

Н. Н. Бойко, Д. И. Писарев, Е. Т. Жилиякова, О. О. Новиков

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ РУТИНА И ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В ЭКСТРАКЦИОННОЙ СИСТЕМЕ ИЗ ЦВЕТКОВ КАЛЕНДУЛЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ И ЭКСТРАГЕНТА

Научно-образовательный центр «Фармация», Белгородский государственный национальный исследовательский университет, г. Белгород, Россия

В статье представлены результаты изучения и моделирования процесса равновесного распределения в экстракционной системе некоторых видов биологически активных веществ из цветков календулы лекарственной. Цель данной работы – изучить распределение рутина и хлорогеновой кислоты между фазами экстракционной системы из цветков календулы лекарственной и экстрагента. Для исследований использовали фармакопейное сырье *Calendulae officinalis flores*. Для экстракции использовали измельченное растительное сырье с фракцией частиц 0,1–0,5 мм, в качестве экстрагента использовался этанол 70% об/об. Качественный и количественный анализ проводили с помощью ВЭЖХ-анализа по стандартным образцам рутина и хлорогеновой кислоты. Для объяснения и математического моделирования процесса распределения молекул БАВ в экстракционной системе нами была выдвинута гипотеза о том, что оно должно подчиняться квантовой статистике Ферми-Дирака. Экспериментальные данные относительно распределения рутина и хлорогеновой кислоты в экстракционной системе хорошо описываются предложенной теоретической моделью, однако для согласования эксперимента и теоретической модели необходимо было внести дополнительный параметр в виде предельной равновесной концентрации вещества на скелете ЛРС.

Ключевые слова: ноготки лекарственные, цветки, равновесие, распределение, рутин, хлорогеновая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

На данный момент вопросам развития теоретических основ процесса экстракции биологически активных веществ (БАВ) из лекарственного растительного сырья (ЛРС) посвящено относительно мало работ. При этом часть этих работ посвящена частным вопросам процесса экстракции БАВ из ЛРС с помощью ионных и гидротропных растворителей (водных растворов определенных видов поверхностно активных веществ), что не подходит для описания экстракционной системы с обычными растворителями [1–3]. Бойко Н. Н. и Зайцев А. И. предложили рассматривать процесс равновесия с точки зрения адсорбции-десорбции БАВ на скелете ЛРС [4]. В другой работе показано, что процесс распределения экстрактивных веществ описывается законом адсорбции Фрейндлиха [5]. В работе [6] было показано, что распределение БАВ в виде тритерпеновых сапонинов (глицирам) и халкона (ликурозид) между скелетом (твердой фазой, которая представлена в основном целлюлозой, лигнином и некоторыми другими высокомолекулярными веществами) из-

мельченных корней солодки и экстрагентом (жидкой фазой), хорошо описывается математической моделью на основе закона сохранения массы и адсорбции Генри.

Поэтому актуальным является расширение исследований в изучении процесса распределения БАВ и экстрактивных веществ между фазами для других экстракционных систем.

Календула лекарственная сем. астровых (*Calendula officinalis* L., *Asteraceae*) давно используется в официальной медицине для получения на ее основе ряда фитопрепаратов для лечения различных заболеваний в дерматологии, стоматологии, отоларингологии, гастроэнтерологии [7]. Лекарственным растительным сырьем в официальной медицине являются цветки календулы лекарственной. Данный вид ЛРС содержит различные БАВ: полисахариды, эфирное масло, каротиноиды, сапонины, гидроксикоричные кислоты, флавоноиды и ряд других веществ [8, 9]. При этом из данного вида сырья на территории СНГ производятся следующие препараты: «Цветки ноготков», «Настойка календулы», «Мазь календулы», «Ротокан», «Алором», «Калефлон», «Карофиленовая мазь»

[10]. Таким образом, исследования в области экстракции БАВ из данного вида ЛРС до сих пор являются актуальными.

Цель данной работы – апробировать предложенную ранее теоретическую модель, основанную на адсорбционной концепции для описания равновесного распределения рутина и хлорогеновой кислоты между фазами в экстракционной системе из цветков календулы лекарственной и экстрагента, а также предложить ее обоснование с точки зрения законов статистической физики.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Сырье и химические реактивы

Для исследований использовали фармакопейное сырье (ФС.2.5.0030.15) *Calendulae officinalis flores* (Ноготков лекарственных цветки) от АО «Красногорсклекарствоза», г. Красногорск, Россия, серия № 191216, срок годности до 01/2019 г. Для экстракции использовали измельченное растительное сырье с фракцией частиц 0,1–0,5 мм, в качестве экстрагента использовался 70±1% об/об этанол. Качественный и количественный анализ проводили с помощью ВЭЖХ-анализа по стандартным образцам рутина и хлорогеновой кислоты Государственной Фармакопеи Украины.

Методика получения экстрактов

Процесс равновесия в экстракционной системе изучали при температуре 4, 20, 40 и 60±1°C, при этом применяли простую мацерацию в течение 24 часов настаивания. Распределение БАВ между фазами изучали при соотношении масса сырья / объем экстрагента 1:5, 1:10, 1:20, 1:40.

ВЭЖХ-анализ

ВЭЖХ-анализ проводили с помощью хроматографа фирмы «Agilent Technologies», серии «Agilent 1200 Infinity», производства США. Подробно условия хроматографирования полученных экстрактов освещены в работе [11]. ВЭЖХ-анализ проводили с помощью диодно-матричного детектора при длине волны 355 нм для рутина и при 325 нм для хлорогеновой кислоты.

Теоретическая часть

Для объяснения и математического моделирования процесса распределения молекул определенного вида БАВ в экстракционной системе между фазами на первом этапе нами была выдвинута гипотеза о

том, что данное распределение можно объяснить с помощью адсорбционной концепции, закона сохранения массы и закона выравнивания химического потенциала в жидкой и твердой фазах:

$$\Delta G = dG_2 - dG_1 \quad (1)$$

$$\mu_1 = dG_1 + RT \cdot \ln n_1 \quad (2)$$

$$\mu_2 = dG_2 + RT \cdot \ln n \quad (3)$$

При наступлении равновесия в системе $\mu_1 = \mu_2$ получаем:

$$dG_1 + RT \cdot \ln n_1 = dG_2 + RT \cdot \ln n \quad (4)$$

После преобразования уравнения (4) приходим к уравнению (5), которое выражает закон адсорбции Генри:

$$\frac{dG_1 - dG_2}{RT} = -\frac{\Delta G}{RT} = \ln \left(\frac{n}{n_1} \right) \text{ или}$$

$$\exp \left(\frac{\Delta G}{RT} \right) = K_H = \frac{n_1}{n} \quad (5)$$

Применяя условие материального баланса молекул БАВ в экстракционной системе $n_1 + n = n_0$, получаем уравнение (6):

$$\exp \left(\frac{\Delta G}{RT} \right) = \frac{n_0 - n}{n} = \frac{n_0}{n} - 1 \text{ или}$$

$$\frac{n}{n_0} = \frac{1}{1 + \exp \left(\frac{\Delta G}{RT} \right)} \quad (6)$$

где ΔG – энергия молекул определенного вида БАВ в экстракционной системе, Дж/моль;

R – газовая постоянная, 8,314, Дж/(моль·К);

T – абсолютная температура, К;

dG_1 – энергия связи молекул определенного вида БАВ со скелетом растительного сырья, Дж/моль;

dG_2 – энергия взаимодействия молекул определенного вида БАВ и молекул растворителя, Дж/моль;

μ_1 – химический потенциал молекул определенного вида БАВ в твердой фазе;

μ_2 – химический потенциал молекул определенного вида БАВ в жидкой фазе;

K_H – константа Генри;

n – среднее число молекул определенного вида БАВ, которые переходят в раствор и имеют определенный уровень энергии ΔG , моль;

n_0 – общее число молекул определенного вида БАВ в экстракционной системе, моль;

n_1 – среднее число молекул определенного вида БАВ, которые остались в твердой фазе ЛРС посредством адсорбции, моль.

С другой стороны, поскольку экстракционная система – это макроскопическая система, которая состоит из большого количества молекул БАВ, растворителя и макромолекул целлюлозно-лигнинового матрикса клеточных стенок ЛРС, можно предположить, что поведение молекул БАВ в данной системе должно описываться одной из двух возможных квантовых статистик Бозе-Эйнштейна или Ферми-Дирака. Данные статистики составляют основу статистической физики и применяются для описания поведения двух различных видов элементарных частиц (бозонов и фермионов) в любой квантовой системе, образованной большим количеством элементарных частиц.

Поведение фермионов в квантовой системе (в одном квантовом состоянии не может находиться более одного фермиона – принцип запрета Паули) напоминает поведение молекул БАВ с адсорбентом (одна молекула БАВ занимает одну свободную ячейку в адсорбенте), в роли которого выступает целлюлозно-лигниновый матрикс клеточных стенок ЛРС. Следовательно, уравнение статистики Ферми-Дирака по своей сущности ближе к описанию поведения молекул БАВ в экстракционной системе, чем уравнение Бозе-Эйнштейна, которое описывает поведение большого количества бозонов в квантовой системе, при этом нет ограничений на количество бозонов, которое может находиться в одном квантовом состоянии. Уравнение статистики Ферми-Дирака представлено ниже (7):

$$\frac{n}{n_0} = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{\Delta G}{R \cdot T}\right)} \quad (7)$$

Как видно, уравнения (6) и (7) идентичны, однако были получены различными подходами. Таким образом, статистиче-

ский подход с использованием уравнения квантовой статистики Ферми-Дирака в дополнение к адсорбционной концепции может быть теоретической основой для объяснения статической стороны процесса распределения молекул БАВ между фазами экстракционной системы.

Из уравнений (6) и (7) видно, что количество молекул определенного вида БАВ (n), которое перейдет в экстрагент, зависит от их исходного количества (n_0), температуры (T) и энергии в данной экстракционной системе (ΔG). Последний параметр характеризует избыточную энергию молекул БАВ, которую они приобретают в результате процессов десорбции и солюбилизации в экстракционной системе.

При этом если распределение БАВ между фазами действительно объясняется данной зависимостью, то после некоторых преобразований приведенного выше уравнения и использования дополнительных взаимосвязей ($n = C \cdot V/Mr$; $n_0 = m_0/Mr$), обратная величина концентрации БАВ в экстракте от объема экстрагента при постоянной температуре должна описываться линейной зависимостью (8):

$$\begin{aligned} \frac{1}{C} &= \frac{1}{m_0} \cdot V + \exp\left(\frac{\Delta G}{RT}\right) \cdot \frac{V}{m_0} = \\ &= \frac{1}{m_0} \cdot V + K_H \cdot \frac{V}{m_0} = a \cdot V + b \quad (8) \end{aligned}$$

где C – концентрация БАВ в экстракте, г/мл;

m_0 – общая масса БАВ в экстракционной системе, г;

V – объем экстракта, для упрощения он равен объему экстрагента в экстракционной системе, мл;

a – константа, равная обратной величине общей массы БАВ в экстракционной системе ($1/m_0$), 1/г;

b – константа, равная произведению константы Генри (K_H) и соотношения объема и общего количества БАВ ($b=K_H \cdot V/m_0$), мл/г.

При этом значение энергетической константы (ΔG) можно найти по уравнению (9):

$$\ln K_H = \frac{\Delta G}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad (9)$$

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 отображены результаты обработки экспериментальных данных в координатах $1/C = f(V)$ для рутина при разной температуре и соотношении ЛРС / экстрагент.

На рисунке 2 отображены результаты обработки экспериментальных данных в координатах $1/C = f(V)$ для гидроксикоричной кислоты при разной температуре и соотношении ЛРС / экстрагент.

Как видно из рисунков 1 и 2, экспериментальные данные хорошо описываются уравнением (8) и имеют линейную зависимость с высоким коэффициентом детерминации $R^2 = 0,99$. Кроме этого, регрессионный анализ показал адекватность уравнений регрессии, при этом критерий Фишера удовлетворял условию $F_{\text{расч}} \leq F_{\text{табл}}$, а уровень значимости уравнений и коэффициентов в них (p) удовлетворял условию $p_{\text{расч}} \leq p_{\text{табл}}$. Следовательно, предложенная теоретическая модель статистически значима.

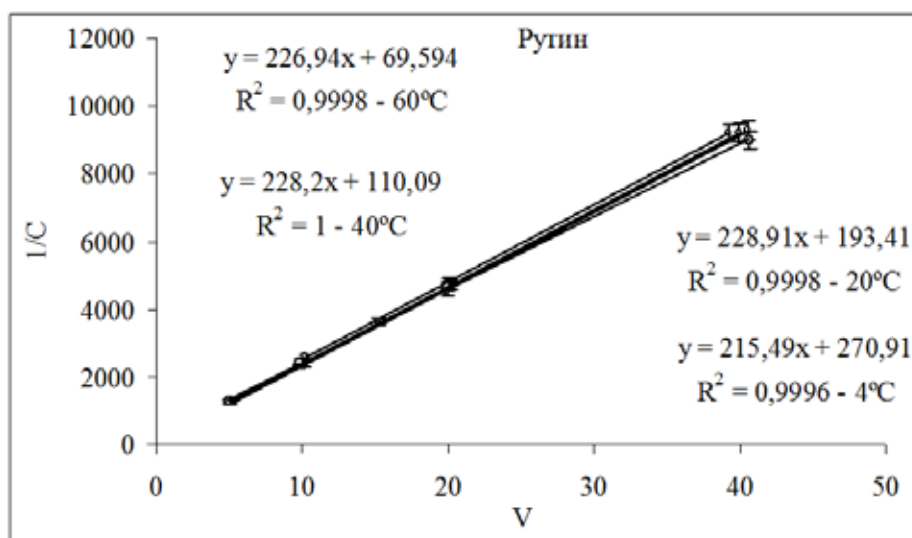


Рисунок 1. – Экспериментальные данные и линии регрессии для рутина

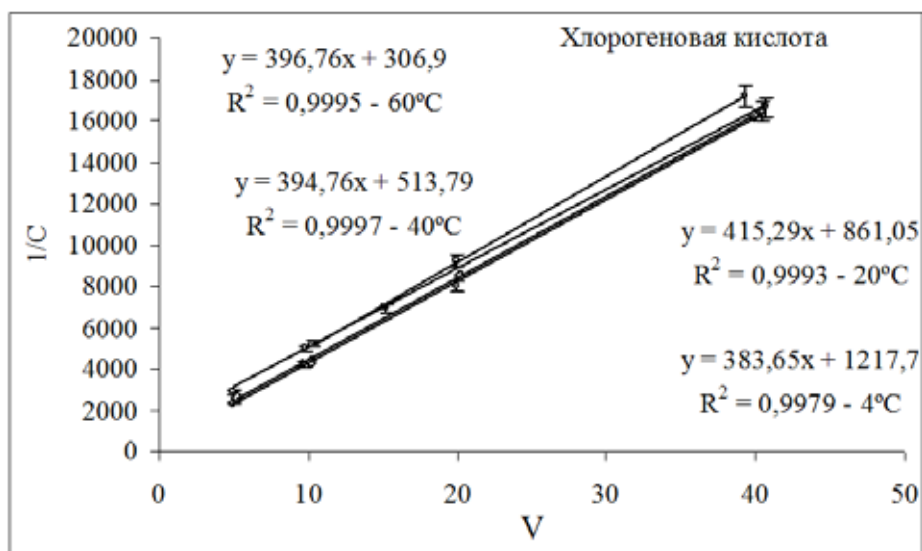


Рисунок 2. – Экспериментальные данные и линии регрессии для хлорогеновой кислоты

Далее с помощью полученных констант в уравнениях регрессии при различной температуре рассчитывают константу Генри ($K_H = b/a$). На рисунке 3 отображе-

ны регрессионные уравнения зависимости логарифма константы Генри от обратной величины температуры для рутина и хлорогеновой кислоты.

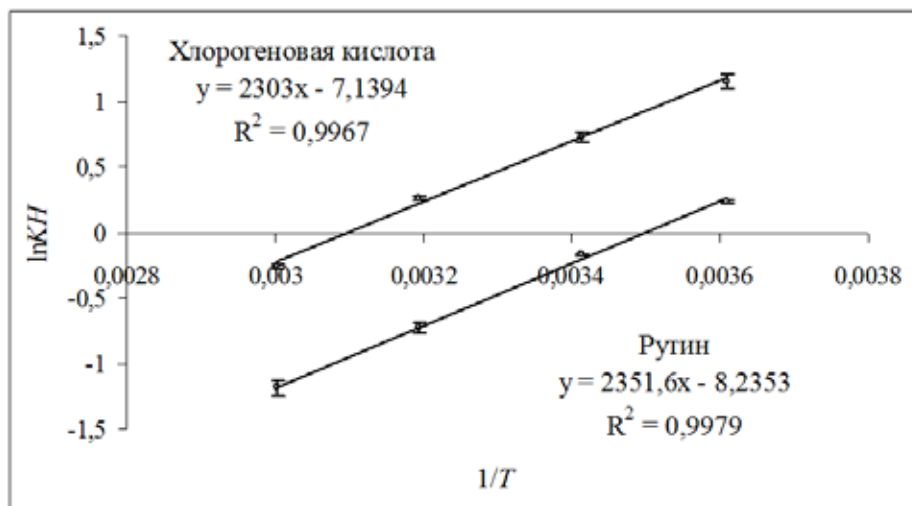


Рисунок 3. – Зависимость логарифма константы Генри от обратной величины температуры и линии регрессии для рутина и хлорогеновой кислоты

Как видно из рисунка 3, экспериментальные данные хорошо описываются уравнением (9) и также имеют линейную зависимость с высоким коэффициентом детерминации $R^2 = 0,99$. Кроме этого, регрессионный анализ показал адекватность уравнений регрессии, при этом критерий Фишера удовлетворял условию $F_{расч} \leq F_{табл}$, а уровень значимости уравнений и коэффициентов в них (p) удовлетворял условию $p_{расч} \leq p_{табл}$. Следовательно, предложенная теоретическая модель статистически значима, а предложенная гипотеза о виде распределения БАВ в экстракционной системе не отвергается.

В таблице 1 приведены значения рассчитанных констант: суммарного количества БАВ в экстракционной системе ($m_0 = 1/a$), энергетического параметра ($\Delta G = k \cdot 8,314$) для ЛРС, где k – угол наклона регрессионной прямой в уравнении (9), приведенный на рисунке 3, а также дополнительной константы (g) в виде свободного члена в уравнении (9), которая не была предсказана теоретически, но обнаружена экспериментально. Данная константа характеризует предельное равновесное количество БАВ на скелете ЛРС ($m_p = \exp(g)$).

Как видно из данных таблицы 1, энергетический параметр (ΔG) для рутина и

хлорогеновой кислоты имеет одинаковое значение и в среднем равен 19,4 кДж/моль, что характерно для энергетики процесса физической адсорбции. Интересно сравнить значения констант, которые были рассчитаны с помощью регрессионного анализа: значение суммарного количества БАВ в экстракционной системе (m_0) и равновесной концентрации БАВ на скелете ЛРС (m_p) для изученных видов БАВ. Оказывается, что, несмотря на одинаковые значения энергетического параметра для рутина и хлорогеновой кислоты на данном виде ЛРС, предельное значение адсорбции на скелете ЛРС для этих веществ отличается почти в три раза. Более того, при сравнении отношения равновесной концентрации БАВ на скелете ЛРС (m_p) и суммарного количества БАВ в экстракционной системе (m_0), также можно заметить их значительное отличие для рутина и хлорогеновой кислоты. Для рутина данное отношение равно 0,064 ($2,8 \cdot 10^{-4} / 44 \cdot 10^{-4}$), а для хлорогеновой кислоты 0,33 ($8,3 \cdot 10^{-4} / 25 \cdot 10^{-4}$), то есть рутин при данных условиях в пять раз слабее адсорбируется на скелете ЛРС, чем хлорогеновая кислота. Следовательно, хлорогеновая кислота проявляет большее сродство к скелету ЛРС, чем рутин.

Таблица 1. – Значения теоретических констант для БАВ

№ п/п	БАВ	Константа			
		ΔG , Дж/моль	m_p , г/г ЛРС	g	m_0 , г/г ЛРС
1	Рутин	19600±2700	$(44 \pm 2) \cdot 10^{-4}$	-8,2±1,1	$(2,8 \pm 0,9) \cdot 10^{-4}$
2	Хлорогеновая кислота	19200±3300	$(25 \pm 1) \cdot 10^{-4}$	-7,1±1,3	$(8,3 \pm 1,5) \cdot 10^{-4}$

Кроме этого, интересно сравнить полученную расчетным путем константу суммарного количества БАВ в экстракционной системе (m_0) с ее экспериментально полученным значением. Для этого в таблице 2 приведены основные параметры расчетного сырья.

Как видно из данных таблицы 1 и таблицы 2, расчетное значение суммарного количества БАВ в экстракционной системе (m_0) на грани погрешности совпадает с ее экспериментально найденным значением, для рутина $(41 \pm 2) \cdot 10^{-4} \approx (44 \pm 2) \cdot 10^{-4}$ и для хлорогеновой кислоты $(23 \pm 1) \cdot 10^{-4} \approx (25 \pm 1) \cdot 10^{-4}$.

Таблица 2. – Основные фармакогностические параметры цветков ноготков

№ п/п	Параметр*	Экспериментальное значение**
1	Влажность, г/г ЛРС	0,076±0,002
2	Содержание экстрактивных веществ, г/г ЛРС	0,34±0,01
3	Содержание рутина, г/г ЛРС	$(41 \pm 2) \cdot 10^{-4}$
4	Содержание хлорогеновой кислоты, г/г ЛРС	$(23 \pm 1) \cdot 10^{-4}$

Примечания: * – Параметры найдены для влажного сырья. ** – Среднее значение и ошибку параметра рассчитывали при трех повторностях $n = 3$ и уровне значимости $P = 0,95$.

Таким образом, из приведенных выше данных можно сделать заключение, что для хорошего согласования эксперимента и теоретической модели в виде уравнения (7) необходимо внести дополнительный параметр предельного значения равновесного количества БАВ на скелете ЛРС (n_p), как это отображено в уравнении (10):

$$\frac{n}{n_0} = \frac{1}{1 + n_p \cdot \exp\left(\frac{\Delta G}{R \cdot T}\right)} \quad (10)$$

Предложенная теоретическая основа и математическая модель на ее основе позволяют объяснить и смоделировать зависимость концентрации БАВ в экстракте от температуры и объема экстрагента, найти константы, характеризующие БАВ и цветков календулы лекарственной, и прогнозировать оптимальные условия ведения процесса экстракции БАВ из данного вида ЛРС. Более того, предложенная теоретическая модель с использованием дополнительных законов физической химии позволит в дальнейшем описывать влияние диэлектрической постоянной экстрагента на концентрацию БАВ в экстракте и делать прогноз относительно оптимального выбора экстрагента для максимального извлечения БАВ из ЛРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено распределение рутина и хлорогеновой кислоты между фазами экстракционной системы из цветков календулы лекарственной и экстрагента. Выдвинута гипотеза о механизме распределения БАВ

в экстракционной системе, на основе которой предложена теоретическая модель для описания полученных экспериментальных данных. Результаты исследований показывают хорошее совпадение экспериментальных данных и теоретической модели, основывающейся на квантовой статистике Ферми-Дирака, однако для этого в теоретическую модель необходимо внесение дополнительного параметра, учитывающего предельную равновесную концентрацию БАВ на скелете ЛРС. Определены численные значения констант в предложенной модели.

SUMMARY

N. N. Boyko, D. I. Pisarev,
E. T. Zhilyakova, O. O. Novikov
THE STUDY OF RUTIN AND
CHLOROGENIC ACID DISTRIBUTION
PROCESS IN THE EXTRACTION
SYSTEM FROM THE FLOWERS
OF *CALENDULA OFFICINALIS* AND THE
EXTRACTANT

The article presents the results of the research and modeling of the equilibrium distribution process in the extraction system of some types of biologically active substances (BAS) from *Calendula officinalis* flowers. The purpose of the work is to study rutin and chlorogenic acid distribution between the phases of the extraction system from the flowers of *Calendula officinalis* and the extractant. Pharmacopoeia plant raw material *Calendulae officinalis flores* has been used for the study. For extraction we have used ground plant raw material with particle fraction of 0,1–0,5 mm; ethanol 70% v/v has

been used as the extractant. Qualitative and quantitative analysis has been carried out with high performance liquid chromatography with standard samples of rutin and chlorogenic acid. For explanation and mathematical modeling of BAS molecules distribution process in the extraction system we have suggested a hypothesis that this process should be governed by Fermi-Dirac quantum statistics. The experimental data on rutin and chlorogenic acid distribution in the extraction system are well explained by the theoretical model proposed but for agreement of the experiment and the theoretical model it is necessary to add an additional parameter of limiting equilibrium concentration of the substance in the plant raw material matrix.

Keywords: *Calendula officinalis*, flowers, equilibrium, distribution, rutin, chlorogenic acid.

ЛИТЕРАТУРА

1. Rahman, N. R. A. Selection of optimum ionic liquid solvents for flavonoid and phenolic acids extraction / N. R. A. Rahman, N. A. Yunus, A. A. Mustaffa // IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2017 Jun 21; Sarawak: Malaysia. – 2017. – P. 1–12.

2. Extraction of phytochemicals using hydrotropic solvents / J. Nagarajan [et al.] // Separation Science and Technology. – 2016. – Vol. 51, Issue 7. – P. 1151–1165. DOI: 10.1080/01496395.2016.1143842.

3. Theo, W. L. Solubility modelling for phytochemicals of Misai Kucing in different solvents / W. L. Theo, A. A. Mustaffa, J. S. Lim // Fluid Phase Equilibria, 2016. – Vol. 427. – P. 246–258. DOI.org/10.1016/j.fluid.2016.07.019.

4. Бойко, Н. Н. Изучение зависимости концентрации биологически активных веществ в получаемых вытяжках от соотношения экстрагент/растительное сырье / Н. Н. Бойко, А. И. Зайцев // Актуальные исследования гуманитарных, естественных, точных и общественных наук: материалы III Международной научно-практической конференции (Новосибирск, 25 ноября

2013 г.). – Новосибирск: ООО «ЦСРНИ». 2013. – С. 94–101.

5. Роль сорбционных явлений в распределении экстрактивных веществ между *Glycyrrhizae radices* и экстрагентом / Н. Н. Бойко [и др.] // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18, № 4. – С. 479–487. DOI: <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2018.18/555>.

6. Simplified mathematical modeling of the distribution process of licuroside and glycyram between the extractant and *Glycyrrhizae radices* / N. N. Boyko [et al.] // Research result. Medicine and Pharmacy. – 2018. – Vol. 4, Issue 2. – P. 75–80. DOI: 10.18413/2313-8955-2018-4-2-0-8.

7. Handbook of medicinal herbs. 2nd ed. Duke JA., Bogenschutz-Godwin MJ., Duke PAK. Boca Raton: CRC Press LLC. 2002. – 893 p.

8. Попова, Н. В. Лекарственные растения мировой флоры: энциклопедический справочник / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко, А. С. Куцанян. – Харьков: Диска плюс. – 2016. – 540 с.

9. World Health Organization (WHO) monographs on selected medicinal plants. Vol. 2. Geneva: World Health Organization. – 2002. – 351 p.

10. Регистр лекарственных средств России [Электронный ресурс] – Режим доступа: <https://www.rlsnet.ru>. – Дата доступа: 10.09.2018.

11. Studying the polyphenolic structure of *Laurus Nobilis* L. leaves / E. T. Zhilyakova [et al.] // Indo American Journal of Pharmaceutical Sciences, 2017. – Vol. 4, Issue 9. – P. 3066–3074. DOI.org/10.5281/zenodo.910685.

Адрес для корреспонденции:

308015, Россия,

г. Белгород, ул. Победы, д.85,

НОЦ «Фармация»,

Белгородский государственный

национальный исследовательский университет,

тел.: +79803268487,

e-mail: boykoniknik@gmail.com,

Бойко Н. Н.

Поступила 17.09.2018 г.