

## Влияние параметров термической обработки травы золотарника канадского на экстракцию флавоноидов

*Лукашов Р. И., Гурина Н. С.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,  
г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Установлено положительное влияние предварительной термической обработки на последующую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадского. Экспериментально подобраны оптимальные параметры проведения предварительной термической обработки: температура обработки — 120 °С; продолжительность обработки — 1 ч; степень измельчения сырья — (500), толщина слоя сырья 2–4 мм. Качественный состав доминирующих флавоноидов в нативном и термически обработанном сырье не различался. Критическими факторами при проведении предварительной термической обработки можно считать температуру обработки и степень измельчения сырья.

**Ключевые слова:** золотарник канадский, термическая обработка, флавоноиды.

**Введение.** Золотарник канадский — травянистое растение семейства *Asteraceae*, широко произрастающее на территории Республики Беларусь. Это инвазивный вид для Беларуси, который вытесняет аборигенные виды растений, несет угрозу популяциям редких и исчезающих видов. Одним из методов борьбы с ним является скашивание надземной части (травы) два раза в год: в мае и августе [1].

Несмотря на инвазивность вида в Европе золотарник канадский включен наряду с золотарником гигантским в Европейскую фармакопею и используется для заготовки травы, стандартизацию которой проводят по флавоноидам (суммарное содержание составляет не менее 2,5 %) [2].

В августе наблюдается массовое цветение золотарника канадского на территории Беларуси. Заготовка травы в этот период нерациональна ввиду того, что при естественной сушке соцветия золотарника канадского распадаются на отдельные части, формируются плоды и сырье становится непригодным для последующего использования в технологических процессах получения лекарственных средств. Целесообразно срезать верхушку надземной части в начале цветения. При этом заготовка травы золотарника канадского для фармацевтической промышленности может стать одним из методов борьбы с этим растением и в то же время рациональным приемом использования природных ресурсов. Предлагается скашивать заросли золотарника канадского в июле в период начала цветения. Из скошенной надземной части отрезать верхушки с соцветиями не более 30–40 см, которые будут являться морфологической группой сырья «Травы» и могут использоваться для получения экстрактов.

Трава золотарника канадского в форме жидкого экстракта 1:1 входит в состав лекарственного средства «Простанорм», который применяют при хроническом простатите и доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Данное средство зарегистрировано в Республике Беларусь [3].

Для повышения эффективности использования травы золотарника канадского в целях получения лекарственных средств рекомендуется увеличить выход флавоноидов путем предварительной обработки воздушно-сухого сырья. Одним из таких способов может стать термическая обработка, которая представляет собой воздействие высоких температур на высушенное сырье, сопровождающееся разрушением клеточных и субклеточных структур, стенок специальных образований (влагалищ, млечников и т. п.), удалением влаги и деструкцией растительных ферментов.

Флавоноиды, как правило, локализируются в вакуолях (гликозидные формы), смоляных и эфиромасличных ходах, каналах, вместилищах, железках, хлоропластах (агликоны). При этом при проведении экстракции зачастую экстрагент не так глубоко проникает в частички лекарственного растительного сырья, чтобы наиболее полно извлечь из него данную группу действующих веществ. Это связано, прежде всего, с недостаточной степенью измельчения, которая на сегодняшний момент является фактически единственным способом предварительной подготовки лекарственного растительного сырья. Весьма сложно добиться такой степени измельчения, при которой повреждаются все структуры, накапливающие флавоноиды. Повреждение таких структур сопровождается большим выходом действующих веществ в экстрагент и, соответственно, увеличением их концентрации в конечной галеновой лекарственной форме.

Важным фактором, способствующим снижению концентрации флавоноидов, является влага. Водная среда представляет собой фазу, в которой протекает большинство реакций деструкции флавоноидов (гидролиз, окисление в присутствии кислорода воздуха и т. п.). Удаление свободной влаги при термической обработке также будет способствовать сохранению действующих веществ.

Ряд фенолоксидаз [4] сохраняет свою активность в высушенном лекарственном растительном сырье и при последующей экстракции может вызывать деструкцию флавоноидов в жидкой среде экстрагента. Одним из эффективных способов денатурации ферментов является тепловое воздействие, которое сопровождается разрушением структур белковой молекулы различных уровней.

Таким образом, температура, действуя на различные процессы в лекарственном растительном сырье, в совокупности должна приводить к увеличению экстракции биологически активных веществ.

**Цель работы** — изучение влияния параметров термической обработки травы золотарника канадского на последующую экстракцию флавоноидов.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила трава золотарника канадского, заготовленная в местах естественного произрастания в окрестностях г. Витебска (д. Ольгово) в фазу массового цветения в конце августа 2018 г. Срезали 30–40 см от верхушки.

Собранное сырье подвергли воздушно-теневого сушке и до проведения исследований хранили в бумажных пакетах. Воздушно-сухое сырье измельчали (500), взвешивали, помещали в фольгу и подвергали предварительной термической обработке в сушильном шкафу при температурах: 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160 и 180 °С в течение различных промежутков времени (0,5; 1; 1,5; 2; 3 и 6 ч). Также последовательно исследовали цельное, резаное и измельченное сырье; различные массы сырья (10 и 20 г); сырье, завернутое в фольгу, и сырье, подвергавшееся обработке без упаковывания при вентилировании; различную толщину слоя сырья: 1–2, 2–4 и 4–6 см.

В качестве реактивов использовали 96 % спирт *P*, воду *P*, кислоту уксусную разведенную *P*, алюминия хлорид *P*, гексаметилентетрамин *P*.

Исследования проводили при помощи спектрофотометрического метода и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Испытуемые растворы для анализа получали, используя ранее подобранные условия экстракции [5, 6].

**Спектрофотометрический анализ.** К 20,0 мл испытуемого раствора прибавляли 150 мл 96%-ного спирта *P*, 2,00 мл кислоты уксусной разведенной *P*, 30,0 мл раствора 50 г/л алюминия хлорида *P* в спирте

(70 %, об/об) Р, 40,0 мл раствора 70 г/л гексаметилентетрамина Р и довели водой Р до объема 250 мл. Измерение оптической плотности проводили через 20 мин при 407 нм. Пересчитывали содержание суммы флавоноидов на изокверцитрин методом одного стандарта.

**ВЭЖХ.** Извлечения анализировали на жидкостном хроматографе *Agilent 1260* в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G5611A, диодно-матричным детектором G1315D, термостатом колонок G1316C, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G5667A. Сбор данных, обработка хроматограмм и спектров поглощения осуществлялась при помощи программы *Agilent Open LAB*.

Использовали хроматографическую колонку *Zorbax SB* длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненную силикагелем октадецилсилильным для хроматографии Р с размером частиц 5 мкм, температура колонки составила 30 °С.

Подвижная фаза — смесь ацетонитрила Р и 0,01 М раствора калия дигидрофосфата Р, доведенного кислотой фосфорной Р до рН 3,0±0,2, в соотношении 20:80 (об/об). Режим элюирования — изократический. Скорость подвижной фазы — 1,0 мл/мин. Объем инжектируемой пробы — 20,0 мкл. Температура в автосэмплере — 25 °С.

Длина волны детекции — 360 нм. Записаны спектры поглощения исследуемых веществ в диапазоне длин волн от 190 до 400 нм.

Идентификацию флавоноидов проводили путем сопоставления коэффициентов удерживания и спектров поглощения веществ в исследуемых извлечениях со стандартными образцами флавоноидов; базой, которая включала спектральные и хроматографические характеристики 27 флавоноидных соединений: агликонов, моно- и дигликозидов [7].

Параллельно с получением исследуемых извлечений готовили для инжектирования растворы стандартных образцов рутина, изокверцитрина, гиперозида и гвайяверина.

Концентрации идентифицированных флавоноидов в мкг/мл рассчитывали при помощи метода внешнего стандарта. Удельное содержание индивидуальных флавоноидов определяли методом внутренней нормализации.

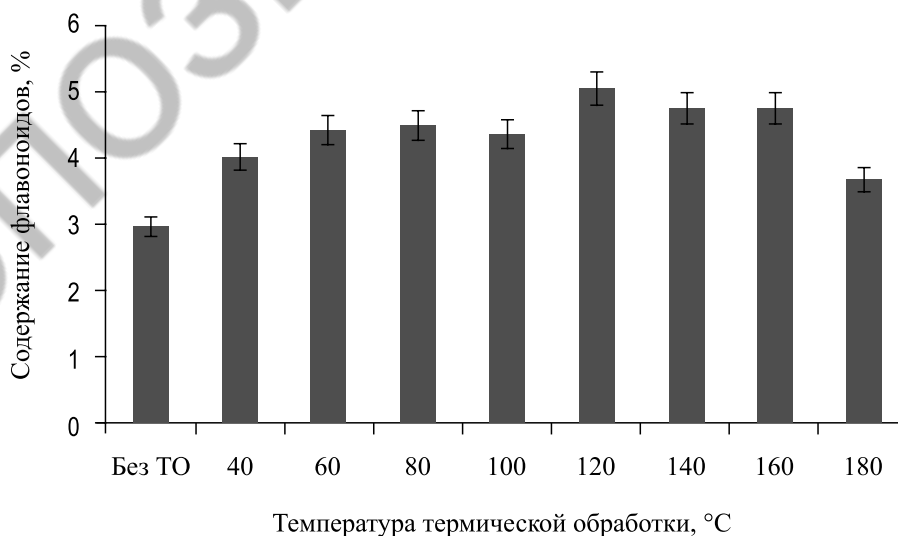
Статистическую обработку проводили при помощи компьютерных программ *Microsoft Office Excel 2007* (пакет «Анализ данных») и *Statistica Advanced 10.0*. Каждое испытание выполняли три раза ( $n = 3$ ).

Результаты представляли в виде

$$\bar{X} \pm \Delta_x,$$

где  $\bar{X}$  — среднее значение;  $\Delta_x$  — полуширина доверительного интервала. Значения статистически значимо различались при  $p < 0,05$  по  $t$ -критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** На рисунках 1 и 2 представлены зависимости содержания суммы флавоноидов в пересчете на изокверцитрин от температуры и продолжительности проведения предварительной термической обработки травы золотарника канадского соответственно.



**Рисунок 1** — Зависимость суммарного содержания флавоноидов от температуры термической обработки (Без ТО — в отсутствие термической обработки (нативное лекарственное растительное сырье))

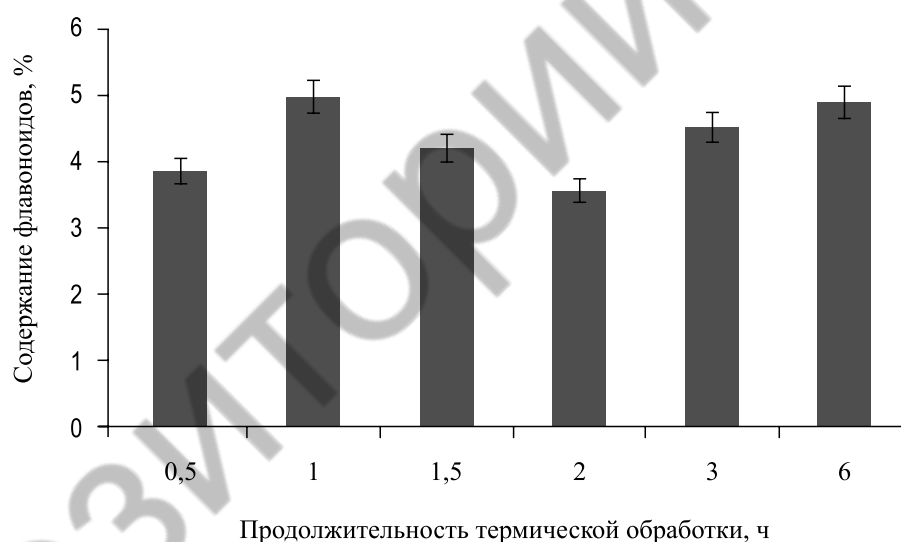
Из рисунка 1 видно, что трава золотарника канадского, подвергаясь термической обработке при различных температурах, содержала в 1,2–1,7 раза больше флавоноидов, чем нативное сырье, что указывало на термическую активацию изучаемого сырья. Термическая активация сырья сопровождается увеличением последующей экстракции из него действующих веществ.

Наибольшая экстракция флавоноидов отмечена для сырья, подвергнутого термической обработке при 120 °С. В нем полностью отсутствует свободная влага. При такой температуре растительные ферменты, участвующие в процессах деструкции флавоноидов, полностью теряют свою активность, что способствует большему выходу флавоноидов из сырья при последующей экстракции.

При увеличении температуры обработки от 40 до 120 °С наблюдали плавное увеличение содержания флавоноидов, что может быть связано с постепенным послойным разрушением структур, содержащих флавоноиды и повышением их доступности для экстракции. Также плавное увеличение содержания флавоноидов может быть связано с постепенной деструкцией ферментов и уменьшением содержания влаги в сырье при повышении температуры.

При переходе в ряду температур от 120 до 180 °С выявлено плавное снижение содержания флавоноидов, что связано с деструкцией флавоноидов в результате окисления кислородом воздуха. В этом случае из-за высокой температуры и разрушения структур, содержащих флавоноиды, увеличивалась доступность последних для действия кислорода воздуха. При температурах 60–80 и 140–160 °С наблюдали два плато содержания флавоноидов.

Содержание флавоноидов в сырье, обработанном при температурах 120 и 140 °С, статистически значимо различалось (24,2 % (отн.),  $p = 4,62 \cdot 10^{-2}$ ).



**Рисунок 2 — Зависимость суммарного содержания флавоноидов от продолжительности термической обработки**

При анализе данных на рисунке 2 выявлено, что термическая обработка травы золотарника канадского в течение одного часа способствовала наиболее полной последующей экстракции флавоноидов. Минимум содержания отмечен для двухчасовой термической обработки. Дальнейшее нагревание (до 6 ч) способствовало увеличению экстракции флавоноидов до уровня трехчасовой термической обработки (1,1 % (отн.),  $p = 1,96$ ).

Характер зависимости, представленной на рисунке 2, связан с тем, что сначала разрушение клеточных и субклеточных структур происходит в эпидерме (максимум при одночасовой обработке). Затем при более длительном тепловом воздействии протекает деструкция «доступных» флавоноидов под действием кислорода воздуха. В дальнейшем происходит разрушение структур более глубоких основных тканей, содержащих данные биологически активные вещества, что в итоге приводит вновь к увеличению их экстракции.

Изучали влияние на содержание флавоноидов следующих параметров предварительной термической обработки: степень измельчения, наличие упаковки и толщину слоя сырья.

Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Содержание флавоноидов при различных параметрах термической обработки

Изучаемый параметр	Содержание флавоноидов, %
<b>Степень измельчения сырья</b>	
Порошок (500)	5,05 ± 0,24
Резаное	3,14 ± 0,23
Цельное	3,03 ± 0,19
<b>Наличие упаковки</b>	
Без упаковки	7,34 ± 0,68
Помещенное в фольгу	7,24 ± 0,79
<b>Толщина слоя сырья</b>	
Слой до 2 см	5,19 ± 0,65
Слой 2–4 см	7,46 ± 0,77
Слой 4–6 см	6,42 ± 0,98

Из таблицы 1 видно, что наибольшее содержание флавоноидов характерно для порошкованного сырья (500) при слое толщиной 2–4 см. При уменьшении толщины слоя содержание снижалось на 43,3 % (отн.) ( $p = 2,6 \cdot 10^{-4}$ ), что обусловлено доступностью флавоноидов разрушенных структур для окисления кислородом воздуха и обугливанием сырья. При увеличении толщины слоя до 6 см содержание также снижалось в виду неравномерности нагревания всей массы сырья. Сырье, помещенное в фольгу, и сырье без упаковки содержали примерно равное количество флавоноидов, т. е. наличие упаковки не влияло на равномерность действия термического фактора. Наличие непосредственного контакта сырья с теплоносителем и присутствие теплопроводника (фольги) не влияло на содержание флавоноидов. При этом можно говорить о том, что ведущим механизмом повышения последующей экстракции является деструкция клеточных и субклеточных структур и растительных ферментов.

Для оценки влияния параметров предварительной термической обработки травы золотарника канадского на содержание флавоноидов провели дисперсионный анализ. Уровни значимости при анализе следующих факторов: температуры, продолжительности обработки, степени измельчения сырья, наличия упаковки и толщины слоя сырья составили  $2,77 \cdot 10^{-5}$ ;  $3,33 \cdot 10^{-3}$ ;  $7,55 \cdot 10^{-5}$ ;  $1,17 \cdot 10^{-1}$  и  $7,56 \cdot 10^{-3}$  соответственно. Все изученные факторы, кроме наличия упаковки, статистически значимо влияли на содержание флавоноидов. Наиболее критическими факторами явились температура обработки и степень измельчения сырья. Таким образом, при проведении термической обработки травы золотарника канадского необходимо четко соблюдать температурный режим обработки и степень измельчения сырья.

Методом ВЭЖХ анализировали качественный и количественный состав доминирующих флавоноидов нативного и термически обработанного сырья (таблица 2).

Таблица 2 — Удельные содержание доминирующих флавоноидов в термически обработанной и нативной траве золотарника канадского

Название флавоноида	Нативное сырье	Термически обработанное сырье
Рутин	7,4 ± 0,9	7,9 ± 0,6
Изокверцитрин	69,8 ± 1,4	69,4 ± 1,2
Гвайяверин	9,7 ± 0,9	8,7 ± 0,8
Гиперозид	13,1 ± 1,2	14,0 ± 1,2

Из таблицы 2 видно, что удельное содержание индивидуальных флавоноидов в нативном и термически активированном сырье практически не различалось.

**Заключение.** Предварительная термическая обработка позволяет повысить последующую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадского в 1,7 раза. Выявлены следующие оптимальные параметры предварительной термической обработки травы золотарника канадского: температура обработки — 120 °С; продолжительность обработки — 1 ч; степень измельчения — (500), толщина слоя обрабатываемого сырья 2–4 мм. Значимо на содержание флавоноидов не влияет наличие упаковки. Критическими факторами предварительной термической обработки травы золотарника канадского являются температура обработки и степень измельчения сырья. Качественный состав доминирующих флавоноидов нативного и термически активированного сырья практически идентичен.

### Литература

1. Внимание! Золотарник канадский [Электронный ресурс]. — Режим доступа : [http://myadel.minsk-region.by/ru/info\\_naseleniyu-ru/view/vnimanie-zolotarnik-kanadskij-9418/](http://myadel.minsk-region.by/ru/info_naseleniyu-ru/view/vnimanie-zolotarnik-kanadskij-9418/). — Дата доступа : 19.09.2019.
2. European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition [Электронный ресурс]. — Mode of access : <http://www.edqm.eu/>. — Date of access : 09.08.2017.
3. Простанорм [Электронный ресурс]. — Режим доступа : <https://apteka.103.by/prostanorm-instruktsiya/>. — Дата доступа : 18.09.2019.
4. Омиадзе, Н. Растительные феноксидазы и пероксидазы в пищевой промышленности. Характеристика ферментов, пути их регулирования и применения / Н. Омиадзе. — LAP, 2011. — 64 с.
5. Лукашов, Р. И. Факторы, влияющие на водно-спиртовую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадского / Р. И. Лукашов // Рецепт. — 2018. — Т. 21, № 1. — С. 10–25.
6. Лукашов, Р. И. Влияние природы и концентрации экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского / Р. И. Лукашов // Химия растительного сырья. — 2019. — № 4. — С. 113–123.
7. Моисеев, Д. В. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ / Д. В. Моисеев, Г. Н. Бузук, В. Л. Шелюто // Хим.-фарм. журн. — 2011. — Т. 45, № 1. — С. 35–38.

## **Influence of the thermal processing of canadian goldenrod herb on the extraction of flavonoids**

*Lukashou R. I., Gurina N. S.*

*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus*

The positive effect of preliminary thermal processing on the subsequent extraction of flavonoids from the Canadian Goldenrod herb was established. The optimal parameters of preliminary thermal processing were experimentally selected: processing temperature — 120 °C; processing time — 1 h; the degree of grinding of plant raw material — (500), the thickness of plant raw material layer — 2–4 mm. The qualitative compositions of the dominant flavonoids in the native and thermal processing plant raw material did not differ. The processing temperature and the degree of grinding of plant raw material are the critical factors of the preliminary thermal processing.

**Keywords:** Canadian goldenrod, heat treatment, flavonoids.

*Поступила 15.10.2019*