Stokes–Einstein–Debye model for a urea-based supramolecular polymer of high viscosity. *Soft. Matter.* 2014;10:8457–8463. DOI: 10.1039/c4sm01556h.
 27. Dietrych-Szostak D., Oleszek W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Mönch) grain. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47(10):4384–4387. DOI: 10.1021/jf990121m.

REFERENCES

1. Turkmen N., Sari F., Velioglu Y. S. Effects of Extraction Solvents on Concentration and Antioxidant Activity of Black and Black Mate Tea Polyphenols Determined by Ferrous Tartrate and Folin-Ciocalteu Methods. *Food Chem.* 2006;99:835–841. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.08.034.
2. Hayyan M., Hashim M. A., Hayyan A., Al-Saadi M. A., Al-nashief I. M., Mirghani M. E. et al. Are deep eutectic solvents benign or toxic? *Chemosphere.* 2006;90(7):2193–2195. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2012.11.004.
3. Paiva P., Craveiro R., Aroso I., Martins M., Reis R. L., Duarte A. R. C. Natural deep eutectic solvents for the 21st century. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2014;2(5):1063–1071. DOI: 10.1021/sc500096j.
4. Radošević K., Cvjetko Bubalo M., Gaurina Srcek V., Grgas D., Landeka Dragičević T., Radojčić Redovniković I. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2015;112:46–53. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.09.034.
5. Wen Q., Chen J. X., Tang Y. L., Wang J., Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere.* 2015;132:63–69. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.02.061.
6. Dai Y., van Spronsen J., Witkamp G.-J., Verpoorte R., Choi Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal. Chim. Acta.* 2013;766:61–68. DOI: 10.1016/j.aca.2012.12.019.
7. Andrew C., Etim E. E., Ushie O. A., Job J. N. Deep eutectic solvents: an overview of its application as a "green" extractant. *IJARCS.* 2017;4(6):23–30. DOI: 10.20431/2349-0403.0406003.
8. Smith E. L., Abbott A. P., Ryder K. S. Deep eutectic solvents (DESS) and their applications. *Chem. Rev.* 2014;114(21):11060–11082. DOI: 10.1021/cr300162p.
9. Zhao B.-Y., Xu P., Yang F.-X., Wu H., Zong M.-H., Lou W.-Y. Biocompatible deep eutectic solvents based on choline chloride: characterization and application to the extraction of rutin from *Sophora japonica*. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 2015;3(11):2746–2755. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b00619.
10. Tang W., Li G., Chen B., Zhu T., Row K. H. Evaluating ternary deep eutectic solvents as novel media for extraction of flavonoids from *Ginkgo biloba*. *Sep. Sci. Technol.* 2016;52(1):91–99. DOI: 10.1080/01496395.2016.1247864.
11. Obluchinskaya E. D., Daurtseva A. V., Pozharitskaya O. N., Fli-syuk E. V., Shikov A. N. Natural deep eutectic solvents as alternatives for extracting phlorotannins from brown algae. *Pharm. Chem. J.* 2019;53(3):243–247. DOI: 10.1007/s11094-019-01987-0.

12. Abbott A. P., Capper G., Davies D. L., Rasheed R. K., Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* 2003;70–71. DOI: 10.1039/b210714g.
13. Mele A., Tran C. D., De Paoli Lacerda S. H. The structure of a room-temperature ionic liquid with and without trace amounts of water: the role of C–H...O and C–H...F interactions in 1-n-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate. *Angew. Chem. Int. edit.* 2003;115(36):4500–4502. DOI: 10.1002/ange.200351783.
14. Francisco M., van den Bruinhorst A., Kroon M. Low-Transition-Temperature Mixtures (LTTMs): a new generation of designer solvents. *Angew. Chem. Int. edit.* 2013;52(11):3074–3085. DOI: 10.1002/anie.201207548.
15. Tokareva M. G., Prozhogina Y. E., Kalenikova E. I., Dzha-vakhyan M. A. The pharmacognostic and pharmacological aspects of the creating of the new sedative drugs based on medicinal plant raw materials. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry.* 2018;21(3):3–11. (In Russ.) DOI: 10.29296/25877313-2018-03-01.
16. Tursymatova O. I., Dilmakhanova M. M. Flavonoid physicochemical properties. *Science and world.* 2015;5(21):30–31.
17. Babadzhanyan A. A., Kaisheva N. A., Umnyakhina I. V. Application of photometric methods in the analysis of plant medicines. *Belikov readings: materials of the IV All-Russian scientific and practical conference.* 2015. 17–18 p. (In Russ.)
18. Shang X., Tan J.-N., Du Y., Liu X., Zhang Z. Environmentally-friendly extraction of flavonoids from *Cyclocarya paliurus* (Batal.) iljinskaja leaves with deep eutectic solvents and evaluation of their antioxidant activities. *Molecules.* 2018;23(9):2110. DOI: 10.3390/molecules23092110.
19. Dai Y., Row K. H. Application of natural deep eutectic solvents in the extraction of quercetin from vegetables. *Molecules.* 2019;24(12):2300. DOI: 10.3390/molecules24122300.
20. Bajkacz S., Adamek J. Development of a method based on natural deep eutectic solvents for extraction of flavonoids from food samples. *Food Anal. Methods.* 2017;11:1330–1344. DOI: 10.1007/s12161-017-1118-5.
21. Peng F., Zhao Y., Li F.-Z., Zong M.-H., Lou W.-Y. The effect of deep eutectic solvents on the asymmetric hydrolysis of styrene oxide by mung bean epoxide hydrolases. *Bioresources and Bioprocessing.* 2018;5:5. DOI: 10.1186/s40643-018-0191-y.
22. Huang Y., Feng F., Jiang J., Qiao Y., Wu T., Voglmeir J., Chen Z.-G. Green and efficient extraction of rutin from tartary buckwheat hull by using natural deep eutectic solvents. *Food Chem.* 2017;221:1400–1405. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.013.
23. Mulia K., Muhammad F., Krisanti E. Extraction of vitexin from bina-hong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaves using betaine - 1,4 butanediol natural deep eutectic solvent (NADES). *AIP Conf. Proc.* 2017;1823. DOI: 10.1063/1.4978091.
24. Bi W., Tian M., Row K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *J. Chromatogr. A.* 2013;1285:22–30. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.02.041.
25. Abbott A. P., Al-Murshedi A. Y. M., Alshammari O. A. O. Thermodynamics of phase transfer for polar molecules from alkanes to deep eutectic solvents. *Fluid Phase Equilib.* 2017;448:99–104. DOI: 10.1016/j.fluid.2017.05.008.
26. Świergiel J., Bouteiller L., Jadzyn J. Compliance of the Stokes–Einstein model and breakdown of the Stokes–Einstein–Debye model for a urea-based supramolecular polymer of high viscosity. *Soft. Matter.* 2014;10:8457–8463. DOI: 10.1039/c4sm01556h.
27. Dietrych-Szostak D., Oleszek W. Effect of processing on the flavonoid content in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Möench) grain. *J. Agric. Food Chem.* 1999;47(10):4384–4387. DOI: 10.1021/jf990121m.