

УДК 577.127.4; 542.06

ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ВОДНО-ЭТАНОЛЬНОЙ ЭКСТРАКЦИИ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ ИЗ СОЦВЕТИЙ *HERACLEUM SOSNOWSKYI* MANDEN.

Светлана Владимировна Козлова, Никита Сергеевич Цветов

ФГБУН ФИЦ «Кольский научный центр Российской академии наук»,
Научный центр медико-биологических исследований адаптации человека в Арктике,
Лаборатория медицинских и биологических технологий,
184209, Россия, г. Апатиты, ул. Ферсмана, д. 14
E-mail: s.kozlova@ksc.ru

В статье приведены результаты комплексного изучения процессов водно-спиртовой ультразвуковой экстракции полифенольных соединений, флавоноидов и веществ, проявляющих антиоксидантную активность, из соцветий *Heracleum sosnowskyi* Manden. С помощью однофакторной оптимизации найдено, что оптимальное время экстракции составило 90 минут, концентрация этанола – 60%, мощность ультразвука – 120 Вт. С помощью алгоритма Бокса-Бенкена установлено, что оптимальная температура экстракции – 60°C, крупность частиц растительного сырья – 1 мм, соотношение массы сырья к объему растворителя – 1:30. Эти условия обеспечивают максимальный выход полифенольных соединений, флавоноидов, веществ, проявляющих антиоксидантную активность. Результаты работы могут быть применены для дальнейшего изучения особенностей метаболизма *H. sosnowskyi* Manden. в различных условиях произрастания, в ключе накопления биологически активных веществ.

Ключевые слова: *Heracleum sosnowskyi* Manden.; ультразвуковая экстракция; полифенолы; флавоноиды; антиоксидантная активность

Введение

Борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* Manden.) – крупное травянистое растение, вид рода Борщевик (*Heracleum*) семейства Зонтичные (*Umbelliferae*). Благодаря своей высокой урожайности, способности быстро воспроизводиться семенами и высокому содержанию в биомассе белков, сахаров, витаминов и микроэлементов *H. sosnowskyi* ранее позиционировался как уникальная продовольственная и кормовая культура [14]. Сейчас это растение считается злостным сорняком и представляет угрозу для здоровья человека, хотя его огромный биоресурс еще недостаточно изучен [10]. Правильное использование *H. sosnowskyi* и, как следствие, его промышленный сбор, в перспективе может способствовать сокращению площади дикорастущих зарослей, что положительно скажется на экосистемах регионов, где борщевик признан опасным интродуцентом [2].

Содержащиеся в разных органах растения кумарины, фурукумарины и эфирные масла, могут являться ценными компонентами для фармацевтической и парфюмерной промышленности [3]. Известно, что в химическом составе растения преобладают фуранокумарины преимущественно псораленового типа и, в меньшей степени, – производные ангецилина [1]. Эти вещества способны sensibilizировать кожу к действию света и стимулировать образование пигмента меланина при облучении ее ультрафиолетом. Доказано, что наибольшим фотосенсибилизирующим действием обладает псорален, за ним по активности следует ксантотоксин и бергаптен. Эти вещества имеют фармацевтическое значение для производства лекарственных препаратов, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами, используемых для лечения витилиго, гнездовой плешивости, облысения, псориаза [12].

Эфирное масло, выделенное из плодов *H. sosnowskyi*, содержит октанол, гексилбутират, октилацетат, гексил- и октилизовалераты, октилизобутират и октилкапронат. Бактерицидные, фунгицидные и вирулицидные свойства эфирных масел растения открывают новые перспективы в использовании эфирных масел в медицине. Кроме того, содержащиеся в эфирном масле *H. sosnowskyi* биологически активные вещества (БАВ) имеют выраженное аллелопатическое действие на прорастание и развитие окружающих видов растений. Основным веществом, влияющим на величину такой активности, является октаналь [9].

В то же время, недостаточно изученными остаются особенности метаболизма *H. sosnowskyi* в условиях Крайнего Севера. Установлено, что с увеличением экстремальности климатических условий произрастания в тканях ряда видов растений синтезируется большее количество БАВ [6]. При этом растения на севере испытывают комплекс неблагоприятных воздействий, в котором суммируются эффекты естественных (в частности, климатических) и антропогенных факторов. Изменение условий среды сказывается не только на количестве тех или иных веществ, но может вызывать у них глубокие качественные сдвиги [5].

Комплексная оценка содержания различных групп БАВ в *H. sosnowskyi* позволит улучшить понимание особенностей метаболизма растения в условиях Кольского полуострова. В связи с этим, необходим подбор наиболее подходящих методов и параметров экстракции БАВ из тканей органов *H. sosnowskyi*. Однако количество работ, посвященных подробному поиску подходящих методов и параметров экстракции БАВ, оптимальных условий анализа различных групп веществ в органах растения крайне ограничено. Оптимальные условия экстракции зависят от типа извлекаемых веществ и могут быть специфичными для каждого конкретного растения и органа растения [7].

Традиционными экстрагентами для извлечения БАВ являются смеси этанола и воды, однако эффективность экстракции сильно зависит от состава смеси [11]. Ультразвуковая экстракция в настоящее время является одним из перспективных и современных методов экстракции БАВ из растительного сырья, которая позволяет значительно повысить выход биологически активных соединений даже при водной экстракции свежего сырья и обеспечить сохранность анализируемых биологически активных веществ [4].

Целью работы был поиск оптимальных условий водно-спиртовой ультразвуковой экстракции полифенольных соединений, флавоноидов и веществ, проявляющих антиоксидантную активность из соцветий *H. sosnowskyi*.

Материалы и методы

Соцветия растений *Heracleum sosnowskyi* были собраны на площадках Полярно-альпийского сада-института (ПАБСИ) на территории г. Апатиты Мурманской области во время цветения (06.07.2022 г.). Свежие соцветия высушивали, выдерживая на сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге в хорошо проветриваемом помещении при комнатной температуре в течение около 20 дней. Высушенный материал измельчали и пропускали через лабораторное сито с диаметром ячеек 0,1, 1 и 2 мм. Экстракция проводилась с использованием ультразвуковой ванны Вилитек VBS-3-DP (Велитек, Россия) с частотой 40 кГц и максимальной мощностью 120 Вт. Растительный материал смешивался с экстрагентом в пробирках Эппендорфа. После проведения экстракции смесь центрифугировали в течение 5 минут в лабораторной центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) при 4000 об./мин.

Подбор оптимальных условий проводился в несколько этапов:

1. Выбор оптимального времени проводился в течении 5-180 минут. Содержание этанола в водно-этанольной смеси составляло 50%, мощность ультразвукового воздействия – 50%, температура экстракции 45°C, крупность сырья – 1 мм, соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья – 20.

2. Выбор оптимальной концентрации этанола при оптимальном времени проводился для водно-этанольных смесей с содержанием этанола 0-90%. Мощность ультразвукового воздействия составляла 50%, температура экстракции – 45°C, крупность сырья – 1 мм, соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья – 20.

3. Выбор оптимальной мощности ультразвука при оптимальном времени и концентрации этанола проводился в диапазоне 0-100% мощности (0-120 Вт) температура экстракции составляла 45°C, крупность сырья – 1 мм, соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья – 20.

4. Выбор оптимальной температуры, соотношения объема экстрагента к массе растительного сырья и диаметра частиц проводился по алгоритму Бокс-Бенкена с пятикратным повторением центральной точки. Комбинации параметров для алгоритма Бокс-Бенкена приведены в таблице 1.

Таблица 1

Уровни и значения параметров оптимизации в алгоритме Бокс-Бенкена

Уровень	Температура, °С	Соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья	Крупность сырья, мм
-1	30	10	0.1
0	45	20	1
1	60	30	2

Для каждого экстракта определялось три показателя: по реакции с реактивом Фолина-Чиокальтеу определяли общее содержание полифенольных компонентов (total phenolic content, TPC), выраженное в мг эквивалентного содержания галловой кислоты на 1 г растительного сырья (мг GAE/г) [13]; по реакции комплексообразования с хлоридом алюминия определяли общее содержание флавоноидов (total flavonoids content, TFC), выраженное в мг эквивалентного содержания рутина на 1 г растительного сырья (мг RE/г) [15]; общая антиоксидантная активность (total antioxidant activity, TAC) определялась с помощью фосфомолибдатного метода и выражалась в мг эквивалентного содержания аскорбиновой кислоты на 1 г растительного сырья (мг AAE/г) [16]. Подробно указанные методы описаны в работе [17]. Для определения полифенолов экстракты разбавляли в 50 раз, для флавоноидов – в 50 раз, для определения антиоксидантной активности использовалась аликвота сырого экстракта объемом 25 мкл. Экстинкции измерялись на фотоколориметре КФК-3-01 (ЗОМЗ, Россия).

Для аппроксимации экспериментальных данных зависимости выхода полифенолов, флавоноидов и антиоксидантов от времени использовалось линейризованное уравнение реакции второго порядка [23]. С помощью него описывается зависимость отношения времени к выходу целевой группы веществ, соответствующего этому времени от времени экстракции.

Из наклона прямой вычисляется равновесное значение выхода группы веществ Y^{eq} , затем из сдвига прямой вычисляется константа скорости (k , г /мин×мг).

$$\frac{t}{Y_t} = \frac{1}{Y^{eq}} t + \frac{1}{k(Y^{eq})^2}$$

Все измерения проводились в трехкратной повторности. Полученные данные обрабатывались с использованием программного обеспечения MS Office Excel. Оценка достоверности проводилась с использованием теста Тьюки при $p < 0.05$. Данные по оптимизации обрабатывались в программе Design-Expert 11 Trial (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA) с использованием методологии аппроксимации поверхности отклика.

Результаты и обсуждение

Результаты аппроксимации полученных данных о зависимости изменения анализируемых групп метаболитов от времени с помощью кинетического уравнения реакции второго порядка представлены в таблице 2. Полученные данные достаточно хорошо аппроксимируются уравнением реакции второго порядка ($R^2 > 0.999$). В ходе проведения кинетических исследований установлено, что достаточным для экстракции можно считать время 90 минут.

Таблица 2

Результаты определения равновесных значений выхода анализируемых групп метаболитов (Y^{eq}), констант скорости (k) и величин R^2 для аппроксимации экспериментальных данных линейным уравнением

Показатель	Y^{eq} , мг/г	k , 10^{-3} г /мин×мг	R^2
ТРС	59.8	4.0	0.9988
ТФС	70.7	3.3	0.9986
ТАС	72.7	3.5	0.9989

Следующим этапом оптимизации условий экстракции был подбор оптимальной концентрации этанола в диапазоне от 0 до 90%. Результаты, показывающие влияние состава экстрагента на извлечение полифенольных компонентов и соединений, проявляющих антиоксидантную активность, из соцветий *H. sosnowskyi*, представлены на рисунке 1.

Представленные данные свидетельствуют, что наибольшее извлечение полифенольных компонентов происходит водно-спиртовой смесью с содержанием этанола 60% – $57,5 \pm 2,7$ мг ГАЕ/г. Для такой же концентрации этанола наблюдается наибольший выход флавоноидов, $69,4 \pm 3,2$ мг РЕ/г. Соединения, проявляющие антиоксидантную активность несколько лучше извлекаются 70%, нежели 60% водным этанолом ($69,6 \pm 1,7$ и $67,6 \pm 1,7$ мг ААЕ/г, соответственно), однако эти различия незначимы в соответствии с результатами теста Тьюки ($p < 0.05$). Также статистически незначимы различия между эффективностью экстракции 60 и 70% водным этанолом для полифенольных компонентов и флавоноидов. Таким образом, оптимальной можно считать концентрацию этанола 60%.

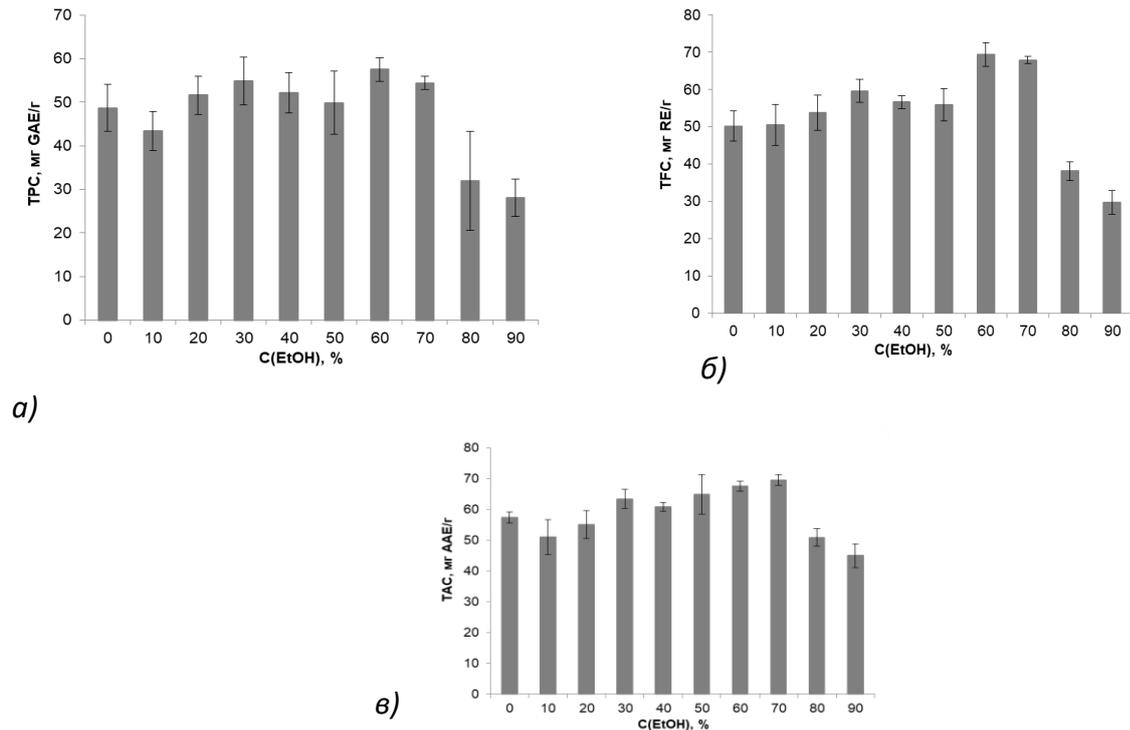


Рис. 1 Зависимость общего содержания полифенолов (а), флавоноидов (б) и антиоксидантов (в) от объемной концентрации этанола (C(EtOH), %)

Зависимость выхода анализируемых групп метаболитов от мощности ультразвука в диапазоне от 0 до 100% представлены на рисунке 2. Видно, что максимальное количество полифенольных компонентов, флавоноидов и веществ, проявляющих антиоксидантную активность, достигается при 100% мощности ультразвукового воздействия: $73,3 \pm 5,3$ мг GAE/g, $85,1 \pm 4,6$ мг RE/g и $68,4 \pm 3,0$ мг AAЕ/g, соответственно.

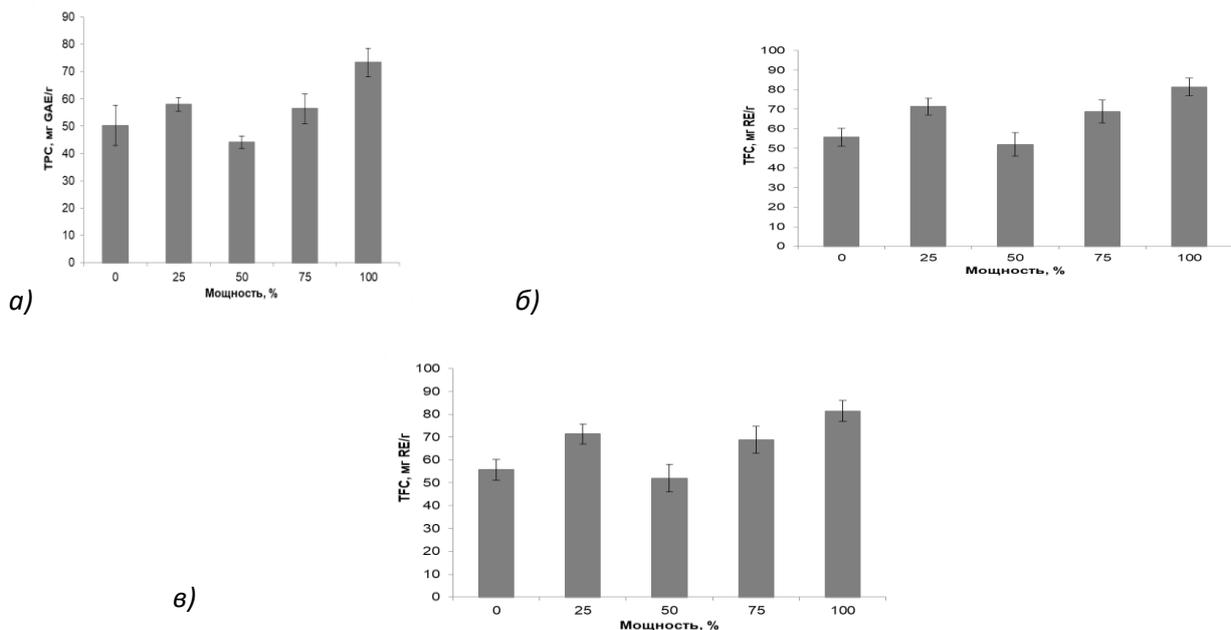


Рис. 2 Зависимость общего содержания полифенолов (а), флавоноидов (б) и антиоксидантов (в) от мощности ультразвукового воздействия (%)

Поверхности отклика для выхода целевых групп метаболитов *H. sosnowskyi* описываются в общем виде уравнениями

$$Y = k_0 + k_1A + k_2B + k_3C + k_4AB + k_5AC + k_6BC + k_7A^2 + k_8B^2 + k_9C^2 + k_{10}A^2B + k_{11}A^2C + k_{12}AB^2$$

где A – температура, °C, B – соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья, C – крупность растительного сырья, мм. Каждый параметр изменяется в пределах от +1 до –1.

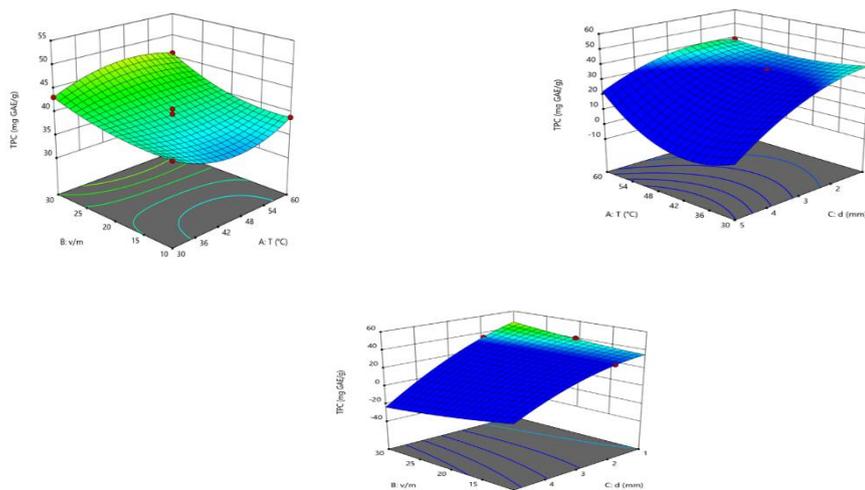


Рис. 3 Поверхность отклика общего количества полифенолов от температуры (А), соотношения объема экстрагента к массе растительного сырья (В) и диаметра частиц растительного сырья (С)

Коэффициенты уравнений для каждой группы метаболитов представлены в таблице 3. Коэффициент детерминации (R^2) для всех типов откликов (TPC, TFC, TAC) составил >0.999 , что показывает хорошее качество аппроксимации данных.

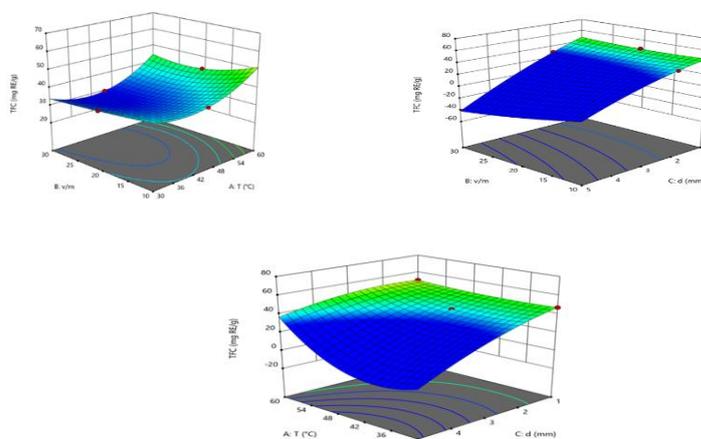


Рис. 4 Поверхность отклика общего количества - флавоноидов от температуры (А), соотношения объема экстрагента к массе растительного сырья (В) и диаметра частиц растительного сырья (С)

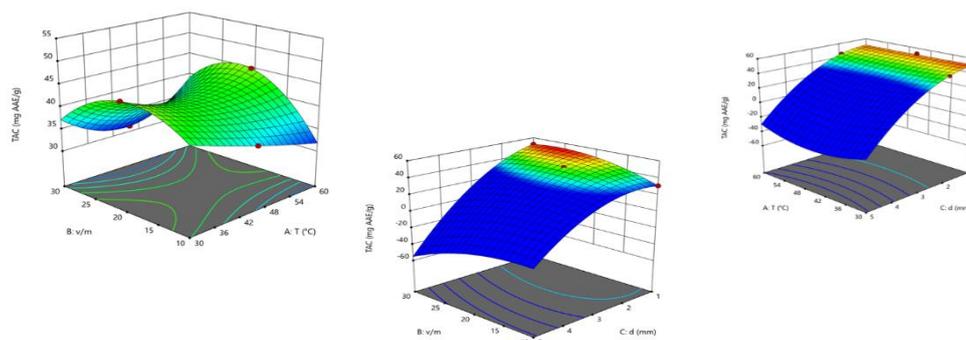


Рис. 5 Поверхность отклика общего количества веществ, обладающих общей антиоксидантной активностью от температуры (А), соотношения объема экстрагента к массе растительного сырья (В) и диаметра частиц растительного сырья (С)

Исходя из полученных уравнений для поверхностей откликов, были рассчитаны оптимальные условия экстракции: температура – 60°C. Соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья – 30, диаметр частиц – 1 мм. При указанных условиях была проведена экстракция. Сравнение расчетных и экспериментальных данных приведено в Таблице 4.

Таблица 3

Параметры уравнений, описывающих поверхности отклика для значений выхода целевых групп метаболитов *Heracleum sosnowskyi* Manden.

	k_0	k_1	k_2	k_3	k_4	k_5	k_6	k_7	k_8	k_9	k_{10}	k_{11}	k_{12}	R^2
TPC	19.83	5.36	-1.97	-27.46	0.75	5.21	-7.95	6.66	1.71	-7.85	-3.22	6	0.46	0.9998
TFC	14.91	7.97	-8.71	-35.50	-0.4	8.84	-9.21	13.66	2.67	-5.71	1.04	10.47	2.27	0.9987
TAC	22.83	0.09	-9.01	-46.93	2.78	0.58	-13.32	6.80	-7.91	-18.97	3.27	6.32	-1.54	0.9997

Видно, что экспериментально полученные данные об общем содержании полифенолов и флавоноидов несколько ниже рассчитанных, однако это может быть связано с качеством аппроксимации, учитывающей максимизацию двух характеристик экстрактов (TPC, TFC). Экспериментально полученные данные об общей антиоксидантной активности несколько выше рассчитанных.

Таблица 4

Сравнение расчетных и экспериментальных данных об общем содержании полифенолов, флавоноидов и общей антиоксидантной активности экстрактов соцветий *Heracleum sosnowskyi* Manden., полученных при оптимальных условиях

TPC _{calc}	TPC _{exp}	TFC _{calc}	TFC _{exp}	TAC _{calc}	TAC _{exp}
45.9	40.9±1.4	53.1	49.7±3.2	51.7	53.2±0.6

Заключение

В работе изучена оптимизация водно-спиртовой экстракции биологически активных веществ из соцветий *H. sosnowskyi*. С помощью однофакторной оптимизации найдено, что оптимальное время экстракции составило 90 минут, концентрация этанола – 60%, мощность ультразвука – 100%. С помощью алгоритма Бокса-Бенкена найдены

оптимальные условия водно-спиртовой ультразвуковой экстракции полифенольных соединений, флавоноидов, а также веществ, обладающих антиоксидантной активностью из соцветий *H. sosnowskyi*: температура – 60°C, соотношение объема экстрагента к массе растительного сырья – 30, диаметр частиц растительного сырья – 1 мм, обеспечивающие максимальный выход полифенольных соединений: расчетные и экспериментальные данные – 45,9 мг GAE/г. и 40,9±1,4 мг GAE/г, соответственно; флавоноидов 53,1 мг RE/г и 49,7±3.2 мг RE/г, соответственно; антиоксидантная активность: 51,7 мг AAE/г и 53,2±0,6 мг AAE/г, соответственно. Полученные данные могут быть полезны для дальнейшего изучения особенностей метаболизма изучаемого растения в ключе накопления им полифенольных веществ, флавоноидов и веществ, проявляющих антиоксидантные свойства, и разработки новых способов выделения БАВ из этого растения. Развитие методов переработки биомассы *H. sosnowskyi* позволит в полной мере раскрыть потенциал растений этого вида как сырья для химической и фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Агеев В.П., Шляпкина В.И., Куликов О.А., Заборовский А.В., Татарина Л.А. Качественный и количественный анализ основных производных псоралена сока борщевика Сосновского // Фармацевтическая химия и фармакогнозия. – 2022. – Т.71. – №3. – С. 10-17. DOI: 10.29296/25419218-2022-03-02
2. Богданов В.Л., Николаев Р.В., Шмелева И.В. Биологическое загрязнение территории экологически опасным растением борщевиком Сосновского // Фундаментальные медико-биологические науки и практическое здравоохранение: сб. науч. трудов 1-й Международной телеконференции. – Томск: СибГМУ, 2010. – С. 27-29.
3. Васильева Е.Н., Роцин В.И. Химический состав борщевика Сосновского // Леса России: политика, промышленность, наука, образование. Материалы VI Всероссийской научно-технической конференции (26 мая 2021 г.). – СПб: Изд-во: Санкт-Петербургский государственный лесотехнический университет С.М. Кирова, 2021. – Т. 1. – С. 99-102.
4. Елапов А.А., Кузнецов Н.Н., Марахова А.И. Применение ультразвука в экстракции биологически активных соединений из растительного сырья, применяемого или перспективного для применения в медицине (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. Т. 10. – № 4. – С. 96-116. DOI:10.33380/2305-2066-2021-10-4-96-116
5. Жиров В.К., Кислых Е.Е. Структурно-функциональные изменения растительности в условиях техногенного изменения на Крайнем Севере. – М.: Наука, 2007. – 164 с.
6. Козлова С.В., Ингири А.А., Цветов Н.С. Содержание биологически активных веществ и антиокислительная активность тканей листьев *Heracléum Sosnowskyi* в Мурманской области // X Международная научная конференция Молодых ученых. Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения (15 декабря 2022г.). – М.: ФГБНУ ВИЛАР., 2022. – С. 167-171. DOI:10.52101/9785870191058_167
7. Козлова С.В., Цветов Н.С. Изучение процесса ультразвуковой экстракции полифенолов из листьев *Heracléum Sosnowskyi* // Международная научная-практическая конференция «Достижения и перспективы создания новых лекарственных препаратов» (15 июня 2023). – М.: ФГБНУ ВИЛАР., 2023. – С. 271-275. DOI: 10.52101/9785870191102_271

8. Ламан Н.А., Копылова Н.А., Прохоров В.Н. Борщевик Сосновского (*Heracleum Sosnowskyi* Manden) как перспективный источник биологически активных соединений // Клеточная биология и биотехнология растений. – 2018. – С.41-42.

9. Песня Д.А., Серов Д.А., Вакорин С.А., Прохорова И.М. Исследование токсического, митозмодифицирующего и мутагенного действия борщевика Сосновского // Ярославский педагогический вестник. – 2011. – Том III. – №4. – С.93-98.

10. Сацыперова И.Ф. Борщевики флоры СССР – новые кормовые растения: перспективы использования в народном хозяйстве. – Л.: Наука, 1984. – 218 с.

11. Фабрицкая А.А., Семенухин С.О., Городецкий В.О., Котляревская Н.И., Викторова Е.П. Современные исследования в области экстракции биологически активных веществ из растительного сырья с применением ферментов // Технология продовольственных продуктов. – 2021. – №17. – С.56-66. DOI: 10.47370/2072-0920-2021-17-2-56-66

12. Юрлова Л.Ю., Черняк Д.М., Кутовая О.П. Фурукумарины *Heracleum Sosnowskyi* и *Heracleum MoellenDorffii* // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – №2. – С.91-93.

13. Ainsworth E. A., Gillespie K.M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using folin–ciocalteu reagent // Nature protocols, 2007. – Vol. 2. – N. 4. – P. 875-877.

14. Kozlova S.V. Effects of hogweed secondary metabolites on green crops productivity in Murmansk region // International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM, Bulgaria, 2021. – Vol. 21. – P.131-138. DOI:10.5593/sgem2021/6.1/s25.17

15. Pękal A.A., Pyrzyńska K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content // Food Anal. Methods, 2014. – P. 1776 -1782.

16. Prieto P., Pineda M. Aguilar M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E // Anal. Biochem, 1999. – Vol. 269. – № 2. – P. 337-341.

17. Tsvetov N., Paukshta O., Fokina N., Volodina N., Samarov A. Application of Natural Deep Eutectic Solvents for Extraction of Bioactive Components from *Rhodiola rosea* (L.) // Molecules., 2023. – Vol. 28. – № 2. – P. 912. DOI: 10.3390/molecules28020912

Статья поступила в редакцию 13.12.2024 г.

Kozlova S.V., Tsvetov N.S. Optimization of conditions for ultrasonic water-ethanol extraction of polyphenolic components from *Heracleum sosnowskyi* Manden. inflorescences // Bull. of the State Nikita Botan. Gard. – 2025. – № 154. - P.78-86

The article presents the results of a comprehensive study of the processes of water-alcohol ultrasonic extraction of polyphenolic compounds, flavonoids and substances with antioxidant activity from the inflorescences of *Heraculum sosnowskyi* Manden. Using one-factor optimization, it was found that the optimal extraction time was 90 minutes, the ethanol concentration was 60%, and the ultrasonic power was 120 watts. Using the Box-Benken algorithm, it was found that the optimal extraction temperature is 60 °C, the particle size of vegetable raw materials is 1 mm, and the ratio of the mass of raw materials to the volume of solvent is 1:30. These conditions ensure the maximum yield of polyphenolic compounds, flavonoids, and substances exhibiting antioxidant activity. The results of the work can be applied to further study the metabolic features of *H. sosnowskyi* Manden. in various growing conditions, in order to accumulate biologically active substances.

Key words: *Heracleum sosnowskyi* Manden.; ultrasonic-assisted extraction; polyphenols; flavonoids; antioxidant activity