

## МЕЖФАЗНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ И РИБОФЛАВИНА В ЭКСТРАКЦИОННЫХ СИСТЕМАХ НА ОСНОВЕ БЛОКСОПОЛИМЕРА «ПЛУРОНИК Р-123»

© 2015 Г. В. Шаталов<sup>1</sup>, О. А. Пахомова<sup>2</sup>, Н. Я. Мокшина<sup>3</sup>, Д. А. Минаков<sup>3</sup>, В. Н. Феклин<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1,  
394006 Воронеж, Россия

<sup>2</sup>Елецкий государственный университет им. И. А. Бунина, ул. Коммунаров, 28, 399740 Елец, Россия

<sup>3</sup>Военный учебно-научный центр Военно-воздушных сил «Военно-воздушная академия имени профессора  
Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина» ул. Старых Большевиков, 54 «А», 394064 Воронеж, Россия  
e-mail: moksnad@mail.ru

Поступила в редакцию 23.06.2015 г.

**Аннотация.** Установлены закономерности межфазного распределения аскорбиновой кислоты и рибофлавина в экстракционных системах на основе блоксополимера: концентрация раствора полимера, соотношение объемов фаз, природа высаливателя. Рассчитаны количественные характеристики экстракции при различных соотношениях объемов фаз (коэффициенты распределения, степень извлечения), рекомендованы наиболее эффективные системы для извлечения витаминов из водно-солевых растворов. Проведен сравнительный анализ экстракционной способности растворителей разных классов по отношению к аскорбиновой кислоте и рибофлавинолу. Количественное определение аскорбиновой кислоты и рибофлавина после их экстракции осуществлено методами спектрофотометрии и люминесцентного анализа, для чего были изучены спектры поглощения и построены градуировочные графики в обоих методах.

**Ключевые слова:** экстракция, аскорбиновая кислота, рибофлавин, блоксополимер, спектрофотометрическое определение, люминесцентный анализ.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время актуальным направлением биомедицинских исследований является изучение комплексных соединений блоксополимеров различного строения с лекарственными препаратами. Это связано с тем, что синтетические полимерные системы являются переносчиками биологически активных веществ (БАВ) *in vitro* и *in vivo*. В последние годы все большее внимание исследователей привлекают неионогенные амфифильные полимеры, способные обратимо изменять конформацию и активность биологических компонентов — липидных мембран, мембранных транспортеров и ферментов. К числу наиболее изученных амфифильных полимеров относятся блоксополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО) состава (ЭО)<sub>x</sub>–(ПО)<sub>y</sub>–(ЭО)<sub>x</sub>, которые состоят из центрального относительно гидрофобного полипропиленоксидного блока, фланкированного гидрофильными блоками из ЭО [1]. Подобные блоксополимеры известны под торговыми марками

«Полоксамеры» или «Плуроники» и могут быть использованы в биохимии, клеточной биологии и биотехнологии в качестве регуляторов активности мембраносвязанных ферментов.

Витамины являются важнейшими биологически активными соединениями, синтез которых в настоящее время достиг промышленных масштабов. Широко распространено применение витаминных комплексов, добавок и смесей, разрабатываются новейшие формы лекарственных препаратов на основе витаминов. В водных растворах молекулы «Плуроников» агрегируют с образованием наноразмерных мицелл, имеющих гидрофобное ядро и гидрофильную оболочку, и в которые могут быть инкапсулированы витамины для улучшения их растворимости, времени циркуляции в крови и доставки к клеткам органов [2].

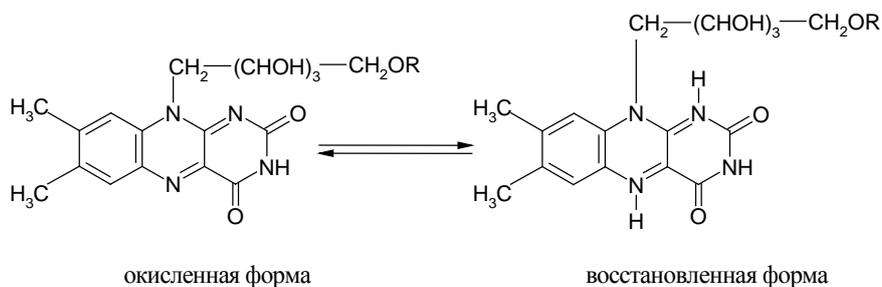
Цель исследования — изучение особенностей межфазного распределения аскорбиновой кислоты и рибофлавина-моонуклеотида, установление количественных характеристик процесса для акту-

ализации применения «Плуроника-Р-123» в качестве эффективного экстрагента витаминов из водных сред.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе применяли лекарственные препараты «Аскорбиновая кислота» и «Рибофлавина-моноклеотид». В водном растворе аскорбиновая

кислота имеет кислую реакцию (например, в 0.1 моль/дм<sup>3</sup> растворе pH = 2.2) и обычно реагирует как одноосновная кислота. Основу рибофлавина составляет флавиновая трехъядерная система [3]. Оба рибофлавиновых витамина малоустойчивы, так как азидиеновая группировка в флавиновой системе легко, но обратимо восстанавливается в бесцветную форму по схеме:



Готовили водно-солевой раствор аскорбиновой кислоты и рибофлавина-моноклеотида с концентрациями  $2 \cdot 10^{-4}$  мг /см<sup>3</sup> в насыщенном растворе сульфата аммония, обеспечивающего наиболее полное выделение полимера в отдельную фазу. Концентрации блоксополимера «Плуроник» в водных растворах составляли 0.04—0.09 г/см<sup>3</sup>. В градуированные пробирки вместимостью 25 см<sup>3</sup> помещали по 10 см<sup>3</sup> раствора аскорбиновой кислоты или рибофлавина-моноклеотида, 2—4 см<sup>3</sup> водного раствора полимера с разными концентрациями. Время расслаивания экстракционной системы составляло 3—5 минут. Для установления межфаз-

ного равновесия и полного расслаивания системы экстракционную систему центрифугировали при 5000 об/мин в течение 10 минут. Измеряли соотношение объемов равновесных водной и органической фаз  $r$  ( $r = V_B / V_O$ ). Водно-солевую фазу отделяли от органической и анализировали методом УФ-спектрофотометрии (спектрофотометр Shimadzu UV1800,  $l = 1$  см) или люминесцентного анализа. Спектрофотометрическое определение витаминов проводили по градуировочным графикам (рис. 1), построенным при собственных длинах волн (445 нм для рибофлавина-моноклеотида и 265 нм для аскорбиновой кислоты).

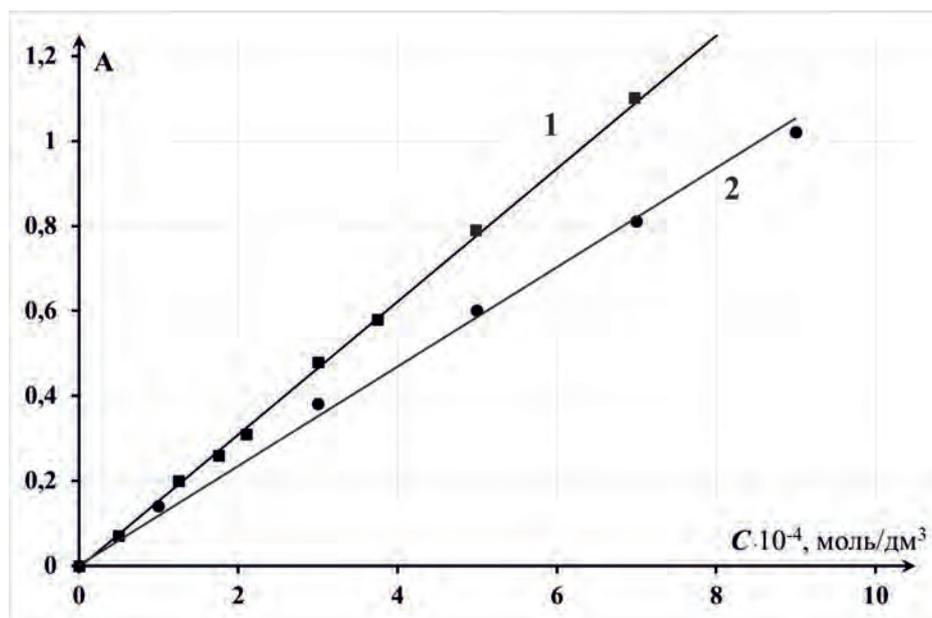


Рис. 1. Градуировочные графики для определения аскорбиновой кислоты (кривая 1) и рибофлавина-моноклеотида (кривая 2) методом абсорбционной спектроскопии

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В табл. 1 представлены имеющиеся в литературе сведения об экстракции аскорбиновой кислоты и рибофлавина, в том числе в форме рибофлавина-моноклеотида, растворителями разных классов и растворами полимеров [4—7]. Из представленных данных можно заключить, что органические растворители практически не эффективны для извлечения витаминов, полимер поли-*N*-винил-

метил-ацетамид оказался пригодным для экстракции только аскорбиновой кислоты, а полиакриламид — только для экстракции рибофлавина. Отметим, что имеющий линейное строение полиэтиленгликоль не может успешно применяться для извлечения витаминов. Для всех изученных систем наблюдается тенденция уменьшения степени извлечения витамина В<sub>2</sub> в форме рибофлавина-моноклеотида по сравнению с рибофлавином.

**Таблица 1.** Степень извлечения витаминов (%) при однократной экстракции растворителями разных классов ( $r = 5 : 1$ )

Экстрагент	Аскорбиновая кислота	Рибофлавин	Рибофлавин моноклеотид
Ацетон	-	79	12
Бутиловый спирт	53	64	9
Амиловый спирт	44	-	-
Этилацетат	38	10	8
Бутилацетат	20	-	-
Поли- <i>N</i> -винилпирролидон	94	49	42
Поли- <i>N</i> -винилкапролактан	53	42	37
Полиакриламид	-	41	36
Полиэтиленгликоль-5000	-	19	15
Поли- <i>N</i> -винилметилацетамид	90	-	

Учитывая экологическую и экономическую целесообразность применения полимеров в качестве экстрагентов, нами изучены двухфазные системы на основе блоксополимера «Плуроник». В табл. 2 приведены результаты межфазного распределения аскорбиновой кислоты и рибофлавина-моноклеотида при их однократной экстракции из водно-солевых растворов «Плуроником». При соотношении объемов фаз 10:2 для обоих витаминов наблюдается значительное повышение степени извлечения по сравнению с такими же условиями, приведенными в табл. 1. Однако наиболее эффективны системы при  $r = 10 : 4$  и концентрации полимера 0.08—0.09 г/см<sup>3</sup>. Степень извлечения витаминов достигает 90—91 %, что позволяет предположить практически полное количественное извлечение аналитов при двукратной экстракции.

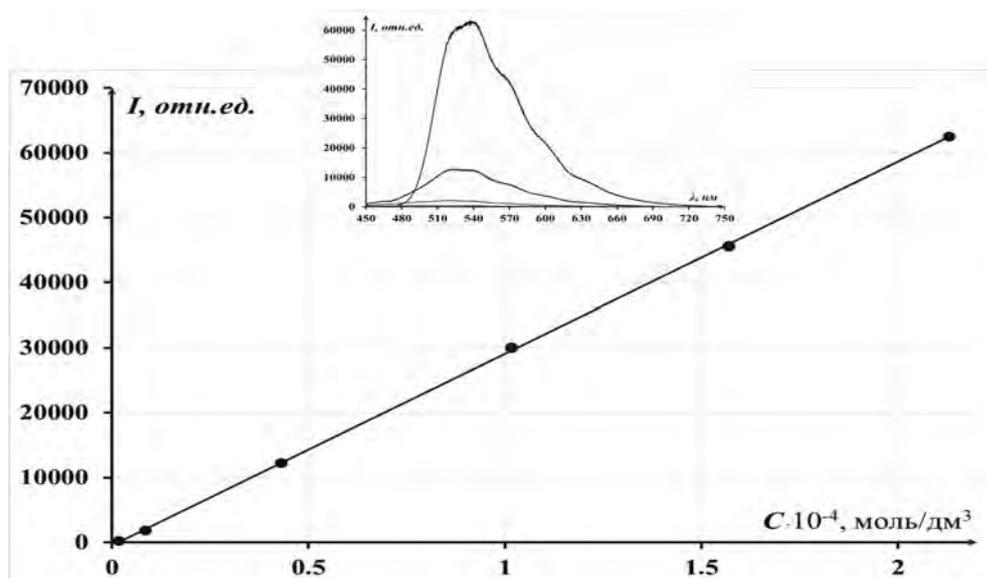
В работе также исследована возможность применения метода люминесцентной спектроскопии

для количественного определения витаминов после их экстракции [8]. Для этого были исследованы спектры флуоресценции водных, водно-солевых растворов витаминов С и В<sub>2</sub> и блоксополимера «Плуроник» до и после экстракции при возбуждении длиной волны 405 нм. Спектры люминесценции образцов регистрировали с использованием спектрофлуориметра, созданного на базе волоконно-оптического спектрометра USB4000-UV-VIS (OceanOptics).

На рис. 2, в частности, показан градуировочный график для определения витамина В<sub>2</sub> после экстракции, построенный на длинах волн, соответствующих максимумам спектров люминесценции водных растворов витамина В<sub>2</sub>. На вставке для наглядности представлены спектры люминесценции водных растворов витамина В<sub>2</sub> в зависимости от его концентрации. При этом наибольшим свечением обладает раствор с концентрацией витамина  $2.1 \cdot 10^{-4}$  моль/дм<sup>3</sup>.

**Таблица 2.** Результаты межфазного распределения аскорбиновой кислоты и рибофлавина при различном соотношении объемов фаз

Концентрация полимера, г/см <sup>3</sup>	Аскорбиновая кислота		Рибофлавина-мононуклеотид	
	<i>D</i>	<i>R</i> , %	<i>D</i>	<i>R</i> , %
1	2	3	4	5
<i>r</i> = 2				
0.05	12.3	71.3	7.2	59.0
0.06	18.5	78.7	9.4	65.2
0.07	24.3	82.9	13.8	73.4
0.08	32.8	86.7	18.5	78.7
0.09	29.6	85.5	17.7	77.9
<i>r</i> = 3				
0.04	5.9	66.2	5.3	63.8
0.05	8.1	72.9	7.8	72.2
0.06	9.6	76.2	9.7	76.4
0.08	14.2	82.5	11.6	79.5
0.09	12.1	80.1	9.4	75.8
<i>r</i> = 4				
0.04	18.6	88.2	14.6	85.3
0.05	19.3	88.5	18.1	87.8
0.06	22.3	89.9	20.3	89.0
0.08	23.4	90.3	22.8	90.1
0.09	25.8	91.2	24.6	90.7

**Рис. 2.** Градуировочный график для определения рибофлавина-мононуклеотида методом люминесцентной спектроскопии

Таким образом, в работе показана принципиальная возможность применения блоксополимеров для эффективного извлечения аскорбиновой кислоты и рибофлавина-моноклеотида из водно-солевых сред. Полученные количественные характеристики экстракции «Плуронином» значительно превышают аналогичные показатели для систем с органическими растворителями. Разработана методика определения витаминов С и В<sub>2</sub> с применением УФ-спектроскопии и люминесцентного анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках государственного задания 2468.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Segel L. D., Minten J. M., Schweighardt F. K. // *American J. Physiology*, 1992, № 263, pp. 730—739.
2. Alakhov V. Y., Moskaleva E. Y., Batrakova E. V., Kabanov A. V. // *Bioconjugate Chem.*, 1996, № 7, pp. 209—216.
3. Солдатенков А. Т., Колядина Н. М., Ле Туан Ань, Буянов В. Н. *Основы органической химии пищевых, кормовых и биологически активных добавок*. Москва, Химия, 2006, 278 с.
4. Коренман Я. И., Мокшина Н. Я., Зыков А. В. // *Журнал физической химии*, 2010, т. 84, № 3, с. 482—485.
5. Коренман Я. И., Зыков А. В., Мокшина Н. Я., Быковский Д. В., Шаталов Г. В. // *Журнал физической химии*, 2011, т. 85, № 11, с. 2142—2146.
6. Мокшина Н. Я., Савушкин Р. В., Селемев В. Ф., Ерина О. В., Скопинцева. В.Л. // *Известия ВУЗов. Химия и химическая технология*, 2004, т. 47, вып. 10, с. 120—122.
7. Мокшина Н. Я. *Экстракция аминокислот и витаминов*. Воронеж, Воронеж. гос. технол. акад., 2007, 246 с.
8. Лакович Д. *Основы флуоресцентной спектроскопии*. Москва, Мир, 1986, 496 с.

## INTERPHASE DISTRIBUTION OF ASCORBIC ACID AND RIBOFLAVIN IN THE EXTRACTION SYSTEMS BASED ON «PLURONIK P-123» BLOCK COPOLYMER

© 2015 G. V. Shatalov<sup>1</sup>, O. A. Pakhomova<sup>2</sup>, N. Y. Mokshina<sup>3</sup>, D. A. Minakov<sup>3</sup>, V. N. Feklin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Voronezh State University, Universitetskaya sq., 1, 394006 Voronezh, Russia

<sup>2</sup>Bunin Yelets State University, 28 Kommunarov st., 399740 Yelets, Lipetsk region, Russia

<sup>3</sup>Air Force Academy named after Professor N. E. Zhukovsky and Y. A. Gagarin, 54 a Old Bolsheviks st., 394064 Voronezh, Russia  
e-mail: moksnad@mail.ru

Received 23.06.2015

**Abstract:** Regularity of ascorbic acid and riboflavin interphase distribution in the extraction systems based on block copolymer are determined: concentration of polymer solution, ratio of phases volumes, nature of a salting-out agent. Quantitative characteristics of extraction at various ratios of phases volumes (distribution coefficients, recovery degree) are calculated, the most effective systems for vitamins extraction from water-salt solutions are recommended. The comparative analysis of extraction ability of solvents of different classes in relation to ascorbic acid and riboflavin is carried out. Quantitative definition of ascorbic acid and riboflavin after their extraction is carried out by methods of a spectrophotometry and the luminescence analysis for what ranges of absorption were studied and calibration schedules in both methods are constructed.

**Keywords:** extraction, ascorbic acid, riboflavin, block copolymer, spectrophotometry determination, luminescence analysis.

#### REFERENCES

1. Segel L. D., Minten J. M., Schweighardt F. K. *American J. Physiology*, 1992, no. 263, pp. 730—739.
2. Alakhov V. Y., Moskaleva E. Y., Batrakova E. V., Kabanov A. V. *Bioconjugate Chem.*, 1996, no. 7, pp. 209—216.
3. Soldatenkov A. T., Koljadina N. M., Le Tuan An', Bujanov V. N. *Osnovy organicheskoy himii pishhevyyh, kormovyh i biologicheskii aktivnyh dobavok* [Basics of organic chemistry of food, feed, and dietary supplements]. Moscow, Himija Publ., 2006, 278 p.

4. Korenman Ja. I., Mokshina N. Ja., Zykov A. V. *Zhurnal fizicheskoy himii* [Russian Journal of Physical Chemistry A], 2010, vol. 84, no. 3, pp. 482—485.
5. Korenman Ja. I., Zykov A. V., Mokshina N. Ja., Bykovskij D. V., Shatalov G. V. *Zhurnal fizicheskoy himii* [Russian Journal of Physical Chemistry A], 2011, vol. 85, no. 11, pp. 2142—2146.
6. Mokshina N. Ja., Savushkin R. V., Selemenev V. F., Erina O. V., Skopinceva V. L. *Izvestija VUZov. Himija i himicheskaja tehnologija*, 2004, vol. 47, no. 10, pp. 120—122.
7. Mokshina N. Ja. *Jekstrakcija aminokislot i vitaminov* [Extraction of amino acids and vitamins]. Voronezh, Voronezh. gos. tehnol. akad. Publ., 2007, 246 p.
8. Lakovich D. *Osnovy fluorescentnoj spektroskopii*. Moscow, Mir Publ., 1986, 496 p.

*Шаталов Геннадий Валентинович* — д. х. н., профессор, зав. кафедрой высокомолекулярных соединений и коллоидов, Воронежский государственный университет; тел.: +7(4732) 208956; e-mail: chhml158@chem.vsu.ru

*Shatalov Gennadiy V.* — Dr. Sci. (Chem.), Professor, Head of the Department of Polymer Science and Colloids, Voronezh State University; ph.: +7(4732) 208956, e-mail: chhml158@chem.vsu.ru

*Пахомова Оксана Анатольевна* — к. х. н., доцент кафедры химии и биологии, Елецкий государственный университет им. И. А. Бунина; e-mail: moksnad@mail.ru

*Pakhomova Oksana A.* — Cand. Sci. (Chem.), Assistant Professor of the Department of Chemistry and Biology, Eletski State University I. A. Bunin; e-mail: moksnad@mail.ru

*Мокишина Надежда Яковлевна* — д. х. н., доцент кафедры физики и химии, Военно-воздушная академия им. профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина; тел.: +7(4732) 588338; e-mail: moksnad@mail.ru

*Mokshina Nadezhda Y.* — Dr. Sci. (Chem.), Associate Professor, Department of Physics and Chemistry Air Force Academy after Professor N. E. Zhukovsky and Y. A. Gagarin; ph.: +7(4732) 588338, e-mail: moksnad@mail.ru

*Минаков Дмитрий Анатольевич* — к. ф.-м. н., доцент кафедры физики и химии, Военно-воздушная академия им. профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина; тел.: +7(4732) 255534; e-mail: minakov\_d\_a@mail.ru

*Minakov Dmitriy A.* — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Associate Professor, Department of Physics and Chemistry Air Force Academy after Professor N. E. Zhukovsky and Y. A. Gagarin; ph.: +7(4732) 255534; e-mail: minakov\_d\_a@mail.ru

*Феклин Виктор Николаевич* — к. ф.-м. н., доцент кафедры физики и химии, Военно-воздушная академия им. профессора Н. Е. Жуковского и Ю. А. Гагарина; тел.: +7(4732) 255534; e-mail: minakov\_d\_a@mail.ru

*Feklin Victor N.* — Cand. Sci. (Phys.-Math.), Associate Professor, Department of Physics and Chemistry Air Force Academy after Professor N. E. Zhukovsky and Y. A. Gagarin; ph.: +7(4732) 255534; e-mail: minakov\_d\_a@mail.ru