

УДК 615.32:615.07

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДЫ И КОНЦЕНТРАЦИИ ЭКСТРАГЕНТОВ НА ИЗВЛЕЧЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ИЗ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО

© Р.И. Лукашов

*Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, пр. Фрунзе, 27, Витебск, 220023 (Республика Беларусь),
e-mail: r_lukashov@mail.ru*

В статье представлены результаты изучения влияния природы (в частности, диэлектрической проницаемости и динамической вязкости) и концентрации следующих экстрагентов: метанола, этанола, пропанола, ацетона, диметилсульфоксида, этилацетата, пропанола-2, бутанола, бутанола-2 на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского. Содержание флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, статистически значимо ($p < 0.05$) зависело от природы и концентрации экстрагентов, используемых для их получения. Наиболее критическим фактором, влияющим на экстракцию данной группы биологически активных веществ, являлась динамическая вязкость экстрагента. Показано, что водные растворы экстрагентов обладали большей экстрагирующей способностью, нежели соответствующие абсолютные экстрагенты. Максимальное количество флавоноидов экстрагировалось 80% метанолом, 60% этанолом, 40% пропанолом, 60% ацетоном и 80% диметилсульфоксидом. В полученных извлечениях при помощи метода высокоэффективной жидкостной хроматографии обнаружили от двух до семи флавоноидов. Характер экстракции суммы флавоноидов преимущественно определялся доминирующим гликозидом – изокверцитрином. Учитывая лучшую воспроизводимость экстракции суммы флавоноидов, широкое использование как экстрагентов этанола и его водных растворов, отнесение данного экстрагента к малотоксичным растворителям и большую извлекающую способность в отношении других классов фенольных соединений (в частности, гидроксикоричных кислот), рекомендовано использовать для экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского 60% этанол.

Ключевые слова: золотарник канадский, экстрагенты, 60% этанол, флавоноиды, фенольные соединения.

Введение

Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.) – растение рода Золотарник семейства Астровые (*Asteraceae* Dumort.). Первичный ареал распространения – Северная Америка (от Востока Канады до Северо-Востока Мексики). Растение интродуцировано в Европу, где произрастает от юга Скандинавии до Северной Италии, формируя вторичный ареал. Встречается как дикорастущий вид в Республике Беларусь, Европейской части России, Закавказья и Сибири [1–3].

Трава золотарника канадского наряду с травой золотарника обыкновенного и золотарника гигантского используется для получения лекарственных средств и биологически активных добавок к пище [4], в народной медицине различных народов [1, 5] и гомеопатии [6]. Основными фармакологическими свойствами, которыми обладает трава золотарника, считаются спазмолитические, мочегонные, противовоспалительные и противомикробные свойства [7]. Лекарственные средства на основе золотарника преимущественно применяются для лечения и профилактики болезней мочеполовой системы [8].

Мочегонную и спазмолитическую активность золотарника связывают с флавоноидами [9]. Флавоноиды золотарника канадского представлены преимущественно кверцетином, кемпферолом, рамнетином, изорамнетином и их производными [10, 11]. Стандартизацию травы золотарника проводят по сумме флавоноидов [12, 13].

Лукашов Роман Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры стандартизации лекарственных средств с курсом ФПК и ПК,
e-mail: r_lukashov@mail.ru

Экстракцию флавоноидов из травы золотарника проводят на кипящей водяной бане с использованием в качестве основного экстрагента – ацетона с добавлением около 1% (по объему) хлористоводо-

родной кислоты и гексаметилентетрамина. Полученное извлечение разводят водой, добавляют этилацетат и собирают этилацетатную фракцию. Затем ее очищают, добавляя воду и натрия сульфат. Испытуемый раствор готовят путем добавления алюминия хлорида и ледяной уксусной кислоты. Измеряют оптическую плотность при длине волны 425 нм.

Для получения лекарственных форм на основе травы золотарника в качестве экстрагента используют воду и спирт этиловый в различных концентрациях [14, 15].

Следует отметить, что агликоны флавоноидов (например, кверцетин) растворимы в диэтиловом эфире, спиртах, ацетоне, ацетонитриле и практически нерастворимы в воде. Гликозиды (например, изокверцитрин, рутин) флавоноидов растворимы в спиртах, ацетоне, ацетонитриле, гликозиды, содержащие более трех сахарных остатков, легко растворимы в воде и нерастворимы в хлороформе и эфире [16, 17].

Учитывая возможность растворения флавоноидов в разных растворителях, интересным является изучение возможности их использования как экстрагентов. В научной литературе встречаются результаты использования отдельных органических растворителей (ацетон, хлороформ, вода, этилацетат, метанол, гексан) как экстрагентов для извлечения флавоноидов из некоторых видов растительного сырья [18, 19]. При этом отмечается влияние вязкости и поверхностного натяжения растворителей на результаты получения экстрактов из растительного сырья [20].

Учитывая использование некоторых экстрагентов (ацетона, этилацетата, воды, спирта этилового в различных концентрациях) и перспективность использования других растворителей для экстракции флавоноидов, интересным представляется систематическое изучение влияния природы (в частности, полярности и вязкости) экстрагента на извлечение флавоноидов из травы золотарника.

Цель настоящей работы – исследование влияния природы и концентрации экстрагентов, отличающихся по химической структуре, на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского.

Экспериментальная часть

Материалы и методы исследования. Использовали образцы травы золотарника канадского, заготовленные в фазу массового цветения в августе 2016 г. в местах естественного произрастания в окрестностях г. Бобруйска (д. Заречье) согласно рекомендациям [21, 22]. Заготовленное сырье подвергли воздушно-теневого сушке [12, 13].

Для изучения выбраны следующие экстрагенты: метанол (ч.д.а.), этанол (ч.д.а.), пропанол (ч.д.а.), ацетон (ч.д.а.), диметилсульфоксид (ч.д.а.) и их водные растворы с концентрацией 20, 40, 60 и 80% (по объему), бутанол (ч.д.а.), пропанол-2 (х.ч.), бутанол-2 (х.ч.) и этилацетат (ч.д.а.).

Принцип выбора растворителей для экстракции основывался на их различной полярности, которая характеризуется величиной диэлектрической проницаемости (ϵ). Для этилацетата эта величина составляет 6.0; для бутанола-2 – 15.3; для бутанола – 17.8; пропанола-2 – 18.3; пропанола – 20.1; для ацетона – 20.9; для этанола – 24.3; для метанола – 32.6 и для диметилсульфоксида – 47.0 [23]. Вода имеет диэлектрическую проницаемость 78.5, поэтому для растворителей, хорошо смешивающихся с водой, готовили водные растворы с целью получения жидкостей в диапазоне диэлектрических проницаемостей от чистого растворителя до воды.

Для исследований выбрали растворители, отличающиеся по химической структуре: гомологичные спирты, содержащие одну гидроксильную группу (от метанола до бутанола) и их структурные аналоги, отличающиеся положением гидроксильной группы (пропанол-2 и бутанол-2); кетон (ацетон); сложный эфир (этилацетат) и сульфоксид (диметилсульфоксид). Пропанол и ацетон с близкими значениями диэлектрической проницаемости относятся к разным классам химических соединений.

Растворители по способности к отрыву протона разделили на две группы: протонные (спирты) и апротонные диполярные (диметилсульфоксид, ацетон, этилацетат). Наличие подвижного атома водорода в молекуле растворителя (за счет присутствия более электроотрицательного атома кислорода) может иметь важное значение при взаимодействии с извлекаемыми флавоноидами, которые в структуре содержат подвижные атомы водорода в ароматических гидроксильных группах. В частности, это повышает вероятность образования водородных связей между молекулами экстрагента и извлекаемыми веществами.

Растворители, используемые в эксперименте, отличались по динамической вязкости ($\eta \cdot 10^3$, Па·с). Для ацетона данная величина составила 0.31; для этилацетата – 0.43; для метанола – 0.55; для воды – 0.89; для этанола – 1.10; для пропанола – 2.00; для пропанола-2 – 2.05; для диметилсульфоксида – 2.47; для бутанола – 2.60 и для бутанола-2 – 3.35 [23].

Идентификацию и количественное определение флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (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 OpenLAB.

Использовали хроматографическую колонку Zorbax SB длиной 0.25 м и внутренним диаметром 4.6 мм, заполненную силикагелем октадецилсилильным с размером частиц 5 мкм, температура колонки составила 30 °С.

Подвижная фаза – смесь ацетонитрила и 0.01 М раствора калия дигидрофосфата, доведенного кислотой фосфорной до pH 3.0±0.2, в соотношении 20 : 80 (по объему). Режим элюирования – изократический. Скорость подачи элюента – 1.0 мл/мин. Объем инжестируемой 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 [24].

Параллельно с получением исследуемых извлечений готовили для инжестирования растворы стандартных образцов рутин, 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 лицензионных программ Microsoft Office Excel 2007 (пакет «Анализ данных») и Statistica Advanced 10.0. Каждое испытание повторяли три раза ($n = 3$). Результаты представляли в виде $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{x}}$, где \bar{X} – среднее значение выборки; $\Delta_{\bar{x}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины. Для оценки статистической значимости влияния природы и концентрации используемых экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского применяли дисперсионный анализ. Значения статистически значимо различались при $p < 0.05$.

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 представлена зависимость концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации метанола.

Из рисунка 1 следует, что максимальное суммарное содержание флавоноидов приходилось на экстракцию 80% метанолом. Переход к экстракции 100% метанолом приводил к резкому снижению (в 2.6 раза) концентрации флавоноидов. При увеличении концентрации метанола в диапазоне от 20 до 80% возрастало суммарное содержание флавоноидов в получаемых извлечениях. При этом различия между суммарными содержаниями флавоноидов в извлечениях, полученных в результате экстракции 60 и 80% метанолом, статистически не значимы ($p = 0.41$ по t-критерию Стьюдента), т.е. на этих концентрациях формировалось плато экстракции.

Наибольшее содержание доминирующего флавоноида – изокверцитрина приходилось на экстракцию 80% метанолом. При этом различия между содержаниями изокверцитрина в извлечениях, полученных в результате экстракции 60 и 80% метанолом, статистически не значимы ($p = 0.60$ по t-критерию Стьюдента). Максимумы экстракции рутин приходились на 40 и 80% метанол ($p = 0.08$ по t-критерию Стьюдента).

В таблице 1 представлена зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации метанола.

Из таблицы 1 следует, что 20% метанолом экстрагировались только рутин и изокверцитрин, метанолом в концентрации 40% – семь флавоноидов, а в концентрациях от 60% до 100% – шесть флавоноидов. Флавоноид 1 извлекался только метанолом 40%. Наибольшим разнообразием флавоноидов отличалось извлечение, полученное при экстракции 40% метанолом, однако суммарное содержание данных веществ в нем статистически значимо меньше на 41% (отн.) ($p = 0.04$ по t-критерию Стьюдента), чем при экстракции метанолом 80%.

Увеличение суммарного содержания флавоноидов при экстракции 80% метанолом в сравнении с экстракцией 60% метанолом обусловлено преимущественно (на 88.9% (отн.)) повышением экстракции рутина.

Данные по экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского в зависимости от концентрации этанола приведены в публикации [25].

На рисунке 2 представлена зависимость концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации пропанола.

Из рисунка 2 следует, что максимальное суммарное содержание флавоноидов приходилось на экстракцию 40% пропанолом. Дальнейшее увеличение концентрации пропанола от 60% до 100% приводило к снижению содержания суммы флавоноидов. Пропанол в концентрации 20% экстрагировал флавоноиды статистически значимо ниже на 33% (отн.) ($p = 0.04$ по t-критерию Стьюдента), чем пропанол в концентрации 40%.

Максимум экстракции изокверцитрина приходился на 40% пропанол. При этом 20% пропанол экстрагировал данный флавоноид статистически значимо ниже на 41% (отн.) ($p = 0.03$ по t-критерию Стьюдента), чем 40% пропанол. Максимальное количество рутина извлекалось 20% пропанолом.

В таблице 2 представлена зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации пропанола.

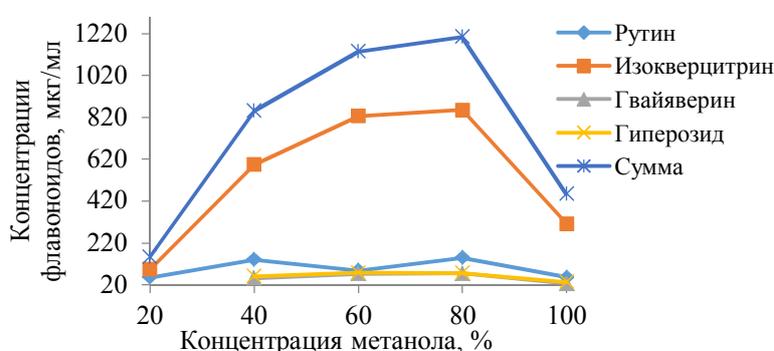


Рис. 1. Зависимость концентрации флавоноидов (мкг/мл) в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации метанола ($P = 0.95$; $n = 3$)

Таблица 1. Зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации метанола

Название флавоноида	Концентрация метанола, %				
	20	40	60	80	100
Рутин	12.4±1.0	5.3±0.6	2.5±0.5	6.8±0.9	6.8±0.5
Изокверцитрин	87.6±2.3	70.0±3.4	72.8±3.5	70.0±2.9	68.6±2.6
Флавоноид (1)	–	0.7±0.1	–	–	–
Флавоноид (2)	–	0.9±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1	0.3±0.1
Гвайяверин	–	9.8±0.5	10.2±1.4	9.9±0.6	9.0±0.6
Гиперозид	–	11.4±0.5	10.7±0.9	10.8±1.1	13.0±1.3
Флавоноид (3)	–	1.9±0.2	2.7±0.8	1.5±0.1	2.3±0.1

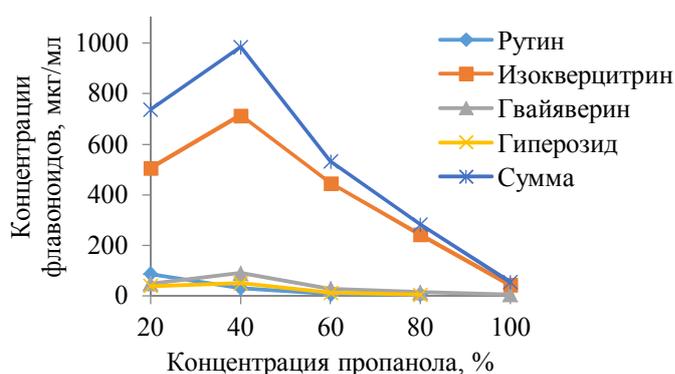


Рис. 2. Зависимость концентрации флавоноидов (мкг/мл) в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации пропанола ($P = 0.95$; $n = 3$)

Таблица 2. Зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации пропанола

Название флавоноида	Концентрация пропанола, %				
	20	40	60	80	100
Рутин	3.8±0.3	3.4±0.3	0.5±0.1	0.7±0.1	2.2±0.6
Изокверцитрин	68.5±2.3	68.9±3.4	82.8±3.5	86.1±3.2	80.3±4.0
Флавоноид (1)	0.3±0.1	1.7±0.2	–	–	–
Флавоноид (2)	0.3±0.1	0.4±0.1	1.1±0.2	0.4±0.1	1.0±0.2
Гвайяверин	10.6±0.7	14.5±0.9	8.0±2.0	8.4±1.1	16.5±2.1
Гиперозид	13.8±1.1	8.8±0.6	4.0±1.2	3.5±0.4	–
Флавоноид (3)	2.7±0.2	2.3±0.3	3.6±0.9	0.9±0.1	–

Из таблицы 2 следует, что наиболее разнообразными по составу оказались извлечения, полученные при экстракции 20 и 40% пропанолом. Дальнейшее увеличение концентрации пропанола приводило к тому, что в извлечениях не определялся флавоноид 1.

При экстракции метанолом, этанолом и пропанолом для изокверцитрина, гвайяверина и гиперозида наблюдался схожий характер экстракции при различных концентрациях. Кривые экстракции трех флавоноидов совпадали по форме с кривыми экстракции суммы флавоноидов. Эти три флавоноида являются гликозидами кверцетина и отличаются между собой природой сахарных остатков (у гвайяверина – арабиноза, у гиперозида – галактоза, у изокверцитрина – глюкоза). Наличием одинакового агликона и только одного сахарного остатка можно объяснить схожесть их экстракции различными концентрациями исследуемых одноатомных алифатических спиртов. Стоит отметить, что исследуемые спирты нивелировали различия в характерах экстракции между тремя разными гликозидами одного и того же агликона (изокверцитрином, гвайяверином и гиперозидом).

Рутин является также производным кверцетина, однако содержит остаток дисахарида рутинозы, поэтому для него характер экстракции отличался от трех предыдущих флавоноидов. В частности, данное соединение экстрагировалось меньшими концентрациями спиртов в виду большой гидрофильности молекулы.

При этом наблюдали обратную линейную зависимость ($R^2 = 1.00$; $y = -20 \cdot x + 100$) между количеством атомов углерода в молекуле спирта (x) и его концентрацией (y), при которой экстрагировалось максимальное количество флавоноидов.

На рисунке 3 представлена зависимость концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации ацетона.

Из рисунка 3 видно, что максимальное количество флавоноидов экстрагировалось 60% ацетоном. Дальнейшее увеличение концентрации ацетона приводило к снижению суммарной концентрации флавоноидов.

Британская и Европейская фармакопеи рекомендуют ацетон с небольшим содержанием водной компоненты для экстракции флавоноидов из травы золотарника [12, 13]. При этом 100% ацетоном извлекалось минимальное количество флавоноидов (в 29 раз меньше, чем 60% ацетоном). Поэтому требуется пересмотр подходов к экстракции флавоноидов из травы золотарника в направлении разработки методик их количественного определения с учетом подбора оптимальных концентраций экстрагентов. Экстракция 40% ацетоном на 20% (отн.) статистически значимо менее эффективна ($p = 0.04$ по t-критерию Стьюдента), чем 60% ацетоном.

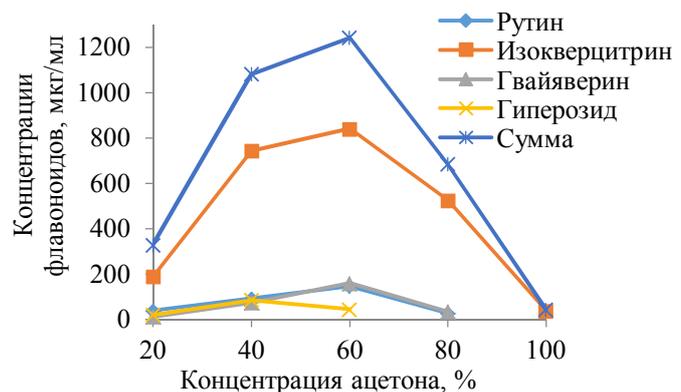


Рис. 3. Зависимость концентрации флавоноидов (мкг/мл) в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации ацетона ($P = 0.95$; $n = 3$)

Кривая экстракции суммы флавоноидов определена кривыми экстракции рутина, изокверцитрина и гвайяверина, для которых максимум экстракции также наблюдался при использовании 60% ацетона как экстрагента. Максимальное содержание гиперозида приходилось на экстракцию 40% ацетоном (в 1.9 раза больше, чем 60% ацетоном).

В таблице 3 представлена зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации ацетона.

Извлечения, полученные при экстракции ацетоном в концентрациях 20, 40 и 60%, наиболее разнообразны по составу флавоноидов. Ацетоновое извлечение содержало только три флавоноида, для удельного содержания которых наблюдали широкие доверительные интервалы, что указывало на низкую воспроизводимость результатов определения суммарного содержания флавоноидов ($RSD_{\text{ацетон}} = 22.2\%$; $RSD_{60\% \text{ ацетон}} = 4.2\%$). Резкое снижение концентрации флавоноидов при экстракции 100% ацетоном обусловлено отсутствием в получаемых извлечениях рутина, гвайяверина, гиперозида и флавоноида 3.

На рисунке 4 представлена зависимость концентрации флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации диметилсульфоксида.

Из рисунка 4 следует, что максимум экстракции суммы флавоноидов приходился на 80% диметилсульфоксид. Дальнейшее увеличение концентрации экстрагента до 100% привело к снижению суммарного содержания флавоноидов в 1.6 раза. В диапазоне концентраций диметилсульфоксида: от 20 до 60% происходило увеличение суммарного содержания флавоноидов.

Суммарные содержания флавоноидов при экстракции 60 и 80% диметилсульфоксидом статистически значимо не отличались ($p = 0.62$ по t-критерию Стьюдента). Данное плато формировалось за счет максимума экстракции гиперозида, гвайяверина 60% диметилсульфоксидом и изокверцитрина, рутина 80% экстрагентом.

В таблице 4 представлена зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации диметилсульфоксида.

Таблица 3. Зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации ацетона

Название флавоноида	Концентрация ацетона, %				
	20	40	60	80	100
Рутин	3.8±0.7	2.7±0.5	4.0±10.3	1.3±0.1	–
Изокверцитрин	54.2±1.8	67.7±2.2	63.7±1.6	76.8±2.5	88.6±5.7
Флавоноид (1)	0.9±0.1	0.2±0.1	1.7±0.2	1.2±0.1	6.2±1.8
Флавоноид (2)	0.8±0.1	1.0±0.2	2.2±0.2	0.8±0.1	5.2±0.6
Гвайяверин	9.6±1.1	10.6±0.6	19.0±1.1	7.7±1.0	–
Гиперозид	10.2±0.5	13.4±1.3	6.0±0.5	–	–
Флавоноид (3)	20.5±1.2	4.4±0.6	3.4±0.4	12.2±0.8	–

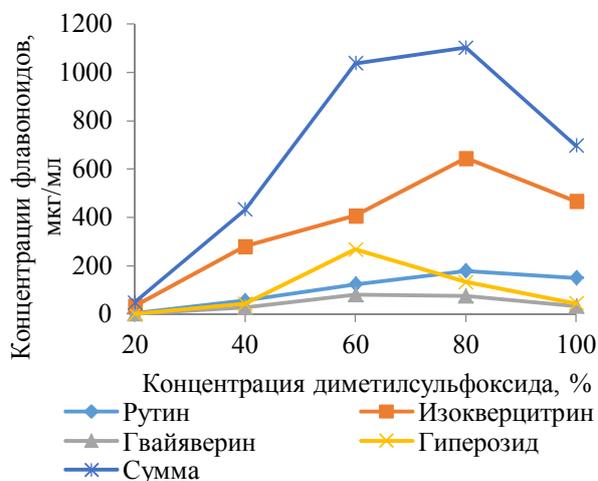


Рис. 4. Зависимость концентрации флавоноидов (мкг/мл) в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации диметилсульфоксида ($P = 0.95$; $n = 3$)

Таблица 4. Зависимость удельного содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от концентрации диметилсульфоксида

Название флавоноида	Концентрация диметилсульфоксида, %				
	20	40	60	80	100
Рутин	4.4±0.3	4.2±0.6	3.8±1.4	8.9±0.6	11.8±0.3
Изокверцитрин	34.1±1.4	64.1±2.0	39.2±1.9	57.4±1.8	53.1±2.2
Флавоноид (2)	10.9±0.3	1.0±0.2	2.0±0.4	1.1±0.1	3.7±0.3
Гвайяверин	6.5±0.6	10.5±0.7	12.4±1.1	10.9±0.5	9.2±0.5
Гиперозид	44.1±0.4	16.8±1.1	42.2±1.6	20.9±1.4	22.2±1.2
Флавоноид (3)	–	3.4±0.3	0.4±0.1	0.8±0.1	–

Из таблицы 4 следует, что формирование плато экстракции на концентрациях 60 и 80% диметилсульфоксида обусловлено разнородным характером экстракции изучаемых флавоноидов: при экстракции диметилсульфоксидом в концентрации 60% снижалось удельное содержание изокверцитрина и рутина с увеличением доли гиперозида по сравнению с экстракцией 80% диметилсульфоксидом.

В таблице 5 представлена зависимость содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от природы экстрагента.

Указанные в таблице 5 экстрагенты извлекали от двух до пяти флавоноидов. В ходе экстракции при переходе от пропанола к пропанолу-2 суммарное содержание флавоноидов увеличивалось в 1.5 раза. Однако в случае перехода от бутанола к бутанолу-2 снижалось в 2 раза.

При излечении абсолютными экстрагентами максимальное суммарное содержание флавоноидов приходилось на экстракцию 100% диметилсульфоксидом (в 1.5 раза больше, чем 100% метанолом). Экстрагирующая способность уменьшалась в ряду: диметилсульфоксид > метанол > этанол > этилацетат > пропанол-2 > пропанол > ацетон > бутанол > бутанол-2.

При помощи дисперсионного анализа оценили влияние природы и концентрации исследуемых экстрагентов на содержание флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского. Его результаты приведены в таблице 6.

Из таблицы 6 следует, что диэлектрическая проницаемость статистически значимо ($p < 0.05$) влияла на содержание изокверцитрина и суммарное содержание флавоноидов, динамическая вязкость – на содержание рутина, изокверцитрина, гвайяверина, гиперозида и суммарное содержание флавоноидов. Наибольшее влияние на содержание гвайяверина и гиперозида оказывала динамическая вязкость, так как для этого фактора рассчитаны наименьшие значения уровней значимости.

Таким образом, динамическую вязкость экстрагентов можно считать одним из наиболее критических факторов экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского. Поэтому требуется тщательный подбор экстрагентов с определенным значением динамической вязкости, которая наиболее значимо влияла на содержание флавоноидов в полученных извлечениях.

Пропанол с диэлектрической проницаемостью, близкой ацетону, но в шесть раз более вязкий извлекал на 25.5% (отн.) больше суммы флавоноидов, чем ацетон.

Таблица 5. Зависимость содержания флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского, от природы экстрагента

Название флавоноида	Экстрагент							
	Бутанол		Пропанол-2		Бутанол-2		Этилацетат	
	Концентрация, мкг/мл	Удельное содержание, %						
Рутин	–	–	5.5±0.6	6.6±0.3	17.1±0.7	82.6±2.2	–	–
Изокверцитрин	20.1±2.2	47.5±2.2	59.0±1.2	71.4±1.2	1.9±0.2	9.4±0.8	54.0±1.2	54.0±1.3
Флавоноид (1)	–	–	–	7.0±0.5	–	–	–	–
Флавоноид (2)	–	–	–	–	–	–	–	–
Гвайяверин	–	–	1.0±0.1	1.9±0.1	–	–	–	–
Гиперозид	22.1±1.8	52.5±2.1	6.3±0.7	13.1±0.5	1.7±0.1	8.0±10.4	39.2±0.9	46.0±1.2
Флавоноид (3)	–	–	–	–	–	–	–	–
Сумма	42.3±2.1	100	82.7±2.3	100	20.7±0.3	100	93.2±1.9	100

Концентрации экстрагентов, приведенные в таблице 6, статистически значимо ($p < 0.05$) влияли на содержание изокверцитрина и суммарное содержание флавоноидов; концентрация метанола – дополнительно на содержание гиперозида. Одинаковые размерности уровней значимости указывали на идентичное влияние концентрации экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского.

Водные растворы (80% метанол, 60% этанол, 40% пропанол, 80% диметилсульфоксид, 60% ацетон) лучше извлекали флавоноиды из травы золотарника канадского, чем соответствующие 100% экстрагенты, т.е. для улучшения извлечения флавоноидов из травы золотарника канадского рекомендуется использовать водные растворы соответствующих органических экстрагентов. Данный факт можно объяснить присутствием молекул воды, которая смачивает поверхность частичек растительного сырья, способствует его набуханию с десорбцией и последующей диффузией веществ в экстрагент.

Для оценки статистической значимости различий между максимумами экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского для различных концентраций экстрагентов провели t-тест. Его результаты представлены в таблице 7.

Таблица 6. Результаты дисперсионного анализа влияния природы и концентрации экстрагентов на содержание флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского

Исследуемый фактор Название флавоноида	Уровень значимости (p)					
	Диэлектрическая проницаемость (ϵ)	Динамическая вязкость ($\eta \cdot 10^3$, Па·с)	Концентрация метанола	Концентрация пропанола	Концентрация ацетона	Концентрация диметилсульфоксида
Рутин	0.33	0.01	0.16	0.30	0.59	0.25
Изокверцитрин	4.7×10^{-2}	0.02	0.01	0.02	0.03	0.02
Гвайверин	0.33	2.2×10^{-3}	0.87	0.33	0.79	0.47
Гиперозид	0.70	1.0×10^{-3}	0.02	0.12	0.67	0.47
Сумма	0.04	0.03	0.01	0.02	0.03	0.02

Таблица 7. Результаты оценки статистической значимости различий по t-тесту между максимумами экстракции суммы флавоноидов для различных концентраций экстрагентов

	80% метанол	60% этанол	40% пропанол	80% диметилсульфоксид
80% метанол	–	–	–	–
60% этанол	0.47	–	–	–
40% пропанол	0.11	0.16	–	–
80% диметилсульфоксид	0.22	0.08	0.25	–
60% ацетон	0.57	0.88	0.07	0.11

Из таблицы 7 следует, что между максимальными суммарными содержаниями флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского при помощи различных концентраций метанола, этанола, пропанола, диметилсульфоксида и ацетона, статистически значимые различия отсутствовали ($p > 0.05$), т.е. добавление воды к используемому экстрагенту нивелировало исходную разницу в экстракции флавоноидов 100% экстрагентами.

С учетом отсутствия разницы в количественных характеристиках экстракции вышеуказанными концентрациями экстрагентов для определения оптимального экстрагента изучали воспроизводимость экстракции суммы флавоноидов ($n = 6$). $RSD_{80\% \text{ метанол}} = 5.3\%$; $RSD_{60\% \text{ этанол}} = 3.2\%$; $RSD_{40\% \text{ пропанол}} = 9.4\%$; $RSD_{80\% \text{ диметилсульфоксид}} = 4.7\%$; $RSD_{60\% \text{ ацетон}} = 4.2\%$. Наименьшее значение RSD (в 1.3 раза меньше, чем для 60% ацетона) рассчитано при экстракции 60% этанолом, т.е. экстракция 60% этанолом имела наилучшую воспроизводимость.

В информации, подготовленной Европейским медицинским агентством по траве золотарника, отмечено, что диуретическую активность проявляет фракция фенольных соединений, содержащая помимо флавоноидов гидроксикоричные кислоты [8]. Поэтому при выборе оптимального экстрагента среди перечисленных в предыдущем абзаце учитывали содержание в полученных извлечениях гидроксикоричных кислот (сопутствующих фенольных соединений с диуретическими свойствами). Показано, что в извлечении, полученном при экстракции 80% метанолом, содержалось $171,8 \pm 3,2$ мкг/мл суммы гидроксикоричных кислот (хлорогеновая, кофейная, феруловая, цикориевая и неидентифицированная гидроксикоричная кислота), 60% этанолом – 182.2 ± 2.3 мкг/мл (хлорогеновая, кофейная, феруловая, цикориевая и 4 неидентифициро-

ванные гидроксикоричные кислоты); 40% пропанолом – 88.3±1.1 мкг/мл (хлорогеновая, кофейная, феруловая, цикориевая и неидентифицированная гидроксикоричная кислоты); 60% ацетоном – 10.8±0.5 мкг/мл (хлорогеновая и феруловая кислоты) и 80% диметилсульфоксидом – 86.7±1.5 мкг/мл (феруловая кислота). Наибольшее разнообразие по составу и содержанию гидроксикоричных кислот отмечено для извлечения, полученного при экстракции 60% этанолом.

Учитывая лучшую воспроизводимость экстракции суммы флавоноидов, широкое использование как экстрагентов этанола и его водных растворов, отнесение данного растворителя к 3 классу по степени риска (малотоксичные растворители) и большую извлекающую способность в отношении гидроксикоричных кислот, в дальнейших исследованиях рекомендуется использовать для экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского 60% этанол.

Выводы

Экстрагирующая способность абсолютных экстрагентов при экстракции флавоноидов из травы золотарника канадского уменьшалась в ряду: диметилсульфоксид > метанол > этанол > этилацетат > пропанол-2 > пропанол > ацетон > бутанол > бутанол-2. Водные растворы экстрагентов обладали большей экстрагирующей способностью, нежели соответствующие абсолютные экстрагенты.

Максимальное количество флавоноидов из травы золотарника канадского извлекалось 80% метанолом, 60% этанолом, 40% пропанолом, 80% диметилсульфоксидом и 60% ацетоном. Между суммарными содержаниями флавоноидов в извлечениях, полученных при экстракции данными концентрациями экстрагентов, отсутствовали статистически значимые отличия. Наилучшей воспроизводимостью экстракции (RSD = 3.2%) обладал 60% этанол, который в дальнейшем рекомендован для извлечения флавоноидов из травы золотарника канадского.

Значительным изменениям подвергался состав получаемых извлечений в зависимости от природы и концентрации экстрагентов. В них обнаруживали от двух до семи флавоноидов, доминировал изокверцитрин. Характер экстракции суммы флавоноидов преимущественно определялся доминирующим гликозидом – изокверцитрином.

Диэлектрическая проницаемость, динамическая вязкость и концентрация экстрагентов статистически значимо влияли на содержание флавоноидов в извлечениях, полученных из травы золотарника канадского. Наиболее критическим фактором экстракции являлась динамическая вязкость.

Список литературы

1. Карпова В.И., Гурина Н.С., Бузук Г.Н., Коноплева М.М., Любаковская Л.А., Кузьмичева Н.А., Кузнецова Н.П., Ловчиновский Ю.О. Флора Республики Беларусь: медицинское и хозяйственное значение. Витебск, 2004. Т. 2. 604 с.
2. Вторичный ареал: Золотая розга канадская, или Золотарник канадский *Solidago canadensis* L. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bookblack.ru/areal/17.htm>.
3. Flora of New York. [Электронный ресурс]. URL: https://en.wikibooks.org/wiki/Flora_of_New_York#Asterales
4. Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. Исторический опыт и перспективы использования травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) в медицине // Здоровье и образование в XXI веке. 2017. Т. 19. №4. С. 142–149.
5. Community herbal monograph on *Solidago virgaurea* L., Herba. [Электронный ресурс]. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-solidago-virgaurea-l-herba_en.pdf.
6. Pharmacopée Française. Paris, 1989. 650 s.
7. Overview of comments received on «Community herbal monograph on *Solidago virgaurea* L., Herba». [Электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Overview_of_comments_received_during_consultation/2009/12/WC500018158.pdf.
8. Assessment report on *Solidago virgaurea* L., Herba. [Электронный ресурс]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPc_assessment_report/2009/12/WC500018161.pdf.
9. Schilcher H., Rau H. Nachweis der aquaretischen Wirkung von Birkenblätter und Gold-rutenauszügen im Tierversuch // Urologe. 1988. Vol. 28. S. 274–280.
10. Marksa M., Radusiene J., Jakstas V., Ivanauskas L., Marksiene R. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers // Natura Product Research. 2016. Vol. 30. N5. Pp. 536–543. DOI: 10.1080/14786419.2015.1027703
11. Tao J.I.A.N.G., Bao-Kang H.U.A.N.G., Lu-Ping Q.I.N. A survey of chemical and pharmacological studies on *Solidago* // Journal of Chinese Integrative Medicine. 2004. Vol. 4. N4. Pp. 430–435.

12. British Pharmacopoeia. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.pharmacopoeia.com/>
13. European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.edqm.eu/>.
14. Apati P.G. Antioxidant constituents in *Solidago canadensis* L. and its traditional phytopharmaceuticals: thesis ... Ph. D. Budapest, 2003. 19 p.
15. Савченко Л.Н., Маринина Т.Ф., Карпенко В.А. Получение экстракционного препарата противовоспалительного и мочегонного действия из травы золотарника канадского // Известия Самарского научного центра РАН. 2016. Т. 18. №2. С. 195–198.
16. Remil A., Chau-Chyun C. Solubility of Nutraceutical Compounds in Generally Recognized as Safe Solvents at 298 K // International Journal of Chemical Engineering and Applications. 2016. Vol. 7. N5. Pp. 289–294. DOI: 10.18178/ijcea.2016.7.5.591.
17. Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J.-M., Ghoul M. Solubility of Flavonoids in Organic Solvents // Journal of Chemical & Engineering Data. 2007. Vol. 52. N5. Pp. 1552–1556. DOI: 10.1021/je7001094
18. Dixon D., Jeena G. Comparison of Different Solvents for Phytochemical Extraction Potential from *Datura metel* Plant Leaves // International Journal of Biological Chemistry. 2017. Vol. 1. N11. Pp. 17–22. DOI: 10.3923/ijbc.2017.17.22
19. Iloki-Assanga S.B., Lewis-Lujan L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., Haines D.D. Solvent effects on phytochemical constituent profiles and antioxidant activities, using four different extraction formulations for analysis of *Bucida buceras* L. and *Phoradendron californicum* // BMC Res Notes, 2015. N8. Pp. 396–409. DOI: 10.1186/s13104-015-1388-1.
20. Ушанова В.М., Ушанов С.В., Ченцова Л.И. Влияние физических свойств растворителя на процесс экстракции коры хвойных пород // Вестник КраГАУ. 2009. №12. С. 210–214.
21. ТКП 450-2012 (02041). Производство лекарственных средств. Надлежащая практика выращивания, сбора, хранения лекарственного растительного сырья. Минск, 2013. 14 с.
22. Zhang D.X. WHO guidelines on good agricultural and collections practices (GACP) for medicinal plants. Geneva, 2003. 72 p.
23. Равдель А.А., Пономарева А.М. Краткий справочник физико-химических величин. СПб, 2003. 240 с.
24. Моисеев Д.В., Бузук Г.Н., Шелого В.Л. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ // Химико-фармацевтический журнал. 2011. Т. 45. №1. С. 35–38.
25. Лукашов Р.И. Факторы, влияющие на водно-спиртовую экстракцию флавоноидов из травы золотарника канадского // Рецепт. 2018. Т. 21. №1. С. 10–25.

Поступила в редакцию 20 марта 2018 г.

После переработки 7 мая 2018 г.

Принята к публикации 7 мая 2018 г.

Для цитирования: Лукашов Р.И. Влияние природы и концентрации экстрагентов на извлечение флавоноидов из травы золотарника канадского // Химия растительного сырья. 2018. №4. С. 113–123. DOI: 10.14258/jcrpm.2018043863.

Lukashov R.I. INFLUENCE OF THE NATURE AND CONCENTRATION OF EXTRACTANTS ON THE EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM THE CANADIAN GOLDENROD GRASS

Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University, pr. Frunze, 27, Vitebsk, 220023 (Republic of Belarus), e-mail: r_lukashov@mail.ru

The paper presents the results of the study of influence of nature (in particular, dielectric constant and dynamic viscosity) and the concentration of the following extractants: methanol, ethanol, propanol, acetone, dimethylsulfoxide, ethyl acetate, propanol-2, butanol, butanol-2 for the extraction of flavonoids from Canadian goldenrod grass. The content of flavonoids in extracts prepared from the Canadian goldenrod grass was statistically significant ($p < 0.05$) depending on the nature and concentration of the extractants used to prepare them. The most critical factor influencing on the extraction of this group of biologically active substances was the dynamic viscosity of the extractant. It was found that aqueous solutions of extractants have a greater extractive capacity than the corresponding absolute extractants. The maximum amount of flavonoids was extracted with use 80% methanol, 60% ethanol, 40% propanol, 60% acetone and 80% dimethylsulfoxide. From two to seven flavonoids were detected using the high-performance liquid chromatography method in the prepared extracts. The manner of the extraction of the flavonoids sum was predominantly determined by the dominant glycoside – isoquercitrin. Considering the better reproducibility of the extraction of the flavonoids sum, the wide application of ethanol and its aqueous solutions as extractants, the attribution of this extractant to low-toxic solvents and a greater extractive capacity for other classes of phenolic compounds (in particular, hydroxycinnamic acids), 60% ethanol is recommended to use for extraction of flavonoids from the Canadian goldenrod grass.

Keywords: Canadian goldenrod, extractants, 60% ethanol, flavonoids, phenolic compounds.

References

1. Karpova V.I., Gurina N.S., Buzuk G.N., Konopleva M.M., Lyubakovskaya L.A., Kuz'micheva N.A., Kuznetsova N.P., Lovchinovskiy Yu.O. *Flora Respubliki Belarus': meditsinskoye i khozyaystvennoye znacheniyе*. [Flora of the Republic of Belarus: medical and economic value]. Vitebsk, 2004, vol. 2, 604 p. (in Russ.).
2. *Vtorichnyy areal: Zolotaya rozga kanadskaya, ili Zolotarnik kanadskiy Solidago canadensis L.* [Secondary range: Canadian Golden Rod, or Canadian Goldenrod *Solidago canadensis L.*] [Electronic resource]. URL: <http://www.bookblack.ru/areal/17.htm>. (in Russ.).
3. *Flora of New York*. [Electronic resource] URL: https://en.wikibooks.org/wiki/Flora_of_New_York#Asterales
4. Suleymanova F.Sh., Nesterova O.V., Matyushin A.A. *Zdorov'ye i obrazovaniye v XXI veke*, 2017, vol. 19, no. 4, pp. 142–149. (in Russ.).
5. *Community herbal monograph on Solidago virgaurea L., Herba*. [Electronic resource]. URL: https://www.ema.europa.eu/documents/herbal-monograph/final-community-herbal-monograph-solidago-virgaurea-l-herba_en.pdf.
6. *Pharmacopoe Française*, Paris, 1989. 650 s.
7. *Overview of comments received on «Community herbal monograph on Solidago virgaurea L., Herba»*. [Electronic resource]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Overview_of_comments_received_during_consultation/2009/12/WC500018158.pdf.
8. *Assessment report on Solidago virgaurea L., Herba*. [Electronic resource]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_HMPc_assessment_report/2009/12/WC500018161.pdf.
9. Schilcher H., Rau H. *Urologe*, 1988, vol. 28, pp. 274–280.
10. Marksa M., Radusiene J., Jakstas V., Ivanauskas L., Marksiene R. *Natura Product Research*, 2016, vol. 30, no. 5, pp. 536–543. DOI: 10.1080/14786419.2015.1027703.
11. Tao J.I.A.N.G., Bao-Kang H.U.A.N.G., Lu-Ping Q.I.N. *Journal of Chinese Integrative Medicine*, 2004, vol. 4, no. 4, pp. 430–435.
12. British Pharmacopoeia. [Electronic resource]. URL: <https://www.pharmacopoeia.com/>
13. European Pharmacopoeia: EDQM. 9th Edition. [Electronic resource]. URL: <http://www.edqm.eu/>.
14. Apati P.G. *Antioxidant constituents in Solidago canadensis L. and its traditional phytopharmaceuticals: thesis ... Ph. D.* Budapest, 2003, 19 p.
15. Savchenko L.N., Marinina T.F., Karpenko V.A. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra RAN*, 2016, vol. 18, no. 2, pp. 195–198. (in Russ.).
16. Remil A., Chau-Chyun C. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 2016, vol. 7, no. 5, pp. 289–294. DOI: 10.18178/ijcea.2016.7.5.591
17. Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J.-M., Ghoual M. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 2007, vol. 52, no. 5, pp. 1552–1556. DOI: 10.1021/jc7001094.
18. Dixon D., Jeena G. *International Journal of Biological Chemistry*, 2017, vol. 1, no. 11, pp. 17–22. DOI: 10.3923/ijbc.2017.17.22.
19. Iloki-Assanga S.B., Lewis-Lujan L.M., Lara-Espinoza C.L., Gil-Salido A.A., Fernandez-Angulo D., Rubio-Pino J.L., Haines D.D. *BMC Res Notes*, 2015, no. 8, pp. 396–409. DOI: 10.1186/s13104-015-1388-1.
20. Ushanova V.M., Ushanov S.V., Chentsova L.I. *Vestnik KraGAU*, 2009, no. 12, pp. 210–214. (in Russ.).
21. *TKP 450-2012 (02041). Proizvodstvo lekarstvennykh sredstv. Nadlezhashchaya praktika vyrashchivaniya, sbora, khraneniya lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya*. [TCP 450-2012 (02041). Production of medicines. Proper practice of cultivation, collection, storage of medicinal plant materials]. Minsk, 2013, 14 p. (in Russ.).
22. Zhang D.X. *WHO guidelines on good agricultural and collections practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva, 2003, 72 p.
23. Ravdel' A.A., Ponomareva A.M. *Kratkiy spravochnik fiziko-khimicheskikh velichin*. [Quick reference physico-chemical quantities]. St. Petersburg, 2003, 240 p. (in Russ.).
24. Moiseyev D.V., Buzuk G.N., Shelyuto V.L. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*, 2011, vol. 45, no. 1, pp. 35–38. (in Russ.).
25. Lukashov R.I. *Retsept*, 2018, vol. 21, no. 1, pp. 10–25. (in Russ.).

Received March 20, 2018

Revised May 7, 2018

Accepted May 7, 2018

For citing: Lukashov R.I. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2018, no. 4, pp. 113–123. (in Russ.).
DOI: 10.14258/jcprm.2018043863.

