

*К.И.Карчевская*

## ЭКСТРАКЦИЯ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ТРАВЫ

*Научный руководитель: маг. фил. наук. Н.И. Грищенко*

*Кафедра организации фармации,*

*Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск*

*K.I.Karchevskaya*

## FLAVONOID EXTRACTION FROM YARROW GRASS

*Tutor: m. ph. s. N.I.Grischenko*

*Department of Organization of Pharmacy,*

*Belarusian State Medical University, Minsk*

**Резюме.** В ходе исследования было определено содержание флавоноидов в извлечениях и сухих экстрактах, полученных на основе тысячелистника обыкновенного травы с применением различных экстрагентов. Выполнено уточнение объемной доли и подбор оптимальной температуры экстракции для наиболее перспективных растворителей, установлена проникающая способность флавоноидов на моделях с желатиновым гелем.

**Ключевые слова:** тысячелистник обыкновенный, флавоноиды, экстракция.

**Resume.** During my research, the flavonoid content of the extract and dry extracts of *Achillea millefolium* was determined. The volume part was clarified and the optimal extraction temperature was selected for the most promising solvents. The penetrating ability of flavonoids was established on gelatin gel models.

**Keywords:** common yarrow, flavonoids, extraction.

**Актуальность.** *A. millefolium* повсеместно распространенное растение с неприхотливыми условиями произрастания, фитохимическим разнообразием, широким спектром фармакологической активности и многолетним применением как в народной, так и традиционной медицине.

Изучение экстракции флавоноидов из сырья тысячелистника травы, может в будущем помочь с созданием новых лекарственных форм (ЛФ), лекарственных средств (ЛС) и разработкой методики стандартизации тысячелистника обыкновенного травы по вышеупомянутой группе биологически активных веществ (БАВ).

**Цель:** изучить экстракцию флавоноидов из тысячелистника обыкновенного травы для определения их проникающей способности и получения сухих экстрактов.

**Задачи:**

1. Определить экстрагирующую способность органических растворителей и их водных растворов в отношении флавоноидов тысячелистника травы и уточнить объемную долю экстрагента, извлекающего наибольшее количество флавоноидов.

2. Подобрать экстракционную смесь для максимального извлечения флавоноидов из тысячелистника травы.

3. Подобрать оптимальную температуру экстракции для извлечения флавоноидов из тысячелистника травы.

4. Получить сухие экстракты, обогащенные флавоноидами тысячелистника травы.

5. Изучить проникающую способность флавоноидов тысячелистника травы с использованием желатинового геля.

**Материалы и методы.** Объектом исследования служила тысячелистника трава, заготовленная в сентябре и октябре 2019 года. В качестве экстрагентов использовали органические растворители (метанол, этанол, пропанол-1, пропанол-2, этиленгликоль, глицерин, ацетон, ацетонитрил, диметилсульфоксид (ДМСО) и их водные растворы с объемными долями 20, 40, 60 и 80 %, а также растворители, плохо смешивающиеся с водой: бутанол-1, бутанол-2, этилацетат.

Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид, используя в основе методику, изложенную в Государственной фармакопее Республики Беларусь для душицы травы [1]. Для извлечения флавоноидов взвешивали точные навески массой около 0,1 г тысячелистника травы, предварительно измельченной и просеянной через сито с размером отверстий 1400 мкм. Для экстракции использовали выше перечисленные растворители в количестве 5,00 мл в объемных долях: 20, 40, 60, 80, 100%, растворители, не смешивающиеся с водой, использовали в объемной доле 100%. Экстракцию проводили на водяной бане в течение 60 мин при 60°C в плотно закупоренных флаконах с завинчивающейся крышкой. После экстракции проводили фильтрацию полученного извлечения, полученный фильтрат использовали для дальнейшей работы.

Флавоноиды в составе извлечений вступали в реакцию комплексообразования с  $AlCl_3$ . К 100 мкл полученного извлечения добавляли 400 мкл 2% водного раствора  $AlCl_3$ , 50,0 мкл кислоты уксусной и полученную смесь доводили водой очищенной до 5,00 мл. Таким образом получали испытуемый раствор. Компенсационный раствор: к 100 мкл извлечения добавляли 50,0 мкл кислоты уксусной и доводили водой очищенной до 5,00 мл. Время реакции 30 мин. Определяли оптическую плотность испытуемого раствора против компенсационного раствора при длине волны 400 нм.

Строили градуировочный график для лютеолина-7-О-глюкозида в концентрациях: от 0,1 до 1 мг/мл.

Содержание суммы флавоноидов (X, %) в пересчете на лютеолин-7-О-глюкозид рассчитывали по формуле 1.1:

$$X, \% = \left( \frac{A+0,0174}{0,3474} \right) \times 0,5/m \quad (1.1)$$

где А – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса навески измельченного сырья, г.

Для получения сухих экстрактов были получены извлечения, экстрагентами в которых являлись 60% пропанол-2, 40% ДМСО, 80% метанол и 60% ацетонитрил. Данные растворители в указанных объемных долях показали наибольшую извлекающую способность в своем ряду.

Фильтрат, полученный по ранее описанной методике, использовали для определения процентного содержания флавоноидов в извлечении (Z, %) по формуле 1.2:

$$Y, \% = \left( \frac{A+0,0174}{0,3474} \right) \times 0,4/m \quad (1.2)$$

Далее 4,00 мл фильтрата помещали в фарфоровую выпарительную чашку и производили упаривание водно-органического экстрагента при температуре кипения.

ния абсолютного растворителя. Образовавшийся сухой экстракт растворяли в 4,00 мл соответствующего растворителя и определяли процентное содержание флавоноидов (Y, %) в сухом экстракте по формуле 1.3:

$$Z, \% = \left( \frac{A+0,0174}{0,3474} \right) \times 1/m \quad (1.3)$$

Полученные данные обрабатывали, используя программу Microsoft Excel 2016.

Для изучения проникающей способности использовали модель 5% желатина, приготовленного по следующей методике. Взвешивали навеску сухого желатина массой 5,0 г, заливали 60,0 мл холодной воды и оставляли набухать на 30 минут. Затем добавляли 40,0 мл холодной воды. Смесь помещали на водяную баню при температуре 70°C и растворяли при перемешивании до получения прозрачного раствора. Полученный раствор вливали в пробирки и помещали в холодильник до застывания.

Желатин использовали для изучения проникающей способности на основании протекания химической реакции между флавоноидами и 2% водным раствором  $AlCl_3$ , результатом которой является образование окрашенного в желтый цвет комплекса. На поверхность застывшего желатина помещали 0,100 мл извлечения, 0,080 мл 2% водного раствора  $AlCl_3$ , 0,020 мл уксусной кислоты и 0,800 мл воды очищенной. Степень проникновения флавоноидов фиксировали в УФ-свете каждые полтора часа в течении суток при комнатной температуре.

Так же был приготовлен 5% желатин с добавлением основного ацетата свинца. Взвешивали навеску сухого желатина массой 5,0 г, заливали 60,0 мл холодной воды и оставляли набухать на 30 мин. Затем взвешивали 1,0 основного ацетата свинца, растворяли его в 40,0 мл воды, полученный раствор добавляли к набухшему желатину. Далее действовали по вышеописанной методике.

Желатин с ацетатом свинца использовали для изучения проникающей способности на основании образования ярко-желтого соединения при взаимодействии этого реактива с флавоноидами. На поверхность застывшего желатина с ацетатом свинца помещали 1,00 мл извлечения и фиксировали степень проникновения в видимом свете каждые полтора часа в течении суток при комнатной температуре.

**Результаты и их обсуждения.** В таблице 1 представлена зависимость содержания флавоноидов (%) от объемной доли различных экстрагентов, на основе которых были получены извлечения.

Табл.1. Зависимость содержания флавоноидов (%) от объемной доли экстрагента

	Пропанол-2	ДМСО	Метанол	Ацетонитрил	Ацетон
20%	0,801	0,943	0,830	0,850	0,891
40%	1,149	1,630	1,137	1,300	1,016
60%	1,713	0,877	1,370	1,457	0,938
80%	1,292	0,684	1,606	1,032	1,189
100%	0,698	0,698	0,840	0,494	0,486
	Пропанол-1	Этанол	Этиленгликоль	Глицерин	
20%	0,673	0,775	0,842	0,512	
40%	0,956	0,876	0,932	0,263	
60%	0,973	0,760	0,867	0,929	

<b>80%</b>	1,158	1,124	0,933	0,273	
<b>100%</b>	0,694	0,614	0,632	0,113	

При использовании в качестве экстрагента растворителей, не смешивающиеся с водой: бутанол-1, бутанол-2, этилацетат, получены следующие результаты: 0,226%; не извлекал флавоноиды; 0,355% соответственно.

Для уточнения концентрации были выбраны: 40% ДМСО, который можно применить при разработке наружной ЛФ и 80% метанол, который можно использовать для разработки методики стандартизации *A. millefolium* по флавоноидам (таблица 2).

**Табл. 2.** Зависимость содержания флавоноидов(%) от объемной доли ДМСО и метанола

Объемная доля экстрагента, %	30	35	40	45	50	70	80	90
<b>Содержание флавоноидов, %</b>								
<b>ДМСО</b>	1,174	1,141	1,276	1,217	1,358			
<b>МЕТАНОЛ</b>						2,063	2,239	1,659

Для последующей работы в направлении разработки наружной ЛФ была выбрана смесь растворителей, состоящая из воды, ДМСО и пропанола-2, в связи с чем было проведено уточнение концентрации компонентов смеси (таблица 3).

**Табл. 3.** Процентное содержание флавоноидов в извлечениях, полученных с применением в качестве экстрагента смеси: ДМСО, пропанол-2, вода

Состав смеси	Содержание флавоноидов, %
5% пропанола-2 + 45% ДМСО + 50% вода	1,398
10% пропанола-2 + 40% ДМСО + 50% вода	1,471
15% пропанола-2 + 35% ДМСО + 50% вода	1,579
<b>20% пропанола-2 + 30% ДМСО + 50% вода</b>	<b>1,636</b>
25% пропанола-2 + 25% ДМСО + 50% вода	1,493
30% пропанола-2 + 20% ДМСО + 50% вода	1,574

Далее проводили подбор оптимальной температуры экстракции для извлечений на основе 80% метанола и смеси: 20% пропанол-2, 30% ДМСО, 50% вода (таблица 4).

**Табл. 4.** Изменение содержания флавоноидов (%) в извлечениях, полученных на основе 80% метанола и смеси (20% пропанол-2, 30% ДМСО, 50% вода) при изменении температуры

Температура, °С	80% МЕТАНОЛ	СМЕСЬ
<b>комнатная</b>	1,110	1,086
<b>40</b>	1,353	1,175
<b>60</b>	1,780	1,362
<b>80</b>	1,962	1,450
<b>кипящая водяная баня</b>	0,904	1,620

Следующим этапом эксперимента было получение сухих экстрактов на основе 60% пропанола-2, 40% ДМСО, 80% метанола и 60% ацетонитрила (таблица 5). Данные растворители в указанных объемных долях показали максимальную извлекающую способность в своем ряду.

**Табл. 5.** Содержание флавоноидов (%) в сухих экстрактах при использовании различных экстрагентов

Экстрагент	T <sub>кип.</sub> экстрагента, °C	Содержание флавоноидов, %	Масса флавоноидов, мг
60% пропанол-2	82,4	7,660	0,934
40% ДМСО	189	8,312	1,099
<b>80% метанол</b>	64,7	<b>9,048</b>	<b>1,517</b>
<b>60% ацетонитрил</b>	81,6	<b>8,987</b>	<b>1,549</b>

Изучение проникающей способности флавоноидов. Степень проникновения флавоноидов, полученных в результате экстракции 40% ДМСО и 60% пропанолом-2, по истечении 24 ч с использованием 2% водного раствора алюминия хлорида составила 4,0 мм и 2,5 мм соответственно. Степень проникновения флавоноидов, полученных в результате экстракции 40% ДМСО и 60% пропанолом-2, по истечении 24 ч в модели с добавлением основного ацетата свинца составила: 4,0 мм и 2,0 мм соответственно.

#### **Выводы:**

1 Экстрагирующая способность водно-органических растворов в отношении флавоноидов тысячелистника травы уменьшается в ряду: 60% пропанол-2 > 40% ДМСО > 80% метанол > 60% ацетонитрил > 80% ацетон > 80% пропанол-1 > 80% этанол > 80% этиленгликоль > 60% глицерин.

2 Оптимальной концентрацией ДМСО и метанола для извлечения максимального количества флавоноидов являются 50% и 80% соответственно.

3 Для последующей работы в направлении разработки лекарственной формы для наружного применения была выбрана смесь растворителей: 20% пропанол -2 + 30% ДМСО + 50% вода.

4 При использовании в качестве экстрагентов 80% метанола оптимальной температурой экстрагирования является 80 °С. При использовании в качестве экстрагента выше представленной смеси оптимальная температура – 100 °С.

5 Выявлено, что для получения сухих экстрактов в качестве экстрагентов лучше использовать 80% метанол и 60% ацетонитрил.

6 Максимальная проникающая способность наблюдается при использовании в качестве экстрагента 40% ДМСО. Проникающая способность в двух изученных моделях не различалась.

#### **Литература**

1. Государственная фармакопея Республики Беларусь (ГФ РБ II): разработана на основе Европейской Фармакопеи. В 2 т. / М-во здравоохран. Респ. Беларусь, УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении». Т. 1: Общие методы кон-троля лекарственных средств / под общ. ред. А.А. Ширякова. – Молодечно: Тип. «Победа», 2012. – 1220 с.; Т. 2: Контроль качества Субстанций для фармацевти-ческого использования и лекарственного растительного сырья / под. общ. ред. С.И. Марченко. – Молодечно: Тип. «Победа», 2016. – 1368 с.