

ОТЧЕТ ПО ПРОЕКТ ЗА НАУЧНО И КАРИЕРНО РАЗВИТИЕ
НАЦИОНАЛНА ПРОГРАМА „МЛАДИ УЧЕНИ И ПОСТДОКТОРАНТИ“ II ЕТАП

**Тема: Неконвенционален метод за екстракция на биологично активни вещества от
обикновен глог с природни дълбоко евтектични смеси**

Участник: химик Христо Петков

Научен ръководител: доц. д-р Боряна Трушева

София, Февруари, 2021

Въведение (включва анотация на представения проект, цели, работна програма, предвидени дейности - до 2 стр.)

Дълбоко евтектичната смес (ДЕС) се дефинира като комбинация от два или три компонента, които са в състояние да установят водородна връзка помежду си. В резултат имаме течна система, която е с по-ниска точка на топене от тази на всеки един от отделните компоненти. При определена комбинация и съотношение природни съединения в твърдо състояние (първични метаболити) също могат да се превърнат в течности и да образуват т. нар. природни ДЕС. Те са невъзпламеними, нетоксични, биоразградими и безопасни за околната среда. От началото на 21-ви век природните ДЕС са обект на засилен научен интерес, поради своите ценни качества и приложение в органичния синтез и електрохимията. Съвсем наскоро за пръв път е изучен и потенциалът им като екстрахиращи агенти за извличане на биологично активни съединения от растения, като в някои от случаите се доказва, че този метод е по-ефективен от традиционно използваните подходи за екстракция с алкохол.

Глогът е лечебно растение, като в България най-разпространен е видът *Crataegus monogyna* Jacq. – обикновен глог. Листата и цветовете на различните видове глог съдържат разнообразни класове биологично активни вещества, поради което се използват традиционно с лечебна цел в народната и официалната медицина. От тях се приготвят различни екстракционни продукти - тинктура, запарка, отвара и др. Важни химични компоненти в листата и цветовете са флавоноидните гликозиди: хиперозид, кверцитрин, витексин, рутин, както и фенолните киселини – кафеена и хлорогенова. Съдържат се още катехини и проантоцианидини. Дрогата се прилага под формата на запарка и тинктура при лечение на леки форми на хипертония, сърдечни неврози, стенокардия, атеросклероза, безсъние и нервна възбуда, повишена функция на щитовидната жлеза и др.

Предлаганата в търговската мрежа тинктура от обикновен глог, съдържа висок процент етилов алкохол, който може да представлява опасност за страдащите от чернодробни заболявания, алкохолизъм, епилепсия, мозъчни увреждания, както и за бременни жени и кърмачки. Тази токсичност на етанола налага търсенето на алтернативни разтворители за екстракция. Досега няма данни в литературата за приложение на дълбоко евтектичните смеси за извличане на биологично активни компоненти от обикновен глог.

Цел на настоящия проект е да се проучи възможността за приложение на природни дълбоко евтектични смеси за извличане на биологично активни съединения от листа и цветове на обикновен глог.

За реализацията на поставената цел се предвижда да бъдат изпълнени следните **задачи**:

1) Получаване на различни по състав дълбоко евтектични смеси на базата на холин хлорид, лимонена киселина, ябълчена киселина, млечна киселина, бетаин, някои захари и др.;

2) Приготвяне на екстракти от листа и цветове на обикновен глог с използване на получените дълбоко евтектични смеси. Паралелно получаване на воден и водно-алкохолен екстракти, които да служат като референти за степента и ефективността на извличане на вторичните метаболити;

3) Спектрофотометрични анализи на екстрактите с цел определяне съдържанието на тотални феноли и тотални флавоноиди;

4) Определяне на радикал-улавящата способност на получените екстракти;

5) Анализ на резултатите и оценка на ефективността на извличане на биологично активните съединения от листа и цветове на обикновен глог посредством екстракция с природни ДЕС.

Като резултат от проведеното изследване за пръв път ще се проучи възможността за приложение на природните ДЕС за екстракция на биологично активни вещества от обикновен глог с цел избягване използването на традиционните токсични органични разтворители.

Приноси за развитието на младия учен: Заложените в проекта задачи са в пряка връзка с изследователската работа на участниците. Работейки по проекта, младият учен ще има възможността да приложи своите умения и да ги развие. Едновременно с това ще усвои нови знания и опит в областта на „зелената” химия, които ще може да приложи в бъдещата си работа.

Резултати и обсъждане (до 10 стр.)

За постигане на целите, заложи в проекта, предварително е направена задълбочена литературна справка. За екстракцията на вторични метаболити от листа и цветове на обикновен глог са подбрани и получени следните природни дълбоко евтектични смеси (ПДЕС), представени в таблица 1:

Компоненти	Абревиатура	Молно съотношение
Лимонена киселина:1,2-Пропандиол	CAPD	1:4
Млечна киселина:1,2-Пропандиол	LAPD	1:1
Холин Хлорид:1,2-Пропандиол	CCPD	1:3
Холин Хлорид:Глицерол	CCGly	1:2
Млечна киселина:Фруктоза	LAFr	5:1
Бетаин:Ябълчена киселина:Вода	BMAW	1:1:6
Холин Хлорид:Глюкоза:Вода	CCGluW	5:2:25
Холин Хлорид:Карбамид:Вода	CCUrW	1:1:6
Холин Хлорид:Лимонена киселина:Вода	CCCAW	1:1:8

Таблица 1

За референтни екстрахиращи агенти са използвани: дестилирана вода, 50%-ен етанол и 70%-ен етанол. Всички получени ПДЕС са подбрани така, че да бъдат близки по полярност със 70%-ния етанол.

Изследваният растителен материал е търговска проба (изображение 1) – сухи, ронени листа и цветове от обикновен глог (*Crataegi monoginae cum foliis*), смлени допълнително.



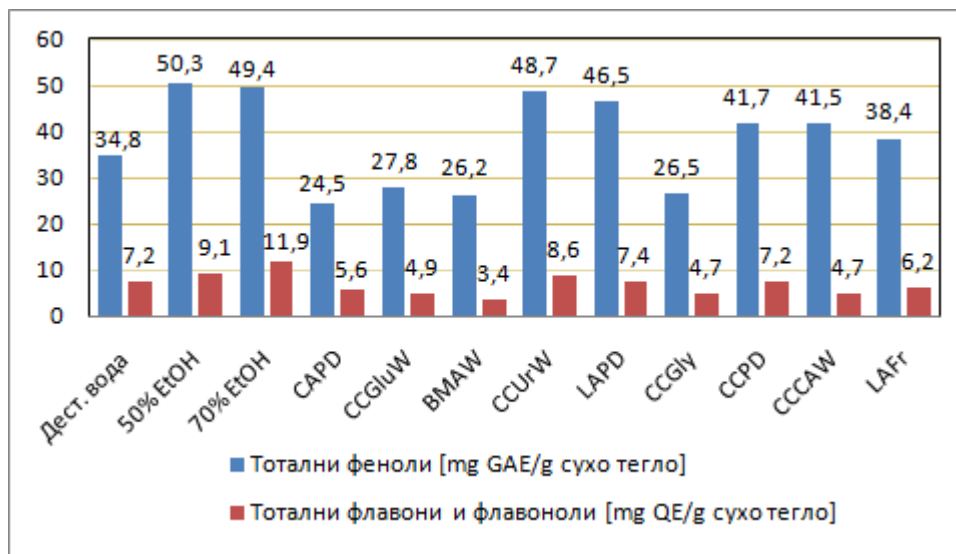
Изображение 1

Чрез извличане с ултразвук са получени 12 на брой екстракта, които впоследствие са анализирани.

Количествено е определено съдържанието на тоталните феноли и на тоталните флаволи и флавоноли в екстрактите. Резултатите са представени съответно в mg еквивалент галова киселина и кверцетин за грам сухо тегло (таблица 2 и диаграма 1):

Екстрахиращ агент	Тотални феноли [mg GAE/g сухо тегло]	Тотални флаволи и флавоноли [mg QE/g сухо тегло]
Дест. H ₂ O	34,8 ± 0,8	7,2 ± 0,7
50% EtOH	50,3 ± 1,0	9,1 ± 0,3
70% EtOH	49,4 ± 0,7	11,9 ± 0,6
CAPD	24,5 ± 0,2	5,6 ± 0,2
CCGluW	27,8 ± 0,4	4,9
BMAW	26,2 ± 0,6	3,4 ± 0,4
CCUrW	48,7 ± 1,0	8,6 ± 0,4
LAPD	46,5 ± 0,6	7,4 ± 0,3
CCGly	26,5 ± 0,3	4,7 ± 0,1
CCPD	41,7 ± 0,6	7,2 ± 0,3
CCCAW	41,5 ± 0,9	4,7 ± 0,3
LAFr	38,4 ± 0,1	6,2

Таблица 2



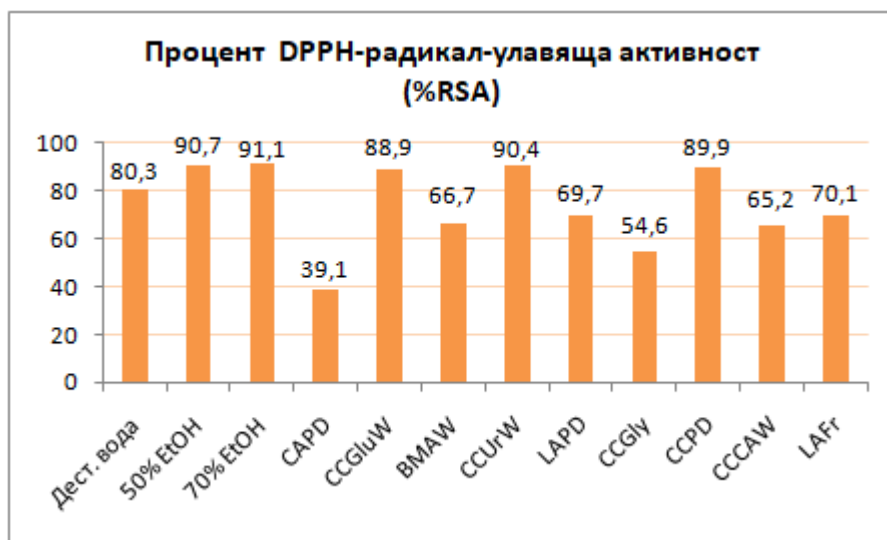
Диаграма 1

Количествата тотални феноли, извлечени с водно-етанолните разтвори, са съизмерими, докато най-много флаволи и флавоноли са екстрахирани със 70%-ния етанол. Пет от природните дълбоко евтектични смеси (CCUrW, LAPD, CCPD, CCCAW, LAFr) показват по-добри резултати от дестилираната вода от гледна точка на извлечените общи феноли, като сместа CCUrW показва съпоставими резултати дори с водно-алкохолните разтвори (~49 mg GAE/g сухо тегло).

Изследвани са DPPH-радикал-улавящите активности на дванадесетте екстракта, като резултатите са представени в таблица 3 и диаграма 2:

Екстрахиращ агент	Процент радикал-улавяща активност (%RSA)
Дест. H ₂ O	80,3 ± 0,3
50% EtOH	90,7 ± 0,2
70% EtOH	91,1 ± 0,2
CAPD	39,1 ± 1,1
CCGluW	88,9 ± 0,2
BMAW	66,7 ± 1,7
CCUrW	90,4 ± 0,2
LAPD	69,7 ± 2,0
CCGly	54,6 ± 0,7
CCPD	89,9 ± 0,2
CCCAW	65,2 ± 1,5
LAFr	70,1 ± 0,6

Таблица 3



Диаграма 2

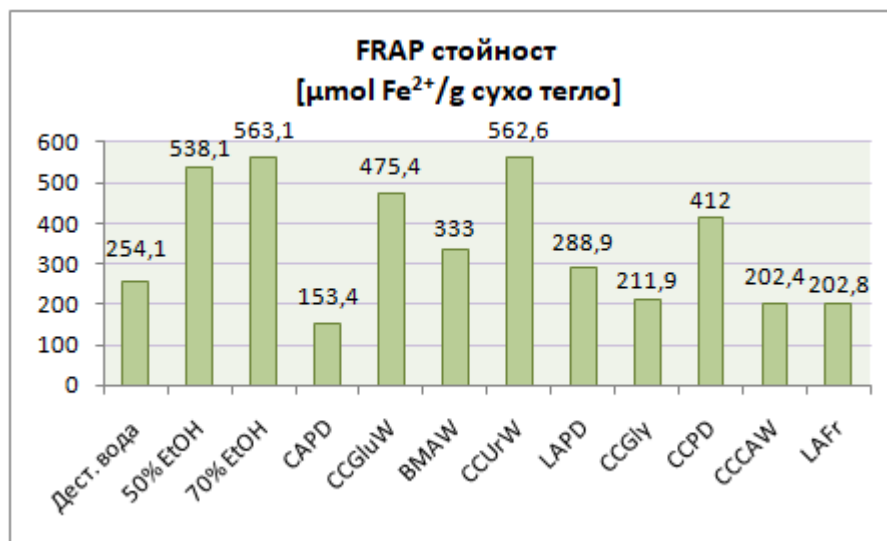
Най-висок процент (~90%) радикал-улавяща активност имат екстрактите, получени с 50%-ен EtOH, 70%-ен EtOH, CCUrW, CCPD и CCGluW. Докато за първите 4 екстракта това е очаквано, поради по-високото съдържание на феноли, флаволи и флавоноли, то не стои така въпросът с показаната значителна активност на извлекта, получен с CCGluW (88,9% RSA). Това може да се дължи на евентуален синергистичен ефект между компонентите на дълбоко евтектичната смес (холин хлорид, глюкоза, вода) и извлечените вещества. Също така е възможно наличие на друг клас съединения в екстракта, притежаващи радикал-улавящи свойства, което говори за известна

селективност на тази ПДЕС. Въпреки високото съдържание на феноли в извлеките, получени с LAPD, CCCAW и LAFr, техният процент на антирадикалова активност варира в граници от 65 до 70%.

Изучена е и желязо-редуциращата антиоксидантна сила (FRAP) на всеки от екстрактите. Резултатите са обобщени в таблица 4 и илюстрирани на диаграма 3:

Екстрахиращ агент	FRAP стойност [$\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ сухо тегло]
Дест. H_2O	$254,1 \pm 2,3$
50% EtOH	$538,1 \pm 2,0$
70% EtOH	$563,1 \pm 1,1$
CAPD	$153,4 \pm 3,3$
CCGluW	$475,4 \pm 30,5$
BMAW	$333,0 \pm 9,5$
CCUrW	$562,6 \pm 3,4$
LAPD	$288,9 \pm 21,3$
CCGly	$211,9 \pm 4,5$
CCPD	$412,0 \pm 8,6$
CCCAW	$202,4 \pm 15,0$
LAFr	$202,8 \pm 0,2$

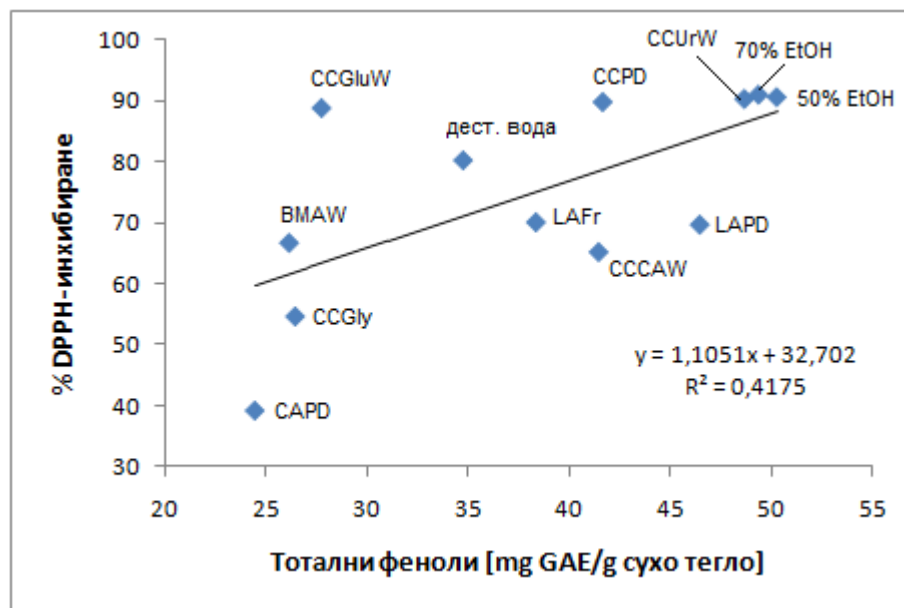
Таблица 4



Диаграма 3

Както при DPPH-анализа, така и при FRAP, най-добри резултати показват екстрактите, получени с 50%-ен EtOH, 70%-ен EtOH, CCUrW, CCPD и CCGluW. Извлекът, направен със сместа от холин хлорид, карбамид и вода (CCUrW), притежава най-силно изразена желязо-редуцираща сила, идентична с тази на 70%-ния EtOH ($\sim 563 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$ сухо тегло).

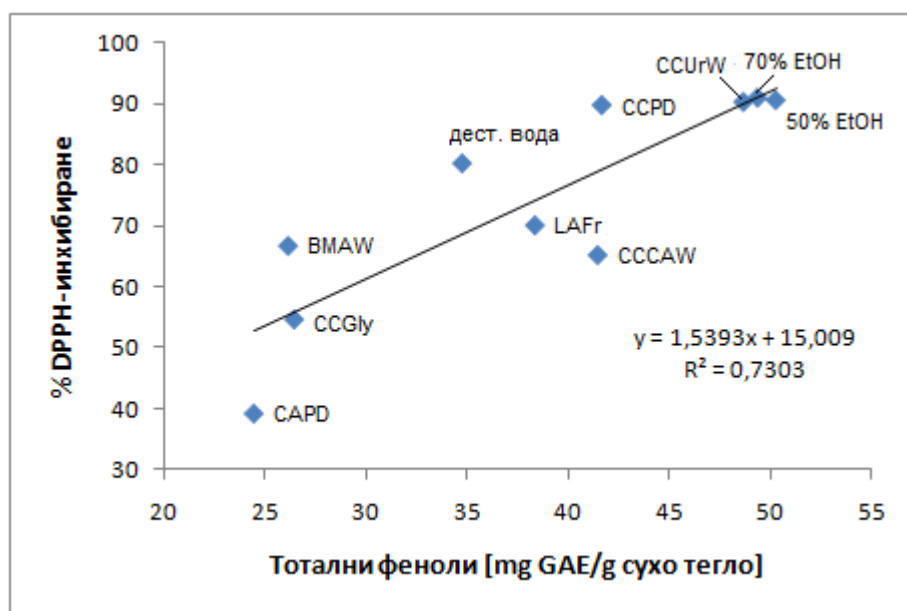
За да се проследи връзката между съдържанието на вторични метаболити, извлечени от листа и цветове на обикновен глог, и антиоксидантния потенциал на екстрактите, е извършен линеен регресионен анализ. На графика 1 е показана зависимостта между радикал-улавящата способност и количеството общи феноли, съдържащи се в извлеките:



Графика 1

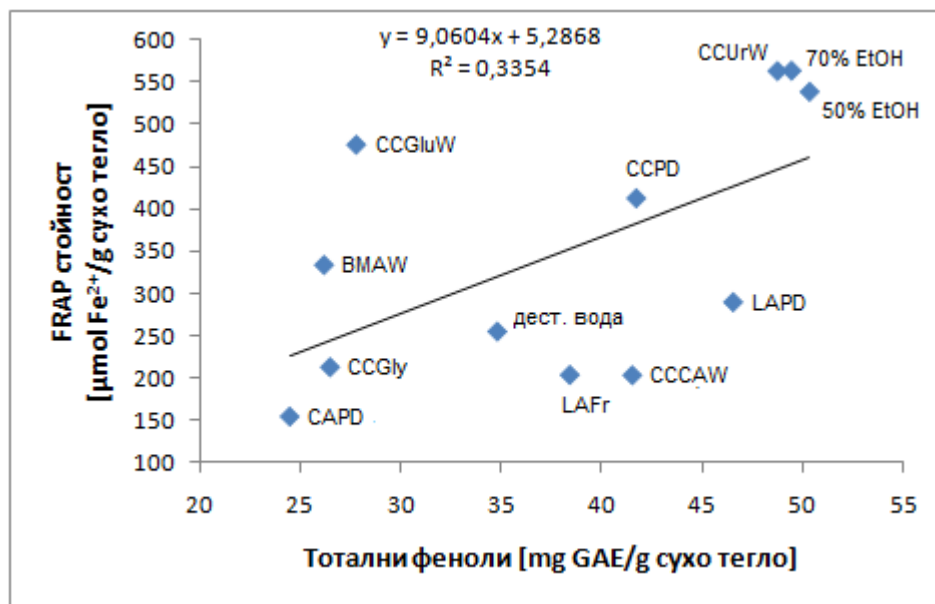
Взаимовръзката между двете променливи е оценена с детерминационен коефициент $R^2=0,4175$, което сочи, че корелацията между количеството тотални феноли и процентът на DPPH-инхибиране е сравнително ниска. Коефициентът на детерминация (R^2) е един от критериите за оценка адекватността на регресионния модел, като в граници от 0,7 до 0,9 се интерпретира като висок.

Детерминационният коефициент е нисък поради резултатите, които екстрактите с CCGluW и LAPD постигат. Извлекът, получен с CCGluW, съдържа малко количество общи фенолни съединения (~28 mg GAE/g), но показва голяма радикал-улавяща способност (~90%), а при LAPD се наблюдава обратната зависимост – висока концентрация на тотални феноли (46,5 mg GAE/g), но по-малък процент на радикалово инхибиране (~70%). Коефициентът на детерминация значително се подобрява ($R^2=0,7303$), когато тези два екстракта се изключат от регресионния анализ (графика 2):



Графика 2

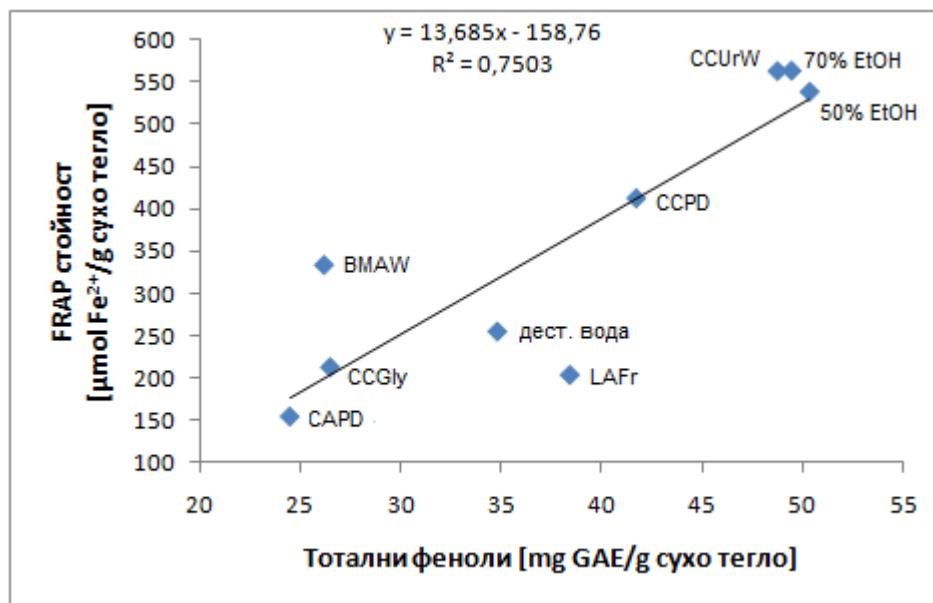
Зависимостта между количеството тотални феноли и желязо-редуциращата способност на екстрактите е представена на графика 3:



Графика 3

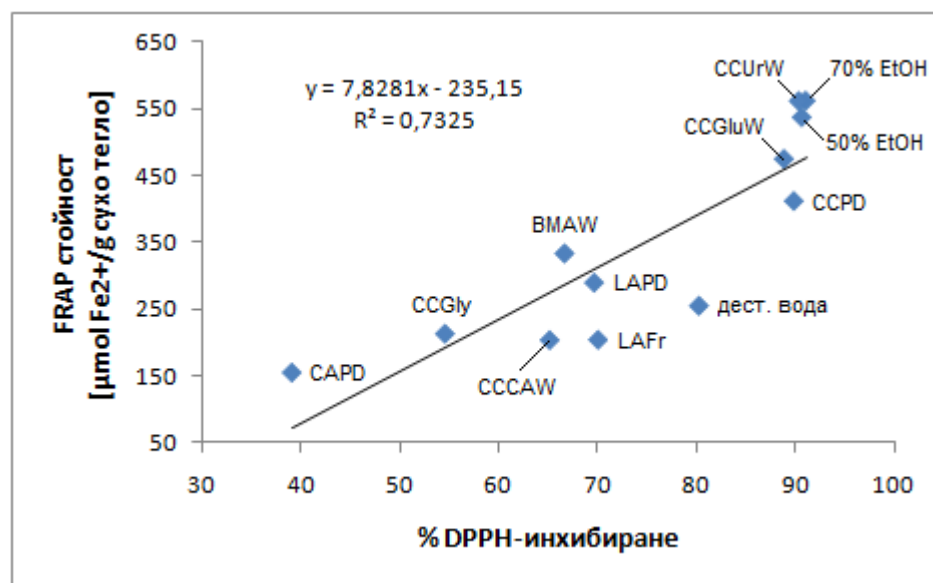
Тук отново имаме нарушена корелационна връзка ($R^2=0,3354$). Причина за това са отклоненията, които дават 3 от екстрактите – CCGluW, LAPD и CCCAW. Първият (CCGluW) съдържа малко количество тотални феноли (~28 mg GAE/g), но показва сравнително силна желязо-редуцираща способност (~475 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$). Вторият и

третият извлек (LAPD и CCCAW) са с висока концентрация на фенолни съединения (съответно 46,5 и 41,5 mg GAE/g), но демонстрират ниска FRAP стойност (288,9 и 202,4 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{g}$). След като бъдат елиминирани от статистическата обработка на резултатите (графика 4), детерминационният коефициент нараства значително ($R^2=0,7503$):



Графика 4

Определена е и взаимовръзката между желязо-редуциращата и DPPH-антирадикаловата активност на екстрактите (графика 5):



Графика 5

Корелацията е оценена с детерминационен коефициент $R^2=0,7325$, което говори за стабилна взаимовръзка между DPPH и FRAP свойствата на извлеките.

Изводи/Обобщение

Изводите, които могат да се направят от проведените изследвания са следните:

- ▶ За пръв път е проучена възможността за приложение на природни ДЕС като разтворители за екстракция на биологично активни вещества от обикновен глог (*Crataegus monogyna*);
- ▶ Природната дълбоко евтектична смес между холин хлорид, карбамид и вода (CCUrW) в молно съотношение 1:1:6 показва идентични резултати с водно-алкохолните разтвори като екстрахиращи агенти на листа и цветове от обикновен глог, което от своя страна прави тази ПДЕС „зелена” алтернатива на токсичния органичен разтворител етанол.
- ▶ Възможно е наличие на синергистичен ефект между компонентите на природните смеси и извлечените от глога съединения, което да обяснява повишената радикал-улавяща и желязо-редуцираща способност на някои от екстрактите;

Публикации и участия на научни форуми

Дата: 01.02.2021 г.

Изготвил:

/химик Христо Петков/