

УДК 615.32:543.2

## Влияние ультразвука на экстракцию флавоноидов из календулы цветков

Лукашов Р. И., Гурина Н. С.

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

**Реферат.** В статье представлены новые экспериментальные данные, касающиеся влияния ультразвуковой обработки календулы цветков на выход флавоноидов. Подобраны следующие оптимальные параметры ультразвуковой обработки воздушно-сухих календулы цветков с позиции наибольшего выхода флавоноидов: время обработки — 15 мин; толщина слоя обрабатываемого сырья — от 4 до 6 см; степень измельчения сырья — цельное; частота ультразвуковых колебаний — 15 кГц. Максимальное количество флавоноидов экстрагировалось из календулы цветков при 45 мин воздействия ультразвука в течение предварительной обработки сырья во время экстракции. Показано, что в результате применения ультразвуковой обработки сырья в сухом виде и во время экстракции при получении настоек увеличивается выход флавоноидов из календулы цветков в три раза.

**Ключевые слова:** календула лекарственная, ультразвуковая обработка, флавоноиды, настойки.

**Введение.** В последние годы возрастает интерес к способам повышения экстракции биологически активных веществ (БАВ) путем воздействия физических и химических факторов на лекарственное растительное сырье (ЛРС) [1–4]. Действие данных факторов приводит к изменению внутренней структуры ЛРС, что в свою очередь способствует усилению последующей экстракции БАВ. Разрушение ряда клеточных и субклеточных структур, накапливающих БАВ, облегчает выход веществ в экстрагент и повышает эффективность последующей экстракции.

Ультразвуковая экстракция относится к одним из современных способов повышения выхода действующих веществ из ЛРС и широко используется в фармацевтическом производстве для получения лекарственных средств растительного происхождения. Это связывают с тем, что ультразвуковая волна в жидкой среде экстрагента создает кавитации, что интенсифицирует процесс извлечения веществ и в конечном итоге приводит к обогащению экстракционных лекарственных форм целевыми веществами за счет истощения ЛРС [5, 6].

Само высушенное ЛРС содержит до 10–14 % влаги, к которой относят связанную и свободную воду растений. Таким образом, можно предположить, что предварительное воздействие ультразвука непосредственно на воздушно-сухое ЛРС также приведет к формированию разрывной силы, разрушению структуры растительного материала и последующему выходу действующих веществ при экстракции.

Учитывая капиллярную структуру растительного материала, логично предположить, что ультразвук ускорит капиллярную пропитку ЛРС водой, а значит процесс смачивания растительного материала и десорбция БАВ начнутся раньше, что в дальнейшем значительно облегчит процессы экстракции, минуя или сокращая стадию смачивания ЛРС экстрагентом.

Ультразвуковое воздействие относится к излучению высоких энергий и сопровождается увеличением температуры обрабатываемого материала. Повышение температуры ЛРС до 35–40 °С приводит к активации ферментов, вызывающих деструкцию ряда БАВ. Поэтому важным аспектом является такое сочетание параметров ультразвуковой обработки, при которой не наступают негативные температурные явления, но активно протекают капиллярные процессы.

В ряде случаев небольшое повышение температуры в сырье приводит к увеличению последующей экстракции БАВ, так как вместе с деструктирующими ферментами могут активироваться ферменты, которые высвобождают связанные формы БАВ.

Опираясь на приведенные выше умозаключения, критически значимым представляется изучение влияния параметров ультразвуковой обработки на выход флавоноидов из календулы цветков. При этом целесообразным является также оценка возможности использования ультразвуковой обработки во время экстракции для получения лекарственных форм на основе календулы цветков. В частности, перспективным является возможность использования ультразвуковой обработки сырья в жидкой среде при получении настоек и других лекарственных форм, не требующих воздействия термического фактора при экстракции.

**Цель работы** — установить параметры предварительной ультразвуковой обработки календулы цветков, обеспечивающие максимальный выход флавоноидов.

**Материалы и методы.** В качестве ЛРС использовали календулы цветки трех промышленных серий (производства ЛРСУП «Можейково», ООО «НПК Биотест» и ООО «Калина»).

В качестве реагентов использовали ацетон (х. ч.), алюминия хлорид (ч. д. а.), кислоту уксусную ледяную (х. ч.), натрия гидроксид (х. ч.).

Экстракцию флавоноидов из календулы цветков проводили следующим образом. Взвешивали точную навеску измельченных календулы цветков (355), помещали в круглодонную колбу и прибавляли 60 % ацетон при соотношении сырья и экстрагента 1 : 10. Экстракцию проводили с обратным холодильником в течение 90 мин при температуре 60 °С. Предварительно содержимое колбы взвешивали с точностью  $\pm 0,01$  г. После окончания процесса экстракции колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры и взвешивали. При необходимости доводили экстрагентом до первоначальной массы.

Содержимое колбы фильтровали. Из определенного объема фильтрата отгоняли ацетон, полученный сухой остаток растворяли в 70%-м этаноле и доводили им до первоначального объема. Полученный раствор использовали для количественного определения суммы флавоноидов с пересчетом на рутин.

К 5,00 мл полученного раствора прибавляли 8,00 мл раствора 50 г/л алюминия хлорида на 70%-м этаноле, выдерживали на кипящей водяной бане в течение 4 мин, затем быстро охлаждали до комнатной температуры, прибавляли 5,00 мл буферного раствора (к 10,0 мл 1 М раствора натрия гидроксида прибавляли 25,0 мл раствора 60 г/л кислоты уксусной ледяной и доводили водой до 100,0 мл) и добавляли 70%-й этанол до 25,0 мл. Измерение оптической плотности испытуемого раствора проводили при 409 нм.

Компенсационный раствор готовили по аналогичной схеме в отсутствие добавления раствора алюминия хлорида.

Ультразвуковую обработку воздушно-сухого сырья и сырья в среде экстрагента проводили в экстракторе модели НО-455.00 ПС (производитель ООО «Александра-плюс») при частоте переменного тока  $50 \pm 0,05$  Гц и мощности излучателя 0,1 кВт.

Для исследования получали три серии настоек:

*1-я серия (серия 01)* — *нативное (необработанное ультразвуком) сырье*. Настойку 1 : 10 получали методом мацерации в течение 8 дней при использовании в качестве основного экстрагента 70%-го этанола. Затем настойку процеживали, отжимали сырье, вытяжку оставляли при температуре не выше 4 °С в течение двух дней и фильтровали во флакон темного стекла.

*2-я серия (серия 02)* — аналогично получали настойку из *обработанного ультразвуком* в течение 15 мин сырья.

*3-я серия (серия 03)* — *обработка ультразвуком* в течение 15 мин сырья в среде экстрагента после проведения мацерации в описанных выше условиях.

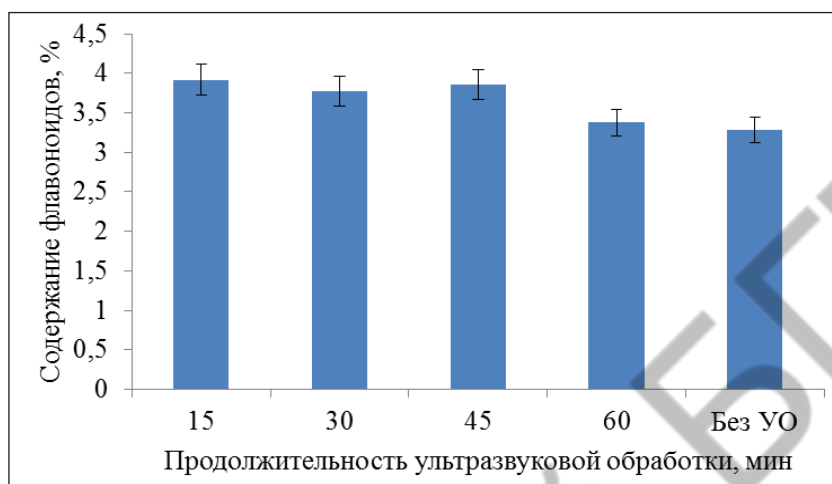
Расчет суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин проводили методом одного стандарта. Использовали стандартный образец рутина (Sigma-Aldrich).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили при помощи компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016 (пакет «Анализ данных»).

Каждое испытание (в том числе для каждой исследуемой промышленной серии) выполняли по три раза ( $P = 95\%$ ;  $n = 3$ ). Результаты представляли в виде  $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{x}}$ , где  $\bar{X}$  — среднее значение;  $\Delta_{\bar{x}}$  — полуширина доверительного интервала средней величины.

Для оценки влияния параметров обработки на последующую экстракцию флавоноидов проводили дисперсионный анализ. Сравнение двух групп значений проводили при помощи  $t$ -критерия Стьюдента. Значения статистически значимо различались при  $p < 0,05$ .

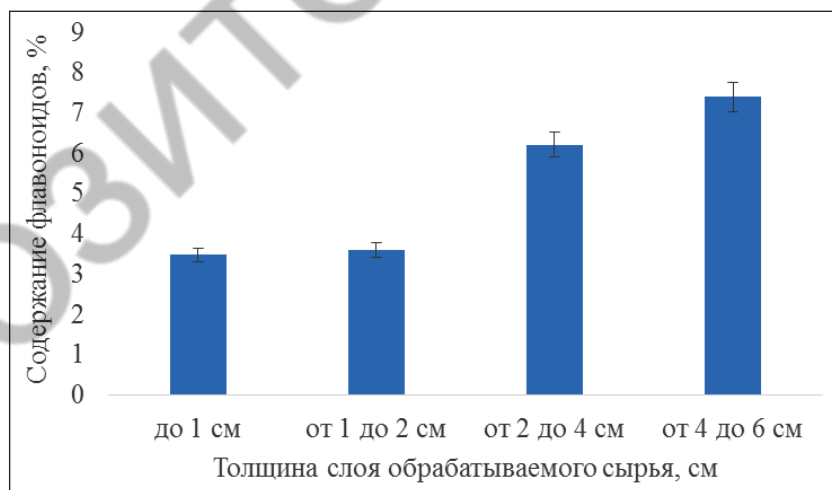
**Результаты и их обсуждение.** На первом этапе исследований изучали влияние продолжительности ультразвуковой обработки сырья на последующую экстракцию флавоноидов из календулы цветков (рисунок 1).



**Рисунок 1 — Влияние продолжительности ультразвуковой обработки сырья на выход флавоноидов из календулы цветков (без ультразвуковой обработки)**

Из рисунка 1 видно, что содержание флавоноидов в предварительно обработанном ультразвуком сырье в течение 15 мин на 19,4 % (отн.) выше, чем в сырье без предварительной обработки. Максимальное содержание отмечено для сырья, обработанного в течение 15 мин, затем содержание (при обработке до 60 мин) снижалось. При этом обработка в течение 60 мин приводила к снижению на 14,3 % (отн.) содержания флавоноидов по сравнению с обработкой в течение 45 мин.

Следующим шагом стало изучение влияния толщины слоя обрабатываемого сырья на содержание флавоноидов (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Влияние толщины слоя обрабатываемого сырья на содержание флавоноидов**

Из рисунка 2 видно, что при толщине слоя обрабатываемого ультразвуком сырья до 2 см содержание флавоноидов находилось порядка 3 %. Увеличение толщины слоя от 1 до 2 см к толщине слоя от 2 до 4 см привело к резкому скачку (на 72,1 % (отн.),  $p = 4,5 \cdot 10^{-8} < 0,05$ ) содержания флавоноидов. Максимальный выход флавоноидов наблюдали при толщине слоя календулы цветков от 4 до 6 см ( $7,40 \pm 0,37$  %).

В таблице 1 представлены результаты следующего шага оценки влияния ультразвуковой обработки сырья на выход флавоноидов — изучение влияния степени измельчения сырья.

Таблица 1 — Содержание флавоноидов при ультразвуковой обработке цельного, резанного и порошкового сырья

Показатель	Цельное сырье	Резанное сырье	Порошкованное сырье
Содержание флавоноидов, %	6,10 ± 0,30	4,17 ± 0,22	4,00 ± 0,18

Из таблицы 1 видно, что содержание флавоноидов при ультразвуковой обработке цельного сырья в 1,5 раза выше ( $p = 1,9 \cdot 10^{-5} < 0,05$ ), чем в резанном сырье.

В ходе изучения влияния частоты ультразвуковых колебаний на последующую экстракцию флавоноидов получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2 — Содержание флавоноидов при различных частотах ультразвуковых колебаний

Показатель	15±1 кГц	21±1 кГц	25±1 кГц	31 ± 1 кГц
Содержание флавоноидов, %	7,98 ± 0,45	6,10 ± 0,30	5,14 ± 0,24	3,65 ± 0,22

Из таблицы 2 видно, что наибольшее количество флавоноидов экстрагировалось из сырья, обработанного при наименьшей частоте ультразвуковых колебаний ( $p = 0,015 < 0,05$ ). При этом установлена обратно пропорциональная зависимость между частотой ультразвуковых колебаний и содержанием флавоноидов ( $R = 0,9977$ ).

При проведении дисперсионного анализа устанавливали влияние продолжительности ультразвуковой обработки ( $p = 0,87$ ), толщины слоя обрабатываемого сырья ( $p = 0,032$ ), степени измельчения сырья ( $p = 0,065$ ) и частоты ультразвуковых колебаний ( $p = 0,0026$ ) на выход флавоноидов из календулы цветков. Показано, что статистически значимое влияние ( $p < 0,05$ ) оказали толщина слоя обрабатываемого сырья и частота ультразвуковых колебаний.

Далее изучали влияние продолжительности ультразвуковой обработки во время водно-спиртовой экстракции на выход флавоноидов из календулы цветков (рисунок 3).

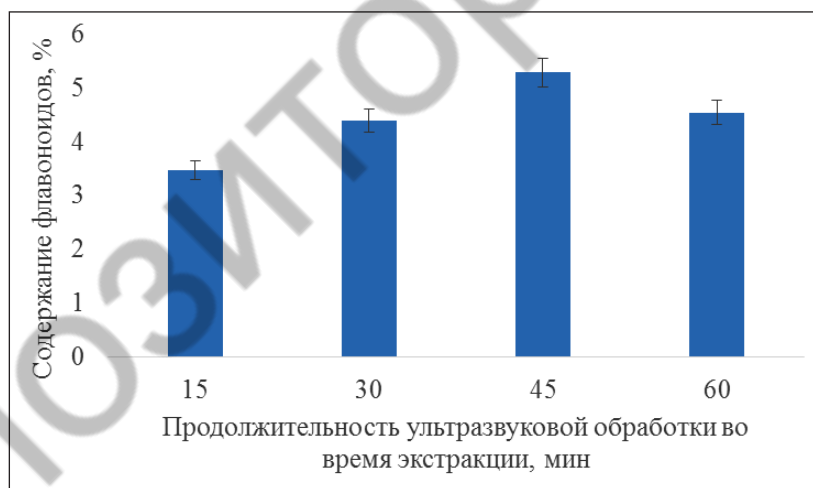


Рисунок 3 — Влияние продолжительности ультразвуковой обработки во время экстракции на содержание флавоноидов

Из рисунка 3 видно, что ультразвуковая обработка во время водно-спиртовой экстракции в течение 45 мин привела к увеличению содержания флавоноидов на 61,2 % (отн.) ( $p = 1,4 \cdot 10^{-4} < 0,05$ ) по сравнению с экстракцией при механическом перемешивании, что указывает на перспективность использования данного вида экстракции для получения лекарственных форм.

Максимальная экстракция при воздействии ультразвука наблюдалась в течение 45 мин. Экстракция в течение 60 мин приводила к снижению содержания флавоноидов на 16,3 % (отн.).

На завершающем этапе получили настойки методом мацерации (серия 01), методом мацерации из обработанных ультразвуком календулы цветков (серия 02) и при комбинации мацерации с последующей ультразвуковой стадией экстракции (серия 03), что показано на рисунке 4.

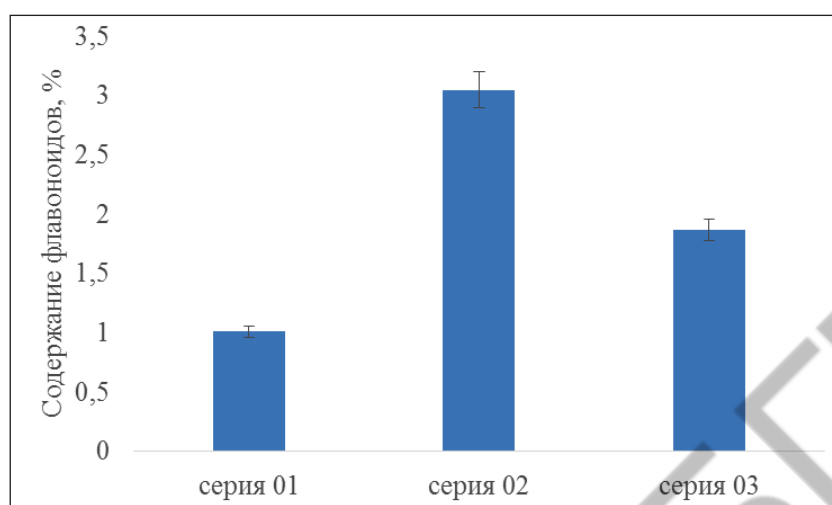


Рисунок 4 — Содержание флавоноидов в настойках

Из рисунка 4 видно, что содержание флавоноидов в настойке, полученной из обработанного ультразвуком сырья, в три раза больше по сравнению с настойкой, полученной из нативного сырья. Дополнительная ультразвуковая стадия экстракции после проведения мацерации привела к увеличению содержания флавоноидов на 85,1 % (отн.) ( $p = 3,2 \cdot 10^{-5} < 0,05$ ).

**Заключение.** Выявлено, что ультразвуковая обработка приводит к статистически значимому повышению последующей экстракции флавоноидов из календулы цветков.

Наибольший выход флавоноидов из сухого сырья наблюдали при ультразвуковой обработке в течение 15 мин при толщине слоя цельного сырья от 4 до 6 см и частоте ультразвуковых колебаний  $15 \pm 1$  кГц. Данные параметры могут быть использованы для разработки технологии ультразвуковой обработки календулы цветков.

Показано, что ультразвуковая обработка сырья повышают выход флавоноидов из календулы цветков при получении настоек в три раза.

### Литература

1. Лукашов, Р. И. Предварительное обезжиривание травы золотарника канадского / Р. И. Лукашов, Н. С. Гурина // Современные достижения фармацевтической науки и практики: материалы Междунар. конф., посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», Витебск, 31 окт. 2019 г.; под ред. А. Т. Щастного. — Витебск: ВГМУ, 2019. — С. 111–114.
2. Лавшук, В. В. Параметры обезжиривания одуванчика лекарственного корней / В. В. Лавшук, Р. И. Лукашов // Инновационные технологии в фармации: материалы Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, Иркутск, 14–15 июня 2019 г.; под ред. Е. Г. Приваловой [и др.]. — Иркутск: ИГМУ, 2019. — С. 251–257.
3. Лукашов, Р. И. Влияние параметров термической обработки травы золотарника канадского на экстракцию флавоноидов / Р. И. Лукашов, Н. С. Гурина // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. рецензир. науч. работ / Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: А. В. Сикорский, В. Я. Хрыщанович. — Минск: БГМУ, 2019. — Вып. 9. — С. 357–362.
4. Лукашов, Р. И. Получение экстрактов на основе нативной и предварительно обработанной травы золотарника канадского / Р. И. Лукашов, Н. С. Гурина // Инновации в здоровье нации: сб. материалов VII Всероссийской науч.-практ. конф. с междунар. участием, Санкт-Петербург, 7–8 ноября 2019 г. — СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019. — С. 272–276.
5. Vinatoru, M. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs / M. Vinatoru // Ultrasonics Sonochemistry. — 2001. — № 8. — P. 303–313.
6. Ultrasonic-extraction of phenolic compounds from *Phyllanthus urinaria*: optimization model and antioxidant activity / Y. Liu [et al.] // Food Science and Technology. — 2018. — № 38. — P. 286–293.

## Influence of ultrasonic treatment of calendula flowers on flavonoid extraction

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

*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The article presents new experimental data concerning the ultrasonic treatment of calendula flowers for the release of flavonoids. The following optimal parameters of ultrasonic treatment of air-dry calendula flowers were selected from the position of the highest yield of flavonoids: treatment time — 15 min; the thickness of the layer of processed plant raw materials — from 4 to 6 cm; the degree of grinding of plant raw materials — whole; the frequency of ultrasonic vibrations is 15 kHz. The maximum amount of flavonoids was extracted from the calendula flowers at 45 min of exposure to ultrasound during the pretreatment of the plant raw material during the extraction. It is shown that as a result of the use of ultrasonic processing of plant raw materials in dry form and during extraction upon production of tinctures, the yield of flavonoids from calendula flowers is increased threefold.

**Keywords:** calendula, ultrasonic treatment, flavonoids, tinctures.

*Поступила 25.11.2020*