

УДК 66.061.34

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ВОДНО-СПИРТОВОЙ СМЕСЬЮ ИЗ СОЦВЕТИЙ *ARNICA MONTANA* L., ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ АРКТИЧЕСКОЙ ЗОНЫ РФ В УСЛОВИЯХ ИНТРОДУКЦИИ*

© Л.Н. Серeda^{1**}, О.Ю. Носатенко², Н.С. Цветов¹

¹ Лаборатория медицинских и биологических технологий Центр наноматериаловедения ФИЦ «Кольский научный центр РАН», ул. Ферсмана, 14, Апатиты, 184209, Россия, sundukpandory87@mail.ru

² Полярно-альпийский ботанический сад-институт им. Н.А. Аврорина ФИЦ «Кольский научный центр РАН», ул. Ферсмана, 22а, Апатиты, 184209, Россия

Арника горная (*Arnica montana* L.) – многолетний особоохраняемый травянистый вид рода Арника (*Arnica* L.) семейства сложноцветные (*Asteraceae* Bercht. & J.Presl), произрастающий преимущественно в лесах и на лесных лугах Западной и Центральной Европы, в горных районах поднимающийся до альпийского пояса и успешно интродуцируемый на территории Арктической зоны РФ. Соцветия растения обладают гемостатическими, противовоспалительными, ранозаживляющими, анальгезирующими, противосклеротическими свойствами, обусловленными высоким содержанием фенольных соединений, полное извлечение которых требует разработки условий, направленных на получение экстрактов, содержащих максимальное количество целевых компонентов при их минимальной деструкции. В связи с перспективами использования соцветий растений арники в сфере здравоохранения в настоящей работе впервые проведена оптимизация условий метода ультразвуковой экстракции водно-этанольной смесью с использованием однофакторного анализа и алгоритма Бокса-Бенкена. Кинетика процесса экстракции аппроксимирована уравнением реакции второго порядка. Определены оптимальная продолжительность экстрагирования, концентрация экстрагента, мощность ультразвукового воздействия, диаметр фракций растительного сырья, гидромодуль и температура экстрагирования. Определено содержание полифенолов, флавоноидов, фенольных кислот, оценена антиоксидантная активность и степень ингибирования радикалов. Полученные результаты могут быть применены при разработке технологий производства фитопрепаратов для использования в фармацевтической и косметологической промышленности.

Ключевые слова: *Arnica montana* L., соцветия, ультразвуковая экстракция, оптимизация, биологически активные вещества, Арктика.

Для цитирования: Серeda Л.Н., Носатенко О.Ю., Цветов Н.С. Оптимизация метода ультразвуковой экстракции биологически активных соединений водно-спиртовой смесью из соцветий *Arnica montana* L., произрастающей на территории арктической зоны РФ в условиях интродукции // Химия растительного сырья. 2025. №1. С. 276–285. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250115372>.

Введение

Арника горная (*Arnica montana* L.) – представитель семейства сложноцветные (*Asteraceae* Bercht. & J.Presl), многолетний травянистый вид, произрастающий в лесах и на лесных лугах Западной и Центральной Европы, горных районах Западной Украины, Белоруссии, Прибалтики на высоте до 1000 м, Альпах – до 2800 м н.у.м. [1] и успешно интродуцируемый на территории Арктической зоны Российской Федерации.

* Данная статья имеет электронный дополнительный материал (приложение), который доступен читателям на сайте журнала. DOI: 10.14258/jcprm.20250115372s

** Автор, с которым следует вести переписку.

В народной медицине арника горная используется для наружного применения в виде настоев в составе мазей [2, 3]. Также имеется значительный потенциал применения в фармацевтике, так, экстракты соцветий растений арники, содержащие терпеноиды (арпидиол, фарадиол), флавоноиды, дубильные вещества, фенольные кислоты и их производные [4, 5], обладают гемостатическим, противовоспалительным, ранозаживляющим, антиоксидантным действиями. Установлено, что высокое содержание арпидиола улучшает трофику миокарда и обеспечивает гемостатический эффект, фарадиола – оказывает местнораздражающее действие и способствует рассасыванию гематом [4, 6–8].

Вследствие интенсивного сбора в настоящее время вид входит в Красный список Международного союза охраны природы (IUCN Red List) и включен в Красные Книги Белоруссии, Украины и Прибалтики [9], в связи с чем остро встает вопрос о возможности культивирования и выращивания вида в качестве лекарственного сырья в условиях интродукции. В Полярно-альпийском ботаническом саду-институте им. А.Н. Аврорина (ПАБСИ) ФИЦ КНЦ РАН арника горная культивируется с 1933 года. За это время испытано более 80 образцов различного происхождения – культурного (из ботанических садов) и природного (из природных мест обитания) [10].

Учитывая охранный статус и значительный фармацевтический потенциал вида, необходимо проведение определения оптимальных условий процесса экстракции, направленное на получение максимального количества биоактивных веществ и предотвращение их разрушения при минимальных затратах растительного материала. К настоящему времени для экстрагирования биологически активных соединений из соцветий арники горной применяются методы мацерации [11–14], ультразвуковой [11, 15–17], субкритической водной [11], микроволновой [11], сверхкритической [18, 19] экстракции, с использованием в качестве экстрагентов дистиллированной воды [11], этанола [11, 13, 14], метанола [12, 15] и их смесей [16, 17].

Среди перечисленных методов наиболее перспективным и рентабельным может являться ультразвуковая экстракция, зарекомендовавшая себя в современных исследованиях [20–22]. Применение ультразвукового воздействия для получения экстрактов дает значительные преимущества по сравнению с традиционными методами: мацерацией, экстракцией в аппарате Сокслета, кипячением с обратным холодильником – сохранение термолабильных соединений, увеличение выхода экстрактивных веществ, сокращение продолжительности экстракции, расхода растворителя, потребления электроэнергии [23, 24]. Однако комплексные исследования по влиянию мощности ультразвукового воздействия и его продолжительности, состава экстрагента, температуры экстракции, диаметра частиц растительного материала и гидромодуля на степень извлечения биоактивных веществ из растений изучаемого вида все еще отсутствуют.

Цель настоящей работы – проведение оптимизации условий ультразвуковой экстракции биологически активных веществ с использованием водно-этанольных смесей из соцветий *Arnica montana*, произрастающей на территории Арктической зоны РФ в условиях интродукции.

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили соцветия растений арники горной, являющиеся результатом репродукции в 4 поколении посева 1976 г. из семян культурного происхождения, полученных из ботанического сада г. Самеэнс (Alpine Botanical Garden Jaësinia, Sameöns) в 1939 г., собранные на интродукционном питомнике многолетних травянистых растений ПАБСИ (67°38'с.ш. и 33°37'в.д.), расположенном на открытой площадке у подножия г. Вудъяврчорр на высоте 340 м н. у. м. Хибинского горного массива в Кировском районе Мурманской области в I декаду августа 2023 г. в фазу массового цветения (ВВСН 65). Регистрация фенологических фаз производилась по методике [25] с последующим переводом в международную шкалу ВВСН [26, 27].

Подготовка растительного материала включала в себя сушку на открытом воздухе и хранение в соответствии с [28], измельчение и ситование. Для получения экстрактов использовалось растительное сырье, измельченное до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм.

Экстрагирование проводилось методом ультразвуковой экстракции в предварительно термостатированной ультразвуковой ванне VBS-3DP (Вилитек, Россия) с частотой 40 кГц и максимальной мощностью 120 Вт и нагреванием с обратным холодильником на кипящей водяной бане в водно-спиртовой смеси с содержанием 70 об.% этанола и гидромодулем 1 : 100 в течение 30 мин, в соответствии с ГОСТ 13399-89 «Цветки арники» [29], и дальнейшим центрифугированием в течение 5 мин в лабораторной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 8000 об./мин.

Оптимизация условий экстрагирования состояла из трех этапов и производилась при помощи однофакторного анализа [30] и алгоритма Бокса-Бенкена [20]. Первый этап состоял из определения оптимальной продолжительности и кинетических параметров экстракции при температуре (Т) 45 °С, мощности ультразвукового воздействия (W) – 50%, гидромодуле (отношении сухого растительного материала к объему экстрагента (m/v)) – 1 : 30 и диаметре (d) фракций растительного материала – 1 мм. Для аппроксимации полученных данных по кинетике извлечения фенольных компонентов из соцветий растений арники было применено уравнение реакции второго порядка [31, 32], описывающее зависимость значения соответствующего параметра экстракта (Y_t) от времени (t) через константу скорости (k, г мг⁻¹ мин⁻¹) и равновесное значение параметра экстракта (Y^{eq}) путем линеаризации в координатах tY_t от t.

На втором этапе работы определялась оптимальная концентрация водно-спиртовой смеси с содержанием этилового спирта в диапазоне от 0 до 90 об. %.

На последнем этапе оптимизации для расчета оптимальных температуры экстракции, гидромодуля и мощности ультразвукового воздействия был использован алгоритм Бокс-Бенкен с тремя уровнями трех параметров и пятикратным повторением центральной точки. Определяемые параметры и их уровни приведены в таблице 1 электронного приложения.

Общее содержание полифенолов (total phenolic content (TPC)), флавоноидов (total flavonoid content (TFC)), антиоксидантной активности (total antioxidant capacity (TAC)) и степени ингибирования (I) свободного – DPPH• (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) и катион – ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) радикалов, проводили в соответствии с [18, 33] с доработками, и выражали их содержание в мг эквивалента галловой кислоты (gallic acid equivalent (GAE)), рутина (rutin equivalent (RE)), аскорбиновой кислоты (ascorbic acid equivalent (AAE)) и в %, соответственно, на 1 г сухого растительного материала. Для определения показателей TAC использовались нативные экстракты, для TPC, TFC и I (DPPH•) – разбавленные в 10 раз, для I (ABTS•+) – в 50 раз. Оптическую плотность растворов измеряли на фотоколориметре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия).

Определение количественного содержания полифенольных кислот проводилось методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на жидкостном хроматографе «Милихром А-02» (ЭкоНова, Россия) с колонкой ProntoSil-120-5-C18 AQ (Bishoff, Германия) (длина 75 мм, диаметр 2 мм, размер частиц 5 мкм). Градиентное элюирование осуществлялось смесью 0.2М LiClO₄ - 0.05М HClO₄ (А) и ацетонитрила (В): 6 мин 0% В, 6–30 мин 0–40% В. Скорость потока составляла 100 мкл/мин. Объем пробы экстракта, разбавленного в 10 раз смесью ацетонитрил + вода (1 : 1), – 2 мкл. Детектирование осуществлялось при длине волны 210 нм. Градуировка производилась с использованием стандартных образцов галловой, хлорогеновой, кофейной, феруловой, бензойной и коричной кислот. Градуировочные зависимости были определены в концентрационном диапазоне 6.25–100 мкг/мл.

Все химические анализы проводились в 3-кратной повторности. Полученные данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение и в %. Статистическая значимость различий обсуждаемых результатов оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением теста Тьюки при уровне значимости (p-value) ≤ 0.05. Расчеты проводились в MS Excel 2021 (Microsoft, США). Обработка данных оптимизации по алгоритму Бокса-Бенкена проводилась с помощью моделирования поверхности отклика в программе Design-Expert 11 Trial (Stat-Ease Inc., США). Правильность выбора модели оценивалась с помощью коэффициента детерминации (R^2).

Результаты и обсуждение

Для аппроксимации данных по кинетике экстракции полифенолов и флавоноидов из соцветий растений арники было применено уравнение реакции второго порядка. Полученные значения констант скорости (k, г мг⁻¹ мин⁻¹) и равновесных значений выхода определяемых групп компонентов (Y^{eq}) приведены в таблице 2 электронного приложения, сравнение экспериментальных данных и аппроксимационной кривой представлены на рисунке 1. Показано, что полученные данные достаточно хорошо аппроксимируются примененным уравнением, константы скорости экстракции полифенолов и флавоноидов одинаковы, коэффициенты детерминации составляют более 0.999, а основной процесс экстракции завершается через 20 мин.

Результаты подбора оптимальной концентрации экстрагента в диапазоне от 0 до 90 об. % представлены на рисунке 2. Видно, что наибольшее извлечение полифенолов и флавоноидов происходит водно-спиртовой смесью с содержанием 70 об. % этанола (45.1±0.5 мг GAE/г и 23.5±0.5 мг RE/г соответственно, p≤0.05).

Поверхности отклика для выхода суммы полифенолов и флавоноидов представлены на рисунках 3 и 4 и описываются уравнением:

$$Y_t = a_0 + a_1A + a_2B + a_3C + a_4AB + a_5AC + a_6BC + a_7A^2 + a_8B^2 + a_9C^2 + a_{10}A^2B + a_{11}A^2C + a_{12}AB^2,$$

где a_i – коэффициент при соответствующем члене уравнения; A – температура; °С, B – мощность, Вт; C – гидромодуль.

Значения коэффициентов при соответствующих термах моделей для описания поверхностей отклика представлены в таблице 3 электронного приложения.

Результаты дисперсионного анализа для уравнений, описывающих поверхности отклика для выхода суммы полифенолов и флавоноидов, приведены в таблице 4 и 5 электронного приложения. Из величины p -value, которая для значимых параметров должна быть меньше 0.05, видно, что в случае полифенольных компонентов значимыми являются все параметры, кроме AC и BC , для флавоноидов – все, кроме AC . R^2 составил 0.9996 и 0.9990 соответственно.

Исходя из полученных данных были рассчитаны оптимальные условия экстракции: мощность ультразвукового воздействия – 53%, температура экстракции – 60 °С, продолжительность экстракции – 20 мин, диаметр фракций растительного сырья – 1 мм, концентрация экстрагента – 70 об.%, гидромодуль 1 : 50, и проведен контрольный эксперимент, результаты которого согласуются с прогнозируемыми (табл. 6 электронного приложения).

Было проведено сравнение химического состава и антиоксидантной активности экстракта, полученного по предложенному методу, и экстракта, полученного в соответствии с ГОСТ 13399-89 «Цветки арники» [25] (табл.).

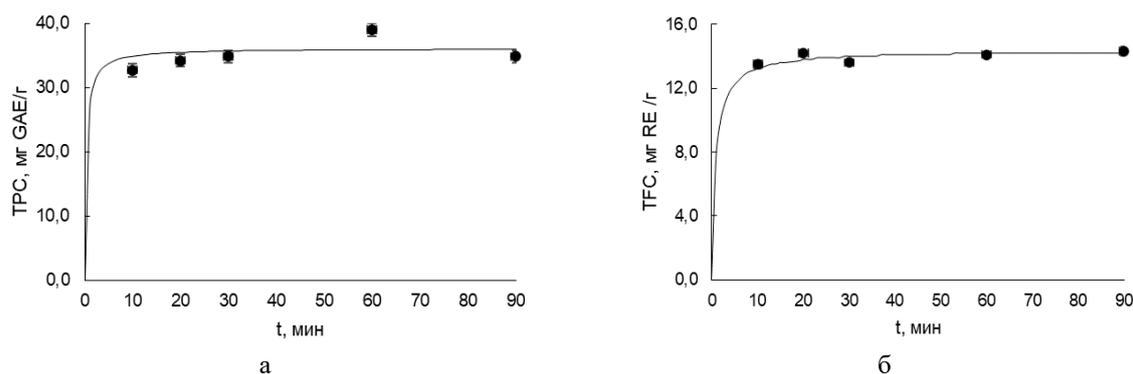


Рис. 1. Результаты сравнения экспериментальных (•) значений и результатов расчета (—) для выхода суммы полифенолов (а) и флавоноидов (б) из соцветий арники горной от времени

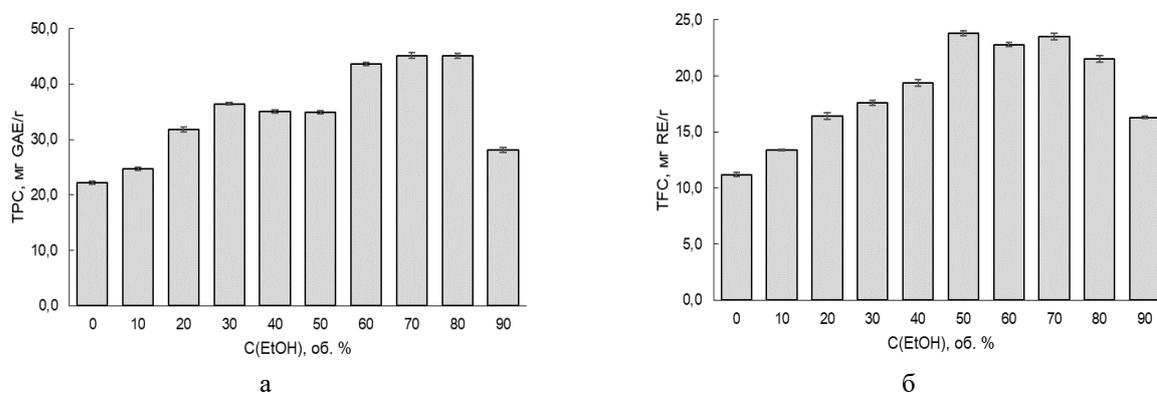


Рис. 2. Влияние концентрации этанола (C (EtOH), об. %) на выход суммы полифенолов (а) и флавоноидов (б) из соцветий арники горной

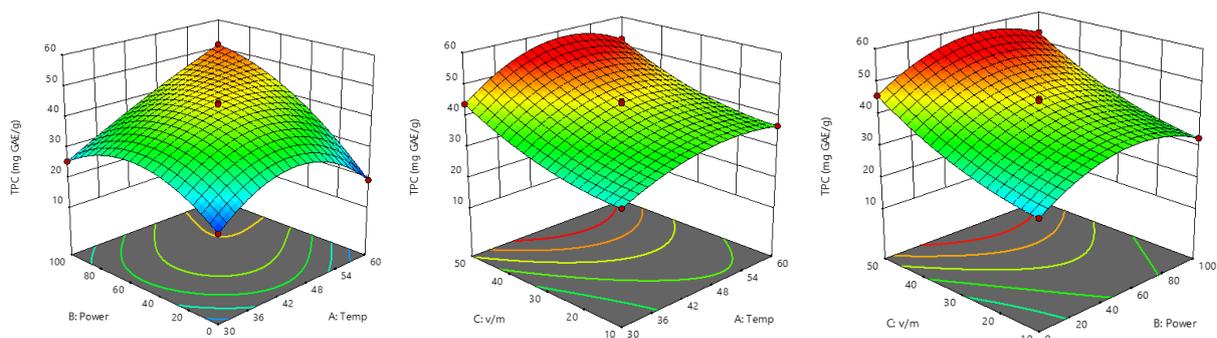


Рис. 3. Поверхности отклика для выхода суммы полифенолов от температуры (А), мощности ультразвукового воздействия (В) и гидромодуля (С)

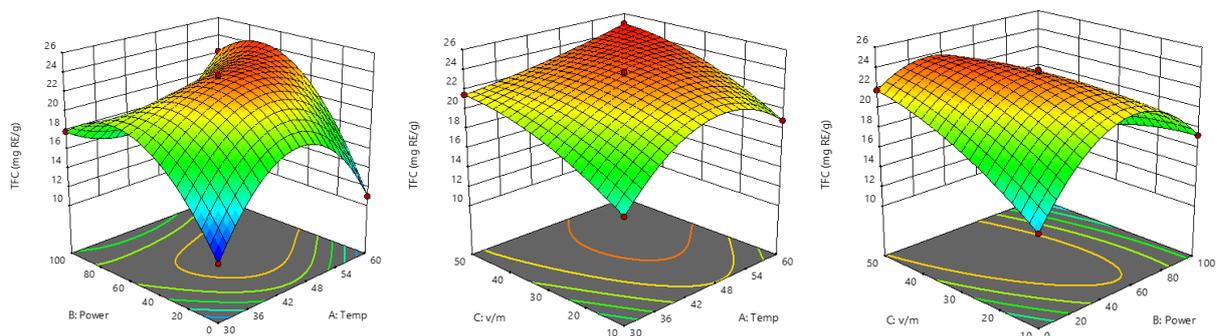


Рис. 4. Поверхности отклика для выхода суммы флавоноидов от температуры (А), мощности ультразвукового воздействия (В) и гидромодуля (С)

Сравнение результатов химических анализов экстракта, полученного в настоящей работе, и экстракта, полученного в соответствии с ГОСТ 13399-89 «Цветки арники» [25]

Определяемый параметр	Настоящая работа	ГОСТ
TPC, мг GAE/г	75.2±0.2	59.8±0.5
TFC, мг RE/г	37.4±0.2	74.8±0.4
TAC, мг AAE/г	25.4±0.8	40.9±0.8
С (галловая кислота), мг/г	0.500±0.01	0.400±0.01
С (хлорогеновая кислота), мг/г	0.300±0.01	0.300±0.02
С (кофейная кислота), мг/г	0.110±0.01	0.109±0.01
С (феруловая кислота), мг/г	0.696±0.02	0.608±0.02
С (бензойная кислота), мг/г	1.419±0.02	1.284±0.02
С (коричная кислота), мг/г	0.054±0.01	0.086±0.01
IC ₅₀ (DPPH), %	6.7	5.3
IC ₅₀ (ABTS), %	3.0	12.3

Как видно, метод сравнения позволяет достичь большее извлечение флавоноидов и антиоксидантов, но меньшее – полифенолов. Подобные результаты могут быть объяснены термическим гидролизом флавоноидных гликозидов и разрушением полифенольных соединений в следствие экстрагирования при высоких температурах. Согласно многочисленным исследованиям [34–36], в экстрактах соцветий арники горной идентифицированы такие флавоноиды, как кверцетин, кверцетин-3-О-глюкуронид, кверцетин-3-О-β-D-глюкозид, кемпферолглюкозид, кемпферол-3-О-глюкозид, кемпферол-3-О-β-D-глюкуронид, патулетин-3-О-β-D-глюкозид, 6-метоксикемпферол-3-О-β-D-глюкозид, гиспидулин, кемпферол, апигенин и рутин, гидролиз которых способствует увеличению общего содержания флавоноидов в полученном экстракте [37].

Таким образом, описанный в настоящей работе метод экстракции позволяет достичь большего выхода полифенольных соединений при меньших затратах ценного растительного сырья, меньших объемах экстрагента, менее продолжительном процессе экстрагирования и более низком температурном воздействии, что делает его более рентабельным.

Заключение

В настоящей работе впервые оптимизированы условия ультразвуковой экстракции биологически активных веществ из соцветий *Arnica montana* L. водно-этанольными смесями при помощи однофакторного анализа и алгоритма Бокса-Бенкена. Получены кинетические параметры процесса экстрагирования для аппроксимации уравнением реакции второго порядка. Установлена оптимальная продолжительность экстракции – 20 мин. С помощью однофакторной оптимизации определена концентрация экстрагента – 70 об.%. С использованием алгоритма Бокса-Бенкена и последующей аппроксимацией поверхностей отклика рассчитаны оптимальные параметры процесса: мощность ультразвукового воздействия – 53%, гидромодуль – 1 : 50, температура экстракции – 60 °С. Экспериментально показана эффективность предложенного метода по сравнению с известным методом. Полученные результаты могут способствовать развитию технологий производства фитопрепаратов из соцветий арники горной, произрастающей на Кольском полуострове в условиях интродукции, для использования в фармацевтической и косметологической отраслях.

Дополнительная информация

В электронном приложении к статье (DOI: <http://www.doi.org/10.14258/jcprtm.20250115372s>) приведен дополнительный экспериментальный материал, раскрывающий основные положения, изложенные в статье.

Финансирование

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета института (Федеральный исследовательский центр «Кольский научный центр» РАН (НИР FMEZ-2024-0012 и № FMEZ-2023-0012)). Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

Конфликт интересов

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Открытый доступ

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

Список литературы

- Petrova M., Miladinova-Georgieva K., Geneva M. Influence of Abiotic and Biotic Elicitors on Organogenesis, Biomass Accumulation, and Production of Key Secondary Metabolites in *Asteraceae* Plants // International Journal of Molecular Sciences. 2024. Vol. 25, no. 8. 4197. <https://doi.org/10.3390/ijms25084197>.
- Kriplani P., Guarve K., Baghael U.S. *Arnica montana* L. – a plant of healing: review // Journal of Pharmacy and Pharmacology. 2017. Vol. 69. Pp. 925–945. <https://doi.org/10.1111/jph.12724>.
- Lass C., Vocanson M., Wagner S., Schempp C.M., Nicolas J.F., Merfort I., Martin S.F. Anti-inflammatory and immunoregulatory mechanisms prevent contact hypersensitivity to *Arnica montana* L. // Experimental Dermatology. 2008. Vol. 17, no. 10. Pp. 849–857. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00717.x>.
- Klaas C.A., Wagner G., Laufer S., Sosa S., Della Loggia R., Bomme U., Pahl H.L., Merfort I. Studies on the anti-inflammatory activity of phytopharmaceuticals prepared from *Arnica* flowers // Planta Med. 2002. Vol. 68, no. 5. Pp. 385–391. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32067>.
- Lyss G., Knorre A., Schmidt T.J., Pahl H.L., Merfort I. The anti-inflammatory sesquiterpene lactone helenalin inhibits the transcription factor nf-kappab by directly targeting p65 // Journal of Biological Chemistry. 1998. Vol. 273, no. 50. Pp. 33508–33516. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33508>.
- Perry N.B., Burgess E.J., Rodríguez Guitián M.A., Romero Franco R., López Mosquera E., Smallfield B.M., Joyce N.I., Littlejohn R.P. Sesquiterpene lactones in *Arnica montana*: helenalin and dihydrohelenalin chemotypes in Spain // Planta medica. 2009. Vol. 75, no. 6. Pp. 660–666. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185362.8>.
- Merfort I. *Arnika* – aktueller stand hinsichtlich wirksamkeit, pharmakokinetik und nebenwirkungen // Zeitschrift für Phytotherapie. 2010. Vol. 31, no. 4. Pp. 188–192. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1262391>.
- Ganzera M., Egger C., Zidorn C., Stuppner H. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography // Analytica chimica acta. 2008. Vol. 614, no. 2. Pp. 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.023>.
- The IUCN Red List of Threatened Species – 2024. [Электронный ресурс]. URL: www.iucnredlist.org.
- Горелова А.П., Жиров В.К., Андреев Г.Н., Тростенюк Н.Н., Гельяшенко А.А. Интродукция лекарственных растений на Кольском севере: отчет о научно-исследовательской работе. Апатиты, 1997. С. 49–51.
- Flórez-Fernández N., Ferreira-Anta T., Torres M.D., Domínguez H. Valorization of *Arnica montana* wastes after extraction of the ethanol tincture: Application in polymer-based matrices // Polymers. 2021. Vol. 13, no. 18. 3121. <https://doi.org/10.3390/polym13183121>.

12. Sharma S., Arif M., Nirala R.K., Gupta R., Thakur S.C. Cumulative therapeutic effects of phytochemicals in *Arnica montana* flower extract alleviated collagen-induced arthritis: inhibition of both pro-inflammatory mediators and oxidative stress // Journal of the Science of Food and Agriculture. 2016. Vol. 96, no. 5. Pp. 1500–1510. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7252>.
13. Verre J., Boisson M., Paumier A., Tribolo S., Boujedaini N. Anti-inflammatory effects of *Arnica montana* (mother tincture and homeopathic dilutions) in various cell models // Journal Ethnopharmacology. 2024. Vol. 318B. 117064. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117064>.
14. Кроль Т.А., Зиннатшина Л.В., Гатиатулина Е.Р., Радимич А.И., Сайбель О.Л., Балеев Д.Н., Осипов В.И. Состав и содержание фенольных соединений в различных фракциях экстракта наземной части *Arnica foliosa* Nutt // Химия растительного сырья. 2020. №4. С. 139–147. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020047448>.
15. Balabanova V., Gevrenova R., Zheleva-Dimitrova D. HPLC determination of phenolic acids in *Arnicae flos* // Comptes Rendus L'Academie Bulgare des Sciences. 2013. Vol. 66. Pp. 1547–1552.
16. Kryvtsova M., Koscova J. Antibiofilm-Forming and antimicrobial activity of extracts of *Arnica montana* L., *Achillea millefolium* L. on Staphylococcus Genus bacteria // Biotechnologia Acta. 2020. Vol. 13, no. 1. Pp. 31–32. <https://doi.org/10.15407/biotech13.01.030>.
17. Ganzera M., Egger C., Zidorn C., Stuppner H. Quantitative analysis of flavonoids and phenolic acids in *Arnica montana* L. by micellar electrokinetic capillary chromatography // Analytica chimica acta. 2008. Vol. 614, no. 2. Pp. 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.0>.
18. Žitek T., Postružnik V., Knez Ž., Golle A., Dariš B., Knez Marevci M. *Arnica montana* L. supercritical extraction optimization for antibiotic and anticancer activity // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2022. Vol. 10. 897185. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.897185>.
19. Bilia A.R., Bergonzi M.C., Mazzi G., Vincieri F.F. Development and stability of semisolid preparations based on a supercritical CO₂ *Arnica* extract // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006. Vol. 41. Pp. 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.024>.
20. Середа Л.Н., Цветов Н.С. Оптимизация метода ультразвуковой экстракции биологически активных соединений водно-спиртовой смесью из плодов *Vaccinium vitis-idaea* L., произрастающей на Кольском полуострове // Химия растительного сырья. 2024. №1. С. 292–300. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20240113108>.
21. Pinela J., Prieto M.A., Pereira E., Jabeur I., Barreiro M.F., Barros L., Ferreira I.C. Optimization of heat-and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants // Food chemistry. 2019. Vol. 275. Pp. 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118>.
22. Макарова Н.В., Еремеева Н.Б. Сравнительное изучение влияния ультразвуковых воздействий на экстракцию антиоксидантных соединений ягод черники (*Vaccinium myrtillus* L.) // Химия растительного сырья. 2020. №1. С. 167–177. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020014425>.
23. Picot-Allain C., Mahomoodally M.F., Ak G., Zengin G. Conventional versus green extraction techniques – A comparative perspective // Current Opinion in Food Science. 2021. Vol. 40. Pp. 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
24. Panda D., Manickam S. Cavitation technology – The future of greener extraction method: A review on the extraction of natural products and process intensification mechanism and perspectives // Applied Sciences. 2019. Vol. 9, no. 4. 766. <https://doi.org/10.3390/app9040766>.
25. Бейдеман И.Н. Методика фенологических наблюдений при геоботанических исследованиях. М.-Л., 1954. 130 с.
26. Meier U., Bleiholder H., Buhr L., Feller C., Hacks H., Hess M., Lancashire P. D., Schnock U., Stauss R., van den Boom T., Weber E., Zwirger P. The BBCH system to coding the phenological growth stages of plants – history and publications // Journal für Kulturpflanzen. 2009. Vol. 61. Pp. 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>.
27. Meier U. Growth stages of mono- and dicotyledonous plants BBCH. Quedlinburg, 2018. 204 p. <https://doi.org/10.5073/20180906-074619>.
28. ОФС.1.1.0011.15. Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов // Государственная фармакопея РФ, XIV изд. М., 2018. Т. 1. С. 272–275.
29. ГОСТ 13399-89 Цветки арники. Технические условия. М., 1990. 11 с.
30. Tungmunthum D., Garros L., Drouet S., Renouard S., Lainé E., Hano C. Green ultrasound assisted extraction of trans rosmarinic acid from *Plectranthus scutellarioides* (L.) R. Br. leaves // Plants. 2019. Vol. 8, no. 3. Article 50. <https://doi.org/10.3390/plants8030050>.
31. Bitwell C., Indra S.S., Luke C., Kakoma M.K. A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants // Scientific African. 2023. Vol. 19. e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>.
32. Cavdarova M., Makris D.P. Extraction kinetics of phenolics from carob (*Ceratonia siliqua* L.) kibbles using environmentally benign solvents // Waste and Biomass Valorization. 2014. Vol. 5. Pp. 773–779. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9298-3>.
33. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates // Clinical science. 1993. Vol. 84, no. 4. Pp. 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.
34. Flórez-Fernández N., Ferreira-Anta T., Torres M.D., Domínguez H. Valorization of *Arnica montana* wastes after extraction of the ethanol tincture: Application in polymer-based matrices // Polymers. 2021. Vol. 13, no. 18. 3121. <https://doi.org/10.3390/polym13183121>.

35. Clauser M., Aiello N., Scartezzini F., Innocenti G., Dall'Acqua S. Differences in the chemical composition of *Arnica montana* flowers from wild populations of north Italy // Natural product communications. 2014. Vol. 9, no. 1. Pp. 3–6. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900102>.
36. Kimel K., Godlewska S., Krauze-Baranowska M., Poblocka-Olech L. HPLC-DAD-ESI/MS Analysis of *Arnica* TM Constituents // Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research. 2019. Vol. 76, no. 6. Pp. 1015–1027. <https://doi.org/10.32383/appdr/112187>.
37. Kornpointner C., Scheibelreiter J., Halbwirth H. Snailase: a promising tool for the enzymatic hydrolysis of flavonoid glycosides from plant extracts // Frontiers in Plant Science. 2022. Vol. 13. 889184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.889184>.

Поступила в редакцию 20 июня 2024 г.

После переработки 12 августа 2024 г.

Принята к публикации 22 октября 2024 г.

Sereda L.N.^{1*}, Oksana Yu.N.², Tsvetov N.S.¹ OPTIMIZATION OF THE METHOD OF ULTRASONIC EXTRACTION OF BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS WITH A WATER-ALCOHOLIC MIXTURE FROM THE FLOWERS OF *ARNICA MONTANA* L., GROWING IN THE TERRITORY OF THE ARCTIC ZONE OF THE RUSSIAN FEDERATION UNDER INTRODUCTION CONDITIONS

¹ Laboratory for Medical and Biological Technologies, Nanomaterials Research Centre, of the Federal Research Center Kola Scientific Center of Russian Academy of Sciences, Fersmana st., 14, Apatity, 184209, Russia, sundukpandory87@mail.ru

² Polar Alpine Botanical Garden-Institute of the Federal Research Centre, Kola Science Centre of Russian Academy of Sciences, Fersmana st., 18a, Apatity, 184209, Russia

Mountain Arnica (*Arnica montana* L.) is a longterm specially protected herbaceous species of the genus Arnica (*Arnica* L.) of the family of compoundflowers (*Asteraceae* Bercht. & J. Presl), growing mainly in forests and forest meadows of Western and Central Europe, in mountainous areas rising to the Alpine belt and successfully introduced into the Arctic zone of the Russian Federation. The inflorescences of the plant have hemostatic, anti-inflammatory, wound healing, analgesic, anti-sclerotic properties due to the high content of phenolic compounds, the complete extraction of which requires the development of conditions aimed at obtaining extracts containing the maximum number of target components with minimal destruction. In connection with the prospects of using the inflorescences of arnica plants in the field of healthcare, in this work, for the first time, the optimization of the conditions of the method of ultrasonic extraction with an aqueous ethanol mixture using single-factor analysis and the Box-Benken algorithm was carried out. The kinetics of the extraction process is approximated by the second-order reaction equation. The optimal duration of extraction, the concentration of the extractant, the power of ultrasonic action, the diameter of the fractions of vegetable raw materials, the hydromodule and the extraction temperature were determined. The content of polyphenols, flavonoids, and phenolic acids was determined, antioxidant activity and the degree of radical inhibition were evaluated. The results obtained can be used in the development of technologies for the production of phytopreparations for use in the pharmaceutical and cosmetology industries.

Keywords: *Arnica montana* L., inflorescences, ultrasound-assisted extraction, optimization, biologically active substances, Arctic.

For citing: Sereda L.N., Oksana Yu.N., Tsvetov N.S. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2025, no. 1, pp. 276–285. (in Russ.). <https://doi.org/10.14258/jcprm.20250115372>.

* Corresponding author.

References

1. Petrova M., Miladinova-Georgieva K., Geneva M. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, vol. 25, no. 8, 4197. <https://doi.org/10.3390/ijms25084197>.
2. Kriplani P., Guarve K., Baghael U.S. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2017, vol. 69, pp. 925–945. <https://doi.org/10.1111/jphp.12724>.
3. Lass C., Vocanson M., Wagner S., Schempp C.M., Nicolas J.F., Merfort I., Martin S.F. *Experimental Dermatology*, 2008, vol. 17, no. 10, pp. 849–857. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2008.00717.x>.
4. Klaas C.A., Wagner G., Laufer S., Sosa S., Della Loggia R., Bomme U., Pahl H.L., Merfort I. *Planta Med.*, 2002, vol. 68, no. 5, pp. 385–391. <https://doi.org/10.1055/s-2002-32067>.
5. Lyss G., Knorre A., Schmidt T.J., Pahl H.L., Merfort I. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, vol. 273, no. 50, pp. 33508–33516. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.50.33508>.
6. Perry N.B., Burgess E.J., Rodríguez Guitián M.A., Romero Franco R., López Mosquera E., Smallfield B.M., Joyce N.I., Littlejohn R.P. *Planta medica*, 2009, vol. 75, no. 6, pp. 660–666. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1185362.8>.
7. Merfort I. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 2010, vol. 31, no. 4, pp. 188–192. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1262391>.
8. Ganzera M., Egger C., Zidorn C., Stuppner H. *Analytica chimica acta*, 2008, vol. 614, no. 2, pp. 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.023>.
9. *The IUCN Red List of Threatened Species – 2024*. URL: www.iucnredlist.org.
10. Gorelova A.P., Zhiron V.K., Andreyev G.N., Trostenyuk N.N., Gel'yashenko A.A. *Introduktsiya lekarstvennykh rasteniy na Kol'skom severe: otchet o nauchno-issledovatel'skoy rabote*. [Introduction of medicinal plants in the Kola North: report on research work]. Apatity, 1997, pp. 49–51. (in Russ.).
11. Flórez-Fernández N., Ferreira-Anta T., Torres M.D., Domínguez H. *Polymers*, 2021, vol. 13, no. 18, 3121. <https://doi.org/10.3390/polym13183121>.
12. Sharma S., Arif M., Nirala R.K., Gupta R., Thakur S.C. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2016, vol. 96, no. 5, pp. 1500–1510. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7252>.
13. Verre J., Boisson M., Paumier A., Tribolo S., Boujedaini N. *Journal Ethnopharmacology*, 2024, vol. 318B, 117064. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2023.117064>.
14. Krol' T.A., Zinnatshina L.V., Gatiatulina Ye.R., Radimich A.I., Saybel' O.L., Baleyev D.N., Osipov V.I. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, no. 4, pp. 139–147. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020047448>. (in Russ.).
15. Balabanova V., Gevrenova R., Zheleva-Dimitrova D. *Comptes Rendus L'Academie Bulgare des Sciences*, 2013, vol. 66, pp. 1547–1552.
16. Kryvtsova M., Koscova J. *Biotechnologia Acta*, 2020, vol. 13, no. 1, pp. 31–32. <https://doi.org/10.15407/bio-tech13.01.030>.
17. Ganzera M., Egger C., Zidorn C., Stuppner H. *Analytica chimica acta*, 2008, vol. 614, no. 2, pp. 196–200. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.0>.
18. Žitek T., Postružnik V., Knez Ž., Golle A., Dariš B., Knez Marevci M. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, vol. 10, 897185. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.897185>.
19. Bilia A.R., Bergonzi M.C., Mazzi G., Vincieri F.F. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, pp. 449–454. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.12.024>.
20. Sereda L.N., Tsvetov N.S. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2024, no. 1, pp. 292–300. <https://doi.org/10.14258/jcprm.20240113108>. (in Russ.).
21. Pinela J., Prieto M.A., Pereira E., Jabeur I., Barreiro M.F., Barros L., Ferreira I.C. *Food chemistry*, 2019, vol. 275, pp. 309–321. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.09.118>.
22. Makarova N.V., Yeremeyeva N.B. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2020, no. 1, pp. 167–177. <https://doi.org/10.14258/jcprm.2020014425>. (in Russ.).
23. Picot-Allain C., Mahomoodally M.F., Ak G., Zengin G. *Current Opinion in Food Science*, 2021, vol. 40, pp. 144–156. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.009>.
24. Panda D., Manickam S. *Applied Sciences*, 2019, vol. 9, no. 4, 766. <https://doi.org/10.3390/app9040766>.
25. Beydeman I.N. *Metodika fenologicheskikh nablyudeniy pri geobotanicheskikh issledovaniyakh*. [Methodology of phenological observations in geobotanical studies]. Moscow-Leningrad, 1954, 130 p. (in Russ.).
26. Meier U., Bleiholder H., Buhr L., Feller C., Hacks H., Hess M., Lancashire P. D., Schnock U., Stauss R., van den Boom T., Weber E., Zwergner P. *Journal für Kulturpflanzen*, 2009, vol. 61, pp. 41–52. <https://doi.org/10.5073/JfK.2009.02.01>.
27. Meier U. *Growth stages of mono- and dicotyledonous plants BBCH*. Quedlinburg, 2018, 204 p. <https://doi.org/10.5073/20180906-074619>.
28. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF, XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition]. Moscow, 2018, vol. 1, pp. 272–275. (in Russ.).
29. *GOST 13399-89 Tsvetki arniki. Tekhnicheskiye usloviya*. [GOST 13399-89 Arnica flowers. Technical conditions]. Moscow, 1990, 11 p. (in Russ.).
30. Tungmunnithum D., Garros L., Drouet S., Renouard S., Lainé E., Hano C. *Plants*, 2019, vol. 8, no. 3, article 50. <https://doi.org/10.3390/plants8030050>.
31. Bitwell C., Indra S.S., Luke C., Kakoma M.K. *Scientific African*, 2023, vol. 19, e01585. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2023.e01585>.

32. Cavdarova M., Makris D.P. *Waste and Biomass Valorization*, 2014, vol. 5, pp. 773–779. <https://doi.org/10.1007/s12649-014-9298-3>.
33. Miller N.J., Rice-Evans C., Davies M.J., Gopinathan V., Milner A. *Clinical science*, 1993, vol. 84, no. 4, pp. 407–412. <https://doi.org/10.1042/cs0840407>.
34. Flórez-Fernández N., Ferreira-Anta T., Torres M.D., Domínguez H. *Polymers*, 2021, vol. 13, no. 18, 3121. <https://doi.org/10.3390/polym13183121>.
35. Clauser M., Aiello N., Scartezzini F., Innocenti G., Dall'Acqua S. *Natural product communications*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 3–6. <https://doi.org/10.1177/1934578X1400900102>.
36. Kimel K., Godlewska S., Krauze-Baranowska M., Pobłocka-Olech L. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 2019, vol. 76, no. 6, pp. 1015–1027. <https://doi.org/10.32383/appdr/112187>.
37. Kornpointner C., Scheibelreiter J., Halbwirth H. *Frontiers in Plant Science*, 2022, vol. 13, 889184. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.889184>.

Received June 20, 2024

Revised August 12, 2024

Accepted October 22, 2024

Сведения об авторах

Серёда Лидия Николаевна – младший научный сотрудник, sundukpandory87@mail.ru

Носатенко Оксана Юрьевна – младший научный сотрудник, o.nosatenko@ksc.ru

Цветов Никита Сергеевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, tsvet.nik@mail.ru

Information about authors

Sereda Lidiya Nikolaevna – Junior Researcher, sundukpandory87@mail.ru

Nosatenko Oksana Yuryevna – Junior Researcher, o.nosatenko@ksc.ru

Tsvetov Nikita Sergeevich – Candidate of Chemical Sciences, Researcher, tsvet.nik@mail.ru