

Х. В. Костик, Х. В. Лупій, В. С. Микитюк, А. С. Крвавич, Р. О. Петріна
Національний університет “Львівська політехніка”,
кафедра технології біологічно активних сполук, фармації та біотехнології
e-mail: rpetrina@i.ua

ОПТИМІЗАЦІЯ ПРОЦЕСУ ЕКСТРАКЦІЇ ФЛАВОНОЇДІВ З КАЛУСНОЇ БІОМАСИ *ARNICA MONTANA*

© Костик Х. В., Лупій Х. В., Микитюк В. С., Крвавич А. С., Петріна Р. О., 2018

Одержано калусну біомасу *Arnica montana* в умовах *in vitro*. Підібрано оптимальні умови екстракції калусної біомаси для максимального вилучення флавоноїдів, змінюючи параметри екстракції, а саме спосіб екстракції, співвідношення екстрагент: сировина, концентрацію екстрагента. Для ідентифікації флавоноїдів використано специфічні кольорові реакції, для кількісного визначення – спектрофотометричний метод. Максимальний вихід флавоноїдів отримано екстракцією в апараті Сокслета з 70 %-м етанолом із співвідношенням сировина:екстрагент – 1:20.

Ключові слова: *Arnica montana*, *in vitro*, культивування, фітогормони, калусна біомаса, екстракт, флавоноїди, біологічно активні речовини (БАР).

Kh. V. Kostyk, Kh. V. Lupiy, V. S. Mykytyuk, A. S. Krvavych, R. O. Petrina

OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF EXTRACTION OF FLAVONOIDS FROM CALLUS BIOMASS OF *ARNICA MONTANA*

© Kostyk Kh. V., Lupiy Kh. V., Mykytyuk V. S., Krvavych A. S., Petrina R. O., 2018

The results of the obtaining callus biomass of *Arnica montana* *in vitro* are presented. The optimal conditions for the extraction of the callus biomass for maximum accumulation of flavonoids have been selected, changing the extraction parameters, namely the extraction method, the ratio of the extractant: the raw material, the concentration of the extractant. Spectrophotometric method was used for quantification of flavonoids. The maximum yield of flavonoids was obtained by extraction in Soxhlet with 70 % ethyl alcohol with the ratio of raw material: extractant – 1:20.

Key words: *Arnica montana*, *in vitro*, cultivation, phytogormony, callus biomass, extract, flavonoids.

Постановка проблеми. Сьогодні для отримання профілактичних та лікувальних засобів застосовують понад 3000 видів рослин, з них близько 100 культивують. Лікарські рослини містять багато біологічно активних речовин (БАР), які по-різному впливають на організм людини та тварин, тому використовуються для профілактики та лікування захворювань у медичній, народній та ветеринарній практиці [1]. Близько 60–80 % світового населення все ще покладаються на лікарські засоби на основі рослин [2]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ), існуючий попит на лікарські рослини становить приблизно 14 мільярдів доларів США на рік [3]. Попит на сировину на основі лікарських рослин зріс від 15 до 25 % на рік, і за оцінками ВООЗ попит на лікарські рослини, ймовірно, збільшиться в 2050 році більш як на 5 трильйонів доларів США.

Українські Карпати багаті на лікарські рослини, які застосовують для отримання лікарських засобів завдяки наявності БАР. Але постійне їх використання і зневажливе ставлення до довкілля привело до знищення рослинної флори, багато рослин занесено до розрядів зниклих, зникаючих, рідкісних, вразливих. Слід зауважити, що зникають рослини внаслідок прямого винищення, і в

результаті негативних екологічних впливів на якість сировини. Втрати деяких видів рослин непоправні – втрачено рослини, які могли б принести користь людству.

Сучасний стан довкілля в Україні не дозволяє використання більшості рослин як лікарської сировини. Неодноразово наголошено на значенні методів культури *in vitro* в програмах із збереження рослинних ресурсів та їх переваги порівняно з традиційними способами.

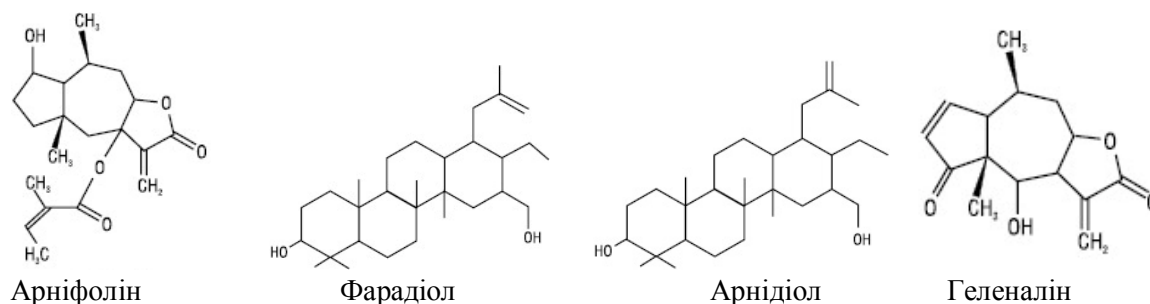
Арніка гірська містить багато БАР, достатньо досліджена; отримано лікарські препарати на основі екстрактів арніки. Описано також введення *Arnica montana* в культуру *in vitro* та дослідження фітохімічного складу калусної біомаси та біологічної активності [4,5]. Для отримання максимальної кількості БАР важливим та перспективним є підбір параметрів процесу екстракції, які не описано і практично не обґрунтовано: вибір розчинника, тривалість процесу і кратність екстракції, температурний режим, величина гідромодуля тощо. Тому підбір певних умов проведення екстракції біомаси є актуальним.

Метою роботи є визначення оптимальних параметрів процесу екстракції калусної біомаси та рослинної сировини *Arnica montana*, які забезпечують максимальний вихід флавоноїдної фракції.

Аналіз попередніх досліджень і публікацій. *Arnica montana* належить до рослин, які є під загрозою знищення. Деякий час вона була занесена до Червоної книги України. У цій рослині містяться різні БАР, з них понад 20 флавоноїдів (до 3 %): кверцетин, кемпферол, лютеолін, апігенін, рутин, астрагалін, ізокверцитрин, лютеолін та інші, які мають важливі протимікробні та антиоксидантні властивості.

Препарати з арніки гірської характеризуються протисклеротичною, кровоспинною, жовчогінною та бактеріостатичною дією. Вони допомагають при закрепах, посилюють скорочення матки, розширюють судини головного мозку, стимулюють та тонізують центральну нервову систему. У підвищених дозах ліки з арніки гірської мають заспокійливу дію. Внутрішньо ліки з цієї рослини вживають при маткових кровотечах після абортів, пологів та викиднів, а також при міокардитах, стенокардії, гіпертонії, кардіосклерозі. Застосовують препарати з арніки гірської для відновлення після мозкових кроволивів функціонування центральної нервової системи, а також при нічному енурезі. Як додатковий засіб препарати з цієї рослини застосовують для комплексної терапії гепатиту, холангіту та холециститу [6–8].

Деякі з БАР, що виявлені у арніці, застосовують як лікарські засоби:



Серед флавоноїдів ідентифіковано у траві арніки гірської кверцетин, ізокверцетин, рутин, кверцетин пентаоксиацетат, кверцетрин, гесперидин, кемпферол, лютеолін, апігенін [9,10]. Флавоноїди, з одного боку, стимулюють біосинтез простагландинів (гідрофільні флавоноїди) і на цій основі мають сечогінну і протинабрякову дію, а з іншого боку, гальмують біосинтез простагландинів і тому мають і протизапальну, і локальну анестезуючу дію, а також гальмують нагромадження тромбоцитів.

Лютеолін, кверцетин і еріодіктіол блокують ліпоксигеназу, чим можна пояснити антиасматичну, антизапальну дію флавоноїдів, а також протипухлинні властивості. Спазмолітична дія і послаблюючий ефект відносно дихальних м'язів пов'язані із здатністю флавоноїдів гальмувати фосфодієстерази. Внаслідок гальмування гіалуронідази і стимуляції пролінгідроксилази флавоноїди

зміцнюють сполучну тканину і збільшують опір капілярів. Крім цього відомі і такі властивості флавоноїдів: антибактеріальна, антигрибкова, імуностимулююча, анальгетична дія [11,12].

Виклад основного матеріалу і обговорення результатів. Сучасний метод культури клітин, тканин та органів є надзвичайно актуальним та дозволяє вирішити багато питань щодо якості сировини. Перевагою методу є те, що можна отримати велику кількість біомаси, незважаючи на пору року, умов навколишнього середовища та інших факторів.

Відомо, що найкращим методом вилучення БАР, зокрема і флавоноїдів, з рослинної сировини є екстракція. Для калусної біомаси також використано метод екстракції для вилучення флавоноїдів. На процес екстракції впливає багато технологічних факторів, проте даних щодо їх впливу на екстракцію калусної біомаси в літературі дуже мало, вони неоднозначні та несистематизовані.

Об'єктом дослідження була трава та насіння арніки гірської, заготовлена у фазі повного цвітіння (липень-серпень) від дикоростучої популяції Івано-Франківської області.

Калусну біомасу одержано з насіння біотехнологічним методом культивування *in vitro*. Використано середовище Мурасиге-Скуга (МС) для проростання насіння та середовище МС з фітогормонами для одержання калусної біомаси, підбирали які за методикою [5,6]. Отримано калусну біомасу арніки гірської при рН 5,5–5,8 з додаванням ауксинів та цитокінінів. Із ауксинів для отримання і підтримання культури тканин використано β -індолілоцтову кислоту (ІОК) у концентрації 2,0 мг/л та α -нафтилоцтову кислоту (НОК) у концентрації 0,1 мг/л. Також до середовища додано кінетик (0,5 мг/л), який не тільки активізує клітинні поділи, але й прискорює ріст багатьох калусних культур. Культивування проведено при освітленні 2000 лк, 16-годинному фотоперіоді та температурі 23 °С. Через 50 діб отримано калусну біомасу арніки гірської і проведено екстракцію.

Для вивчення залежності вмісту флавоноїдів і повноти екстракції з сировини отримували спиртові екстракти за різних значень таких факторів: спосіб екстракції, концентрація екстрагенту, співвідношення сировина:екстрагент.

Використано як екстрагент етиловий спирт різної концентрації (20 %, 40 %, 70 % і 96 %), співвідношення сировина:екстрагент взято 1:10, 1:20 і 1:40. Водно-етанольні екстракти отримували методом настоювання, на апараті Сокслета та на апараті з мішалкою. Отримані екстракти фільтрували через паперовий фільтр в мірну колбу. У кожній серії дослідів змінювали значення тільки одного з факторів, залишаючи незмінними значення інших. Для якісного визначення флавоноїдів у траві та калусній біомасі проведено кольорові реакції, результати яких показали, що у всіх екстрактах містяться флавоноїди. Для кількісного визначення флавоноїдів у сировині використано метод спектрофотометрії, оснований на здатності флавоноїдів утворювати зафарбовані халатні комплекси із спиртовим розчином алюмінію хлориду у середовищі кислоти хлороводневої розведеної.

Кількісний вміст суми флавоноїдів визначали в перерахунку на рутин, якщо максимум поглинання спиртових розчинів був близьким до специфічних спектральних характеристик вказаного флавона в межах 408–420 нм. З метою визначення вмісту суми флавоноїдів використовували питомий показник поглинання комплексу розчину ГСО рутину з алюмінію хлоридом, який становить 191 згідно з літературними даними. Тому до формули включено значення 191 [13]. Якщо максимум поглинання лежить в області 421–435 нм, то близько до спектральних характеристик іншого флавона – кверцетину. У таких випадках використовують інший показник поглинання комплексу розчину кверцетину ГСО кверцетину з хлоридом алюмінію дорівнює 778.

Реєстрацію ультрафіолетових спектрів і зміну оптичної густини продуктів взаємодії спиртових витяжок з сировини арніки з 5- % спиртовим розчином хлористого алюмінію в середовищі хлор водневої кислоти розведеної проведено за допомогою спектрофотометра в кюветі товщиною поглинального шару 10 мм. Діапазон сканування знаходився в межах 200–800 нм.

Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на рутин (кверцетин) визначали за формулою:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m_H (100 - W)}, \%$$

де m_0 – маса фармакопейного зразка кверцетину (рутину), г; m – маса сировини, г; W – втрата вологи при висушуванні, %; D_0 – оптична густина стандарт-зразка (кверцетин або рутин); D – оптична густина досліджуваного зразка.

Залежність виходу флавоноїдів з калусної біомаси та вихідної рослини від зміни способу екстракції, концентрації етилового спирту та співвідношення сировина:екстрагент наведено в таблиці.

Залежність повноти вилучення суми флавоноїдів з трави та калусної біомаси арніки гірської від умов екстракції

Параметри екстракції	Значення параметра	Середнє значення виходу фенольних сполук, %	
		калусна біомаса	трава
Спосіб екстракції (при концентрації етанолу 70 % та співвідношенні сировина:екстрагент 1:20)	настоювання	5,32	5,96
	в апараті Сокслета	5,62	6,12
	на апараті з мішалкою	4,56	5,85
Концентрація екстрагента (спирту етилового), % (при екстракції в апараті Сокслета і співвідношенні сировина:екстрагент 1:20)	20	2,56	3,50
	40	5,14	5,89
	70	5,62	6,12
	96	3,46	4,22
Співвідношення сировина:екстрагента (при екстракції в апараті Сокслета і концентрації етанолу 70 %)	1:10	3,75	3,80
	1:20	5,62	6,12
	1:40	4,52	5,76

Аналізуючи дані таблиці, бачимо, що найкращим екстрагентом є 70 % етанол: вилучається 5,62 % флавоноїдів з калусної біомаси та 6,12 % – з рослинної сировини. Зміна концентрації спирту (підвищення до 96 % та зниження до 40 % і 20 %) призводить до зниження кількості вилучених фенольних речовин на 3,46 %, 5,14 %, 2,56 % відповідно. Найкращим способом є екстракція на апараті Сокслета з використанням етилового спирту. Зміна способу екстракції (настоювання та використання апарату з мішалкою) призводить до зниження кількості вилучених фенольних речовин до 5,32 % та 4,56 % відповідно. Найкращим співвідношенням сировина:екстрагент є 1:20 – вилучається максимальна кількість флавоноїдів. Зменшення кількості сировини (1:40) приводить до зменшення виходу флавоноїдів до 4,52 %, а збільшення кількості сировини (1:10) спричиняє зменшення кількості фенольних сполук до 3,75 %.

На основі отриманих даних (таблиця) оптимізовано процес екстракції калусної біомаси та рослинної сировини арніки гірської за допомогою зміни параметрів екстракції.

Висновки. Встановлено, що максимального виходу флавоноїдної фракції з калусної біомаси та вихідної рослини *Arnica montana* досягають за таких умов екстрагування: екстрагент – 70 %-й етанол, співвідношення сировина:екстрагент – 1:20, спосіб екстракції – в апараті Сокслета. Технологічні параметри вилучення флавоноїдів з калусної біомаси та рослини є ідентичні, завдяки чому технологічний процес переробки калусної біомаси можна здійснювати з використанням типового обладнання.

1. Кунах В. А. Біотехнологія лікарських рослин. Генетичні та фізіолого-біохімічні основи. – К.: Логос, 2005. – 730 с. 2. Srivastava L. M. *Plant Growth and Development: Hormones and Environment Academic Press, New York, 2002.* – P. 140–143. 3. Sharma S., Thokchom R. *A review on endangered*

medicinal plants of India and their conservation. Journals of Crop and Weed, 2014. – No. 10(2). – P. 205–218.

4. Петріна Р. О., Маснюк Я. Т. Калусогенез у культурі *in vitro* арніки гірської // Вісник Нац. ун-ту “Львівська політехніка”. Серія: Хімія, технологія речовин та їх застосування. – 2008. – N 608. – С. 151–155.

5. Конечна Р. Т., Петріна Р. О., Новіков В. П., Конечний Ю. Т., Шкула Р. Г., Корнійчук О. П. Одержання екстрактів калусної маси та рослинної сировини *Arnica montana* L. // Фармацевтична клінічна фармація, фармакотерапія та медична стандартизація. – 2015. – № 1–2. – С. 100–104.

6. Надь Б. Б. Біоекологічні та біотехнологічні основи збереження генофонду *Arnica montana* L. в Закарпатті. – Ужгород – Берегове: Тітрапі, 2014.

7. Волошин О. І. Препарати арніки гірської у клінічній практиці вітчизняної і зарубіжної медицини: (огляд літератури) / О. І. Волошин, Т. В. Захарчук, І. Ф. Мецишен, І. М. Яремій // Ліки. – 2000. – № 3–4. – С. 41–47.

8. Кобзар А. Я. Фармакогнозія в медицині. – К.: Медицина, 2007. – 544 с.

9. Воробець Н. М., Піняжко О. Б. Фізіологічно активні речовини та антиоксидантна активність суцвіть арніки гірської (*Arnica montana*) // Український фармацевтичний журнал. – 2012. – № 1–2 (18–19). – С. 82–85.

10. Конечна Р. Т. Одержання комплексу біологічно активних речовин з калусних культур лікарських рослин: дис...кандидата фарм.наук: 15.00.02 / Конечна Роксолана Тарасівна. – Львів, 2016. – С.234.

11. Pokorny J. Application of phenolic antioxidants in food products // *EJFAF Chem.* – 2008. – Vol. 7. – P. 3320–3324.

12. Pietta P. G. Flavonoids as antioxidants / P. G. Pietta // *J.Nat.Food.* – 2000. – Vol. 63. – P. 1035–1042.

13. Державна Фармакопея України. Доповнення 2. – 1-ше вид. – Х.: Держ. підпр. “Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.