

APPLICATION OF CLASSICAL METHODS TO ISOLATION OF RUTIN FROM ORIENTAL TOBACCOS

M. Docheva¹ and S. Dagnon²

*¹Tobacco and Tobacco Products Institute, Markovo 4108, Plovdiv,
Bulgaria, margarita_1980@abv.bg*

*²Faculty of Chemistry Dep. of Organic chemistry „Tzar Assen“ str. 24,
Plovdiv 4000, Bulgaria, dagnon@uni-plovdiv.bg*

ABSTRACT

Major commercial sources of rutin include *Sophora japonica*, *Eucalyptus* spp., *Fagopyrum sculentum* and *Ruta graveolens*. However, the necessity of identifying a better cheaper commercial source of rutin is still valid. Tobacco is a rich source of this medicinally important flavonoid. Especially the Oriental tobaccos grown in Bulgaria contain large amount of rutin, approximately 1% and potentially can be used commercially to obtain a product rich of this natural antioxidant. In this study the classical methods of extraction and isolation of rutin from Oriental tobaccos were investigated. By using analytical HPLC, the amounts of rutin present in the tobacco leaves and extracts were determined. The largest amount of rutin was obtained by water extraction with heat reflux and liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The results of the quantitative determinations by HPLC of rutin show the amounts of 0.93% or 9.3 mg/g rutin in tobacco leaves and 0.7 mg/g in the obtained extract.

Key words: *polyphenols, HPLC, rutin, tobacco*

ВЪВЕДЕНИЕ

Ориенталските тютюни са основен тип тютюни, отглеждани в България. Те са дребнолистни и изсушените листа са съдържателни с нежна структура и тънък главен нерв, цвят жълто-оранжев, оранжев, оранжево-червен до червен със слаб зеленикав оттенък. Листата имат висок цигарен рандеман, отлична горяемост, много фин, приятен и уникален по своята си същност аромат. Басмите се отличават и с високото си съдържание на полифеноли [3].

Полифенолите са известни със своята биологична активност. Те притежават противовъзпалителни, антиалергични, антивирусни, противогъбични, антиоксидантни, кардиопротективни, противотуморни свойства, както и съдоразширяващ ефект. Делят се на четири основни групи: фенолни киселини, флавоноиди, танини, стилбени и лигнани. Флавоноидите са най-голямата група полифеноли – включват над 4000 представителя, като броят им непрекъснато расте [1].

Основните компоненти на полифенолния комплекс при Басмите са фенолните киселини – хлорогенова киселина и нейните изомери – неохлорогенова киселина и 4-О-кафеоилхинова киселина, и флавоноидите рутин и кемпферол-3-рутинозид [2, 5].

Рутинът принадлежи към групата на флавоноидите. Основното му действие е заздравяването на стените на капилярите. Има изразени антиоксидантни, противовъзпалителни, противоалергични и антивирусни свойства. Рутинът усилва действието на витамин С. Има индикации, че той подтиска туморните клетки на дебелото черво [1]. В аптечната мрежа се предлагат хранителни добавки от рутин предвид свойствата, които притежава.

Основните природни източници на рутин са Японска акация (*Sophora japonica*), Евкалипт (*Eucalyptus* spp.), Обикновена елда (*Fagopyrum esculentum*) и Седефче (*Ruta graveolens*). Тютюните от сортова група Басми отглеждани в България са богат източник на този флавоноид. Съдържанието му е приблизително 1% (10 mg/g) [2, 3]. Тези тютюни се отглеждат на плитките почви с ниско хумусно съдържание (до 1 – 2%) и не е необходимо торене, и поливане като постоянни практики. Предвид не сложната и икономична агротехника, Басмите представляват евтин източник на рутин, който може да бъде използван за промишлено му получаване [4].

Целта на изследването е да се извлече максимално количество рутин от тютюна и той да бъде изолиран и пречистен от фенолните киселини – хлорогеновата киселина и нейните изомери неохлорогенова киселина и 4-О-кафеоилхинова киселина.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

Изследването се извърши с ферментиран, смлян на прах тютюн от сортова група Басми, екотип Джебел Басма, реколта 2010 г. Адекватна проба от тютюна беше анализирана за съдържание на полифеноли по описания метод с ВЕТХ от Dagnon, Edreva, 2003 [2]. За целта беше използван течен хроматограф Клауер с кватернерна помпа, детектори: DAD и флуоресцентен RF 10Ax1 и аналитична колона Purosper[®]star RP-18e 25 cm x 4.6 mm i.d., 5 µm particle size (Merck, Germany).

Методи за извличане и изолиране на рутин от тютюна

Описанието на методите, които използвахме за извличане и изолиране на рутин от тютюна, както и съответните добиви на рутин са дадени в Таблица 1.

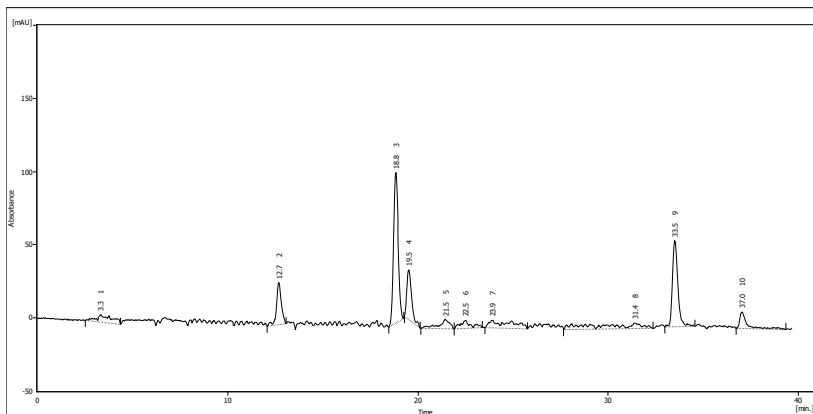
Присъствието на рутин в получените екстракти и фракции беше проследено с помощта на тънкослойна хроматография, а количеството му беше определено по метода за полифеноли с ВЕТХ.

Таблица 1. *Методи на извличане и изолиране на рутин от тютюн от екотип Джебел Басма*

Методи за екстракция	Методи за изолиране	Рутин mg/g
Вода при кипене 30 min	Течно-течна екстракция с етилацетат Колонна хроматография със силикагел Етилацетат: метанол: вода	0.08
Вода при кипене 120 min	Течно-течна екстракция с етилацетат	0.70
60% метанол	Колонна хроматография със силикагел Етилацетат: метанол	0.62
70% метанол	Течно-течна екстракция с етилацетат	0.34
Етилацетат: метанол (1:1 v/v)	-	9.05
Етилацетат: метанол (1:1 v/v)	Колонна хроматография със силикагел Етилацетат: метанол	2.02
Метанол	-	Следи
Етилацетат	-	Следи

РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЯ

Хроматографският профил на полифенолния комплекс в тютюн от сортава група Басми, екотип Джебел Басма е представен на Фигура 1.



Фигура 1. ВЕТХ анализ на полифеноли на тютюн.

Пикове с $t_R=12.7$, $t_R=18.5$ и $t_R=19.5$ (2, 3, 4) са идентифицирани като фенолни киселини, хлорогенова киселина и изомери.

Пика с $t_R=33.5$ (9) е идентифициран като рутин, а пика с $t_R=37.0$ (10) като кемферол-3-рутинозид.

Таблица 2 съдържа получените резултати от количествения анализ на полифенолите в тютюна.

Таблица 2. Съдържание на полифеноли (mg/g) при тютюн от екотип Джебел Басма

Полифеноли	mg/g
Неохлорогенова киселина	2,07
Хлорогенова киселина	11,1
4-о-кафеилхинова киселина	4,14
Рутин	9,37
Кемферол-3-рутинозид	1,62

Сравнявайки данните за рутин в Таблица 1 и Таблица 2 се вижда, че пълно извличане на рутин (9,05 mg/g) се постига със смес от етилацетат: метанол (1:1 v/v). Данните за съдържанието на полифеноли в получения екстракт са дадени в Таблица 3.

Таблица 3. *Съдържание на полифеноли в екстракт от тютюн, извлечени със смес от етилацетат:метанол (V/V = 1:1)*

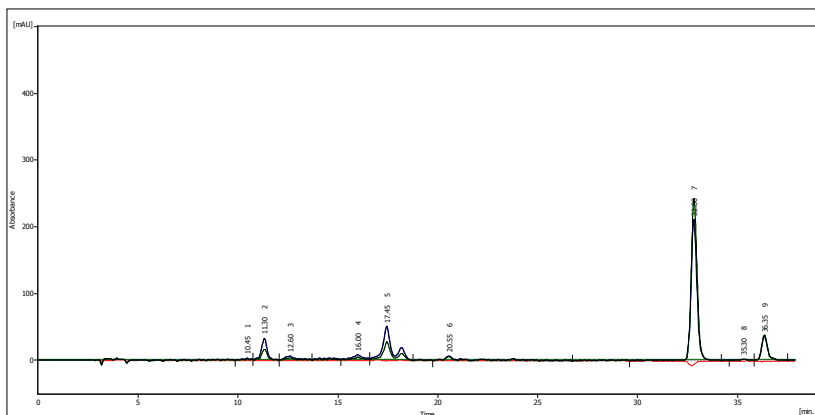
Полифеноли	mg/g
Неохлорогенова киселина, Хлорогенова киселина, 4-о-кафеoilхинова киселина	6,28
Рутин	9,05
Кемферол-3-рутинозид	следи

При този метод на екстракция селективно се извлича рутина, докато количеството на фенолните киселини е около една трета от тяхното съдържание в тютюна (Таблица 1 и Таблица 3). В Таблица 4 са представени резултатите за съдържанието на рутин и фенолни киселини във фракцията получена при колонната хроматография на силикагел и елуенти етилацетат: метанол.

Таблица 4. *Съдържание на полифеноли във фракцията получена с колонна хроматография със силикагел и елуенти етилацетат: метанол*

Полифеноли	mg/g
Неохлорогенова киселина, Хлорогенова киселина, 4-о-кафеoilхинова киселина	0,74
Рутин	2,02
Кемферол-3-рутинозид	следи

Съдържанието на рутин във фракцията е 2,02mg/g, докато количеството на фенолните киселини и кемпферол-3-рутинозид намалява значително до следи (Таблица 4). Хроматограмата получена при ВЕТХ анализ на фракцията от колонната хроматография показва, че тя е обогатена на рутин (Фигура 2). На нея ясно се вижда намаленото количество на фенолните киселини.



Фигура 2. ВЕТХ анализ на фракцията обогатена на рутин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Извършено е изследване при което е установена аналитична техника за селективно извличане на рутин от тютюн със смес от етилацетат: метанол (1:1 v/v). Определени са параметрите за изолиране на рутин от тютюн чрез колонна хроматография със силикагел и елуенти етилацетат: метанол.

Изследванията са финансирани по проект от Фонд „Научни изследвания“ към Пловдивски университет МУ 11 ХФ 003.

ЛИТЕРАТУРА

1. B. H. Havsteen, *Pharmacology&therapeutics*, 96 (2002) 67–202.
2. S. Dagnon, A. Edreva, *Beitr. Tabakforsch. Int.*, 20 (2003) 355–359.
3. S. Dagnon, D. Dimanov, *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 13 (2007) 459–466.
4. F. Fathiazad, A. Delazar, R. Amiri, S. D. Sarker, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 3 (2006) 222–227.
5. H. Wang, M. Zhao, B. Yang, Y. Jiang, G. Rao, *Food Chemistry*, 107 (2008) 1399–1406.