

РОЗРОБКА ТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ ЕКСТРАКТУ ІЗ КВІТОК ЦЕЛОЗІЇ ГРЕБІНЧАСТОЇ ШЛЯХОМ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ МАТЕМАТИЧНОГО ПЛАНУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТУ

Дейнека А. С., Журавель І. О.

Національний фармацевтичний університет, м.
Харків

Актуальність

Целозія гребінчаста (*Celosia cristata* (L.) Kuntze) належить до родини Амарантові (*Amaranthaceae* L.) і характеризується високою декоративністю завдяки своїм унікальним, яскравим суцвіттям [1-3]. Деякі науковці вважають її підвидом целозії сріблястої [3, 4].

Хімічний склад целозії гребінчастої, за даними літератури, представлений сапонінами, флавоноїдами, беталаїнами, амінокислотами [3, 5]. За даними китайських вчених, у траві целозії гребінчастої накопичуються аспарагін, гіалуронова кислота, дубильні речовини, флобатаніни, серцеві глікозиди, стероїди, вуглеводи, ліпіди, амінокислоти, алкалоїди целогенамід А, мороїдин, целозіан, цитрусин С, флавоноїди кристаїн і тлатланкуайн [4]. Насіння цієї рослини накопичує фенольні (5-гідрокси-7-метоксифлавоон, 5-метокси-6,7-метилендіоксифлавоон, 5-гідрокси-6,7-диметоксифлавоон, 5,7-диметоксифлавоон, кохлюфілін А та кемпферол) та стероїдні (стигмастерол, β-ситостерин), у тому числі специфічні сапоніни, які називаються целозинами А, В, С, D, кристастаном, амарантином, міраксантином V і семенозидом А [4, 6].

Целозія гребінчаста має широке використання у традиційній медицині. В Індії листя цієї рослини використовують при лікуванні запальних захворювань ШКТ, ротової порожнини та шкіри, гематологічних та гінекологічних хвороб, жовтяниці, гонореї, лихоманки, застуди, артриту [6]. Відвари з насіння цієї рослини корисні при захворюваннях крові, очей, печінки та є ефективним засобом при діареї та дизентерії [7]. Корені деяких видів целозії в країнах Далекосхідної Азії використовують при спазмах, гонореї та екземі. У Китаї настоями із червоних квіток та насіння целозії гребінчастої лікують гемороїдальні кровотечі, гематурію, лейкоорею, використовують при сильних менструальних кровотечах, болю в животі та остеопорозі [6].

Наукові дослідження, проведені закордонними вченими, показали, що для целозії гребінчастої характерний ряд фармакологічних активностей (протизапальна, імуностимулювальна, антиноцицептивна, протипухлинна, гепатопротекторна, протидіабетична, антиоксидантна, ранозагоювальна, протівірусна, антимікробна, антигельмінтна), за рахунок чого рослина має значний потенціал при лікуванні широкого спектру

захворювань [6, 8]. Індійські дослідники встановили, що етанольні екстракти із листя целозії сріблястої на 58,85 % зменшували карагеніновий набряк у мишей на рівні з препаратом порівняння індометацином [7]. Китайські дослідники встановили, що етанольний екстракт із листя целозії сріблястої у дозі понад 100 до 200 мг/кг пригнічував діарею, викликану рициновою олією, що перевищувало ефект друготропіну [6]. У досліджах *in vitro* було встановлено антибактеріальну активність етанольних екстрактів із листя целозії сріблястої стосовно *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Shigella* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Vibrio* sp., *Klebsiella* sp., та *Salmonella* sp [6]. Це підтверджує перспективність розробки нових лікарських засобів на основі сировини целозії гребінчастої.

Відомо, що ефективність процесу екстракції БАР із лікарської рослинної сировини значною мірою залежить від створених умов екстракції. На нього впливають різноманітні зовнішні та внутрішні чинники: ліпофільні та гідрофільні властивості екстрагенту, подрібненість сировини, співвідношення сировини й екстрагенту, температура, кратність та тривалість екстракції тощо [9-12].

Однак, підбір оптимальних умов, при яких досягається максимальний вихід БАР, вимагає проведення численних експериментів із почерговим варіюванням окремих факторів, що в свою чергу, є трудомістким, високоартісним процесом та не дозволяє оцінити взаємовплив усіх факторів на технологічний процес, а отже імовірно містить значні похибки. Статистичні методи планування експерименту дозволяють одночасно варіювати всіма факторами.

Зменшити число наукових досліджень, раціоналізувати, оптимізувати та інтенсифікувати їх і при цьому знизити похибку та отримати на виході максимально достовірні та науково обґрунтовані результати при мінімальних затратах дозволяє метод математичного планування експерименту. Практичне застосування такого підходу дозволяє прискорити та значно здешевити процес розробки ліків [9, 10, 12].

Мета дослідження

Метою роботи був підбір оптимальних умов одержання целозії гребінчастої квіток екстракту густого.

Матеріали і методи

Для проведення експерименту використовували повітряно-сухі, подрібнені квітки целозії гребінчастої. Сировину заготовляли у 2019-2021 р. р. у Харківській області.

Підбір оптимальних умов одержання екстракту із квіток целозії гребінчастої проводили методом математичного планування за допомогою програмного забезпечення PlanEXp B-D13.

Результати та їх обговорення

Результати попередніх досліджень динаміки накопичення БАР у сировині целозії гребінчастої [13], зокрема, флавоноїдів, які, за даними літератури відповідають за основні фармакологічні ефекти цієї рослини [7], показали, що найбільше їх накопичувалося у квітках. Тому для одержання лікарського засобу було обрано саме квітки целозії гребінчастої.

Аналіз джерел літератури показав, що найбільший вплив на вихід БАР із ЛРС мають такі фактори як екстрагент, температура та кратність екстракції, а також співвідношення сировини й екстрагента [9].

При виборі екстрагента опирались на результати фармакологічних досліджень корейських

вчених, які встановили, що вода та етанол є найменш токсичними [14], що спонукало провести пошук оптимального екстрагента серед водно-етанольних сумішей зі зростаючою концентрацією етанолу.

Для підбору оптимальних умов екстракції використовували метод математичного планування трьохфакторного експерименту. Як змінні чинники, що мають визначальний вплив на процес екстракції було обрано концентрацію етанолу, температуру екстракції та співвідношення сировини й екстрагента. Значення вихідних факторів встановлювали на верхньому, центральному та нижньому рівнях. Інтервали варіювання обраних факторів наведено у табл. 1.

Таблиця 1 Фактори та інтервали їх варіювання

Фактор	Нижній рівень (-1)	Основний рівень (0)	Верхній рівень (+1)	Інтервал варіювання
Концентрація етанолу (x ₁)	0	48	96	48
Температура екстракції (x ₂)	20	60	100	40
Співвідношення сировини й екстрагента (x ₃)	0,05	0,20	0,35	0,15

ля якісної оцінки побудованого математичного плану як вихідний параметр оптимізації використовували кількісний вміст флавоноїдів у витяжках із квіток целозії гребінчастої.

Визначення кількісного вмісту флавоноїдів у витяжках із квіток целозії гребінчастої визначали методом абсорбційної спектрофотометрії

Для забезпечення статистичної достовірності одержаних результатів проводили 10 дослідів за умов змінних факторів відповідно до матриці планування.

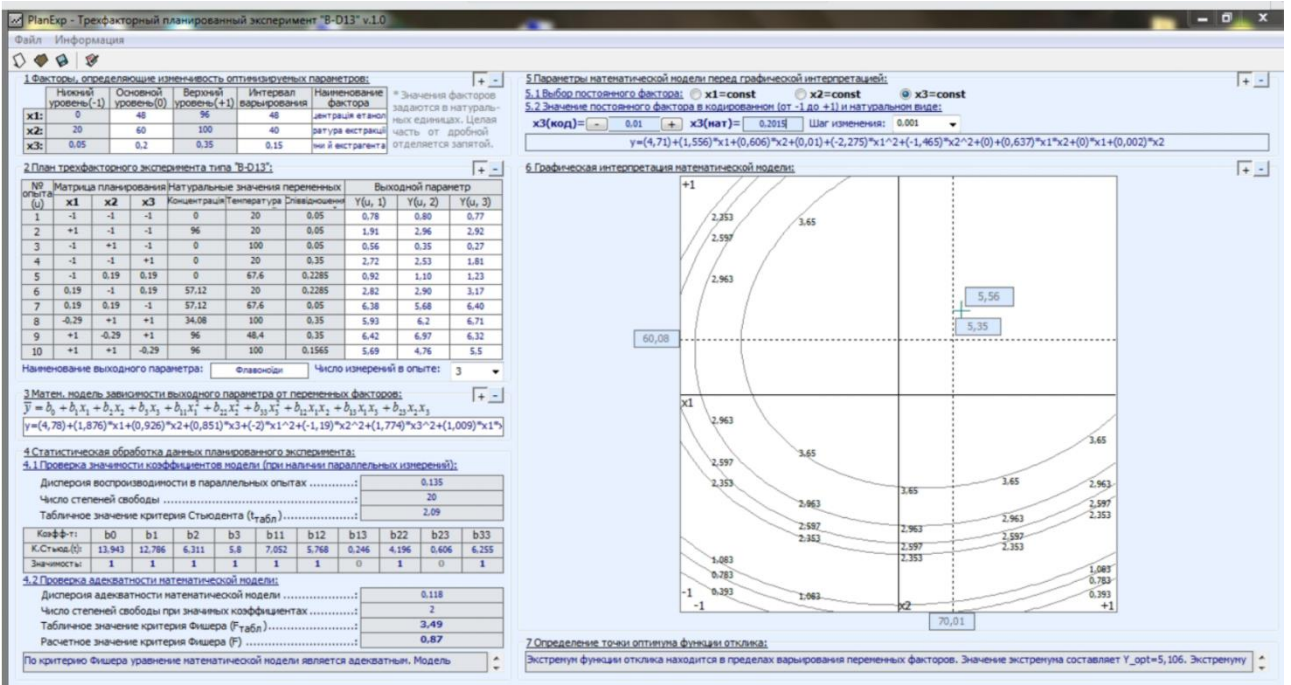


Рис. 1. Результати математичного планування за допомогою програмного забезпечення PlanEXp B-D13

Усі паралельні експерименти проводили у кратній повторюваності, при цьому величина

похибки була в межах 1-2 %. Матрицю планування трьохфакторного експерименту та вихідні параметри

дослідів представлено в табл. 2. Результати математичного планування за допомогою програмного забезпечення PlanEXp B-D13 проілюстровано на рис. 1

Таблиця 2 Матриця планування експерименту та вихідні параметри дослідів

Номер дослідів (u)	Матриця планування			Натуральні значення змінних			Вихідний параметр (вміст флавоноїдів, %)		
	x1	x2	x3	Концентрація етанолу	Температура екстракції	Співвідношення сировини й екстрагента	y(u, 1)	y(u, 2)	y(u, 3)
1	-1	-1	-1	0	20,0	0,05	0,78	0,80	0,77
2	+1	-1	-1	96,00	20,0	0,05	1,91	2,96	2,92
3	-1	+1	-1	0	100,0	0,05	0,56	0,35	0,27
4	-1	-1	+1	0	20,0	0,35	2,72	2,53	1,81
5	-1	0,19	0,19	0	67,6	0,22	0,92	1,10	1,23
6	0,19	-1	0,19	57,12	20,0	0,22	2,82	2,90	3,17
7	0,19	0,19	-1	57,12	67,6	0,05	6,38	5,68	6,40
8	-0,29	+1	+1	34,08	100,0	0,35	5,93	6,20	6,71
9	+1	-0,29	+1	96,00	48,4	0,35	6,42	6,97	6,32
10	+1	+1	-0,29	96,00	100,0	0,15	5,69	4,76	5,5

Для вираження функціональної залежності виходу флавоноїдів із квіток целозії гребінчастої від заданих чинників було розраховано коефіцієнти

регресії рівняння математичної моделі, які наведено у табл. 3

Таблиця 3 Коефіцієнти регресії рівняння математичної моделі

Умовне позначення	Найменування	Значення
b ₀	Вільний член	4,78
b ₁	Лінійна залежність фактору концентрації етанолу	1,876
b ₂	Лінійна залежність фактору температури екстракції	0,926
b ₃	Лінійна залежність фактору співвідношення сировини й екстрагента	0,851
b ₁₁	Квадратична залежність фактору концентрації етанолу	-2
b ₂₂	Квадратична залежність фактору температури екстракції	-1,19
b ₃₃	Квадратична залежність фактору співвідношення сировини й екстрагента	1,774
b ₁₂	Лінійна взаємодія факторів концентрації етанолу та температури екстракції	1,009
b ₁₃	Лінійна взаємодія факторів концентрації етанолу та співвідношення сировини й екстрагента	-0,043
b ₂₃	Лінійна взаємодія факторів температури екстракції та співвідношення сировини й екстрагента	0,106

Таким чином, загальне рівняння математичної моделі залежності виходу флавоноїдів від змінних факторів має вигляд:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3$$

З урахуванням коефіцієнтів регресії:

$$Y = (4,78) + (1,876) \times x_1 + (0,926) \times x_2 + (0,851) \times x_3 + (-2) \times x_1^2 + (-1,19) \times x_2^2 + (1,774) \times x_3^2 + (1,009) \times x_1 \times x_2 + (-0,043) \times x_1 \times x_3 + (0,106) \times x_2 \times x_3$$

За результатами математичного планування програмою було розраховано, що дисперсія відтворюваності у паралельних дослідах становила

0,135. При цьому, число ступенів свободи становило 20, а табличне значення критерію Стьюдента – 2,09.

Карта Парето (рис. 2) ілюструє статистичну значимість впливу лінійних та квадратичних чинників на процес екстракції флавоноїдів із квіток целозії гребінчастої. При порівнянні табличного та розрахункових значень критеріїв Стьюдента встановлено, що статистичну значимість мають фактори лінійної та квадратичної концентрації етанолу, температури екстракції та співвідношення сировини й екстрагента, а також лінійної взаємодії факторів концентрації етанолу та температури екстракції, концентрації етанолу та співвідношення сировини й екстрагента.

Для визначення адекватності запропонованої моделі були розраховані дисперсія адекватності

математичної моделі (0,118), число ступенів свободи при значущих коефіцієнтах (2), табличне (3,49) та розрахункове (0,87) значення критерію Фішера. За критерієм Фішера рівняння математичної моделі є адекватним, а модель придатна для вирішення промислових задач.

За результатами математичного планування екстремум функції відгуку знаходився у межах варіювання змінних факторів. Прогнозоване значення екстремуму функції відгуку становило $Y = 5,56\%$ при значеннях факторів концентрації етанолу 78,48 %, температурі екстракції 66,32 °C та співвідношенні сировини й екстрагента 0,2 (1 : 5). Графічне зображення функції відгуку при сталому значенні

фактору співвідношення сировини й екстрагента ($x_3 = \text{const} = 0,2$) представлено на діаграмі ліній сталого рівня на рис. 3. При сталому значенні фактору співвідношення сировини й екстрагента ($x_3 = \text{const} = 0,2$) рівняння математичної набувало вигляду:

$$Y = (4,78) + (1,876) \times x_1 + (0,926) \times x_2 + (-2) \times x_1^2 + (-1,19) \times x_2^2 + (1,009) \times x_1 \times x_2$$

Проте, враховуючи можливості проведення технологічного процесу екстракції у промислових умовах, досягти умов у точці екстремуму, які забезпечують максимальний вихід флавоноїдів, досить важко і вимагає додаткових економічних затрат.

КАРТА ПАРЕТО
статистичної значимості розрахункових t-критеріїв

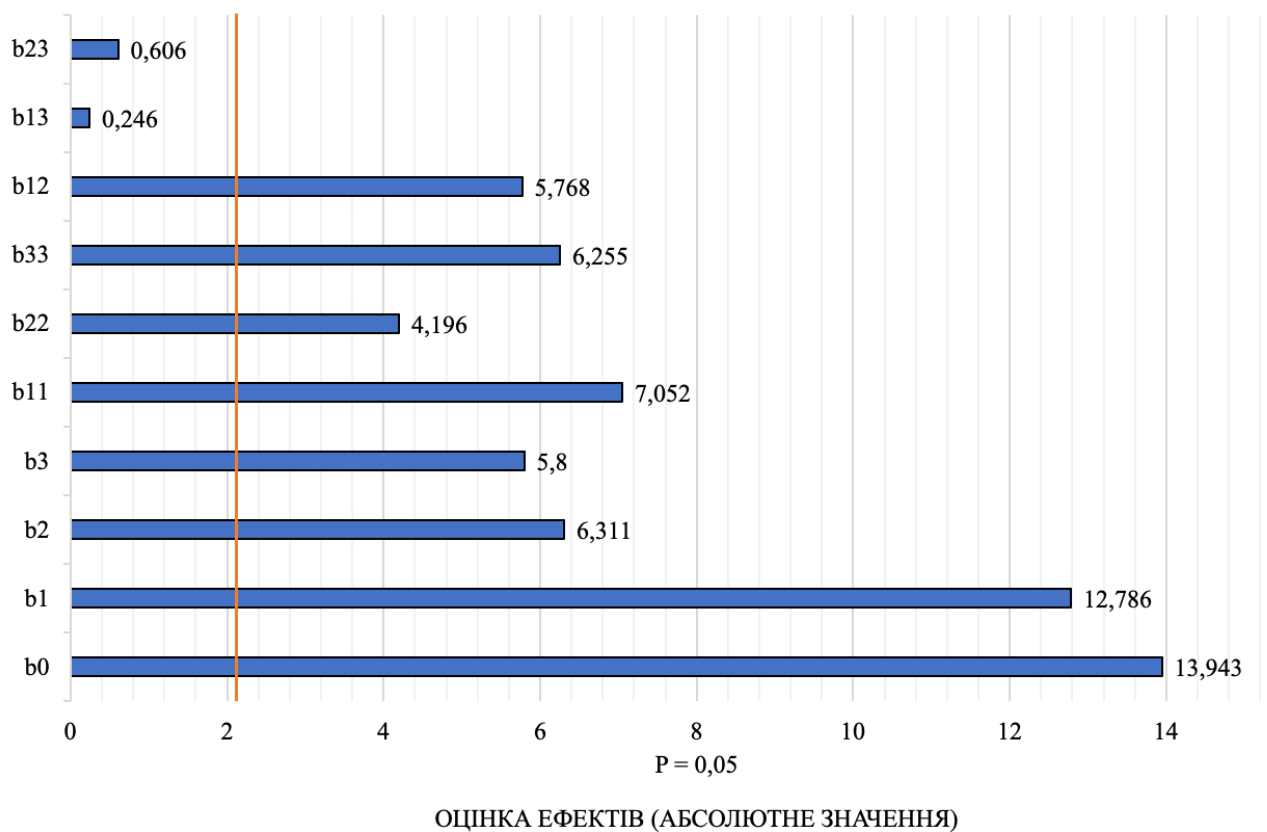


Рис. 2. Карта Парето значимості впливу факторів на вміст флавоноїдів у витяжках із квіток целозії гребінчастої

Тому, оптимальними умовами для одержання екстракту із квіток целозії гребінчастої було обрано концентрацію етанолу 70 %, температуру екстракції – 60 °C, співвідношення сировини й екстрагента – 0,2 (або 1 : 5). За таких умов, прогнозоване значення виходу флавоноїдів складало 5,35 %, що становило 96,22 % від максимального значення у точці екстремуму.

У лабораторних умовах було одержано 70 % етанольну витяжку із квіток целозії гребінчастої та визначено кількісний вміст флавоноїдів у них. При цьому, співвідношення сировини й екстрагента становило 1 : 5 та забезпечувалась температура

екстракції 60 °C. Результати експерименту показали, що на практиці за дотримання таких умов досягався вихід флавоноїдів із квіток целозії гребінчастої 5,02 %, що становило 93,83 % від прогнозованого значення виходу флавоноїдів. Крім того, було проведено визначення кількісного вмісту флавоноїдів у 70 % етанольних витяжках із квіток целозії гребінчастої, одержаних у результаті одно-, дво- та трикратної екстракції за заданих співвідношення сировини й екстрагента та температури екстракції. Результати показали, що вихід флавоноїдів із досліджуваної сировини при однократній екстракції становив $5,02 \pm 0,12\%$, при двократній – $5,11 \pm 0,13\%$, при трикратній – $5,19 \pm 0,13\%$. Оскільки, найбільший

вихід флавоноїдів спостерігали при застосуванні трикратної екстракції, то оптимальними умовами для одержання екстракту із квіток целозії гребінчастої було обрано трикратну екстракцію 70 % етанолом при

температурі 60 °С та співвідношенні сировини й екстрагента 0,2 (або 1 : 5).

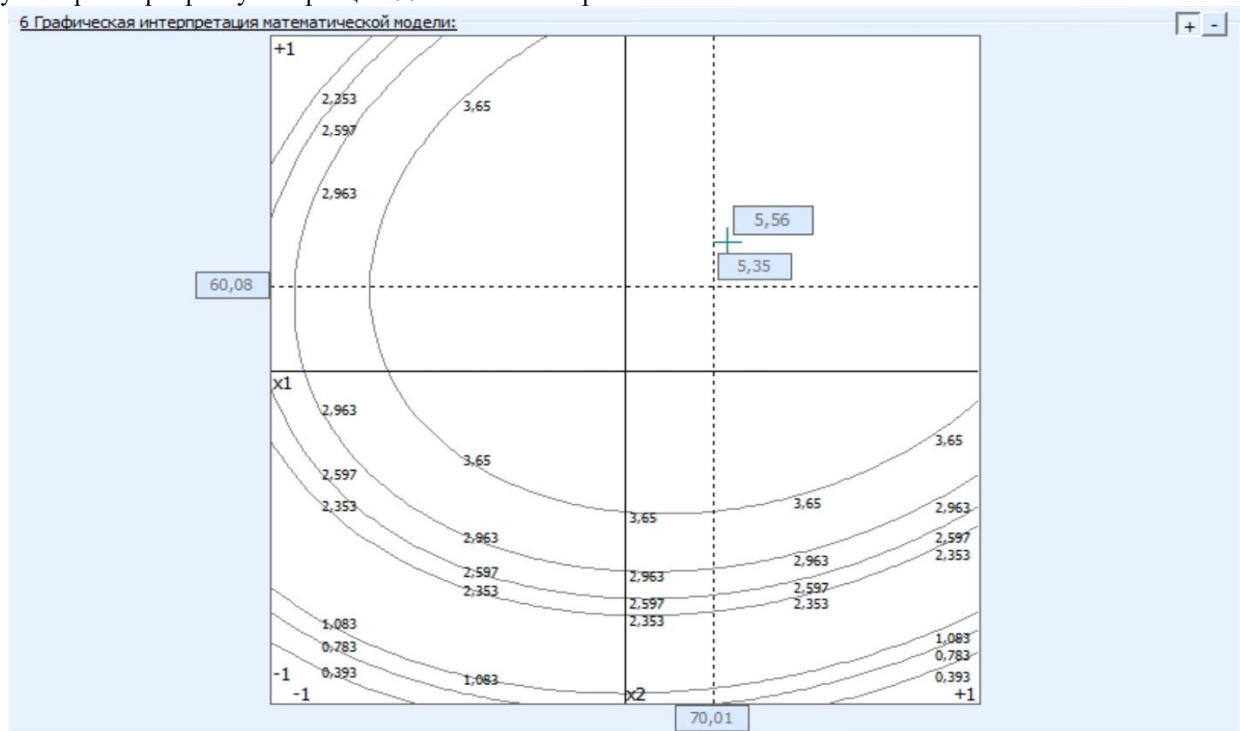


Рис. 3. Графічне зображення функції відгуку при сталому значенні фактору співвідношення сировини й екстрагента ($x_3 = \text{const} = 0,2$)

Висновки:

Методом математичного планування встановлено, що оптимальними умовами одержання екстракту із квіток целозії гребінчастої була трикратна екстракція 70 % етанолом при співвідношенні сировини й екстрагента 0,2 (або 1 : 5) та температури екстракції 60 °С. Дотримання запропонованих параметрів на практиці дозволяє екстрагувати із квіток целозії гребінчастої максимальну кількість флавоноїдів (5,19 %), що не значно відрізняється від максимального прогнозованого значення. Одержані результати експерименту будуть взяті за основу при розробці лікарських засобів на основі квіток целозії гребінчастої.

Development of technology for obtaining an extract from the flowers of *Celosia cristata* (L.) Kuntze by applying the method of mathematical planning of the experiment

Alina Deyneka, Iryna Zhuravel

Introduction. *Celosia cristata* (L.) Kuntze is one of the 60 members of the *Amaranthaceae* L. family and is characterized by high decorative effect. The chemical composition of this plant is represented by saponins, flavonoids, betalaines, amino acids, tannins, alkaloids. *Celosia cristata* (L.) Kuntze combed is widely used in traditional medicine. In East Asia, the roots, leaves, flowers and seeds of this plant are used in the treatment of gastrointestinal diseases, blood, eyes, liver, mouth and

skin, hematological and gynecological diseases and is an effective remedy for hemorrhoids, hematuria, leukorrhea, jaundice, gonorrhoea, eczema, fever, colds, arthritis, cramps, diarrhea and dysentery. Pharmacological studies conducted by foreign scientists have shown that *Celosia cristata* (L.) Kuntze is characterized by anti-inflammatory, immunostimulatory, antinoceptive, antitumor, hepatoprotective, antidiabetic, antioxidant, wound healing, antiviral, antimicrobial, antimicrobial, anti-inflammatory. This indicates the prospects for the development of new drugs based on raw cellophane. It is known that the efficiency of the process of extraction of BAS from medicinal plant raw materials largely depends on the created extraction conditions. However, the selection of optimal conditions under which the maximum yield of BAS is achieved, requires numerous experiments with alternating variation of individual factors, which in turn is a time-consuming, high-cost process and does not assess the impact of all factors on the process. The method of mathematical planning of the experiment allows to reduce the number of scientific researches, to rationalize, optimize and intensify them, at the same time to reduce the error and to obtain the most reliable and scientifically substantiated results at minimum costs. The practical application of this approach allows to speed up and significantly reduce the cost of drug development. **The aim of the work** was to select the optimal conditions for obtaining of *Celosia cristata* (L.) Kuntze flowers of dense extract. **Materials and methods.** For the experiment, air-dry, crushed *Celosia cristata* (L.) Kuntze flowers were used. Raw materials were harvested in 2019-2021 in the Kharkiv region. **Results and**

discussion. According to the results of mathematical planning, the extremum of the response function was within the range of variable factors. The predicted value of the extremum of the response function was 5.56% with values of ethanol concentration factors 78.48%, extraction temperature 66.32 ° C and the ratio of raw material and extractant 0.2 (1: 5). Since it is difficult to comply with the parameters of the extremum point in industrial conditions and requires additional economic costs, therefore, the optimal conditions for obtaining an extract from the flowers of *Celosia cristata* (L.) Kuntze were chosen ethanol concentration of 70%, extraction temperature – 60 ° C, raw material ratio – 0.2 (or 1: 5). Under such conditions, the predicted value of flavonoid yield was 5.35 %. In practice, the content of flavonoids in the extracts obtained under given conditions was equal to 5.02 %, which was 93.83 % of the maximum predicted value. To increase the yield of these BAS to 5.19 % allows the use of triple extraction. **Conclusions.** The method of mathematical planning showed that the optimal conditions for obtaining an extract from the flowers of *Celosia cristata* (L.) Kuntze were three times extraction with 70 % ethanol at a ratio of raw material and extractant 0.2 (or 1: 5) and extraction temperature 60 ° C, which provides maximum flavonoid yield – 5.19 %. The obtained results of the experiment will be taken as a basis for the development of drugs based on the flowers of *Celosia cristata* (L.) Kuntze.

Key words: *Celosia cristata* (L.) Kuntze, Amaranthaceae L., extraction, method of mathematical planning.

References

1. Mastuti R., Arumingtyas E. L. & Fatinah A. A. (2015). Genetic Diversity of *Celosia* Variants in East Java Based on Polyphenol Oxidase-PPO Genes. *Procedia Chemistry*, 14, 361-366. <http://dx.doi.org/10.1016/j.proche.2015.03.049>.
2. Muhallilin I., Aisyah S. I. & Sukma D. (2019). The diversity of morphological characteristics and chemical content of *Celosia cristata* plantlets due to gamma ray irradiation. *Biodiversitas*, 20 (3), 862-866. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d200333>.
3. Surse S. N., Shrivastava B., Sharma P., Sharma J. & Gide P. S. (2014). Pharmacognostic Standardisation of Whole Plant of *Celosia argentea*, var. *cristata* (L.). *International Journal for Pharmaceutical Research Scholars*, 3 (3), 387-392. https://www.researchgate.net/publication/268567928_Pharmacognostic_Standardisation_of_Whole_Plant_of_Celosia_argentea_var_cristata_L.
4. Gaibimei P., Yousuf O., Singh A. & Devi N. M. (2018). A study on phytochemical screening of *Celosia argentea* var. *cristata* inflorescence extract. *The Pharma Innovation Journal*, 7 (10), 284-287. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2018/vol7issue10/PartE/7-10-20-652.pdf>
5. Varadharaj V. & Muniyappan J. (2017). Phytochemical and Phytotherapeutic Properties of *Celosia* species - A Review. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 9 (6). P. 820-825. <https://doi.org/10.25258/phyto.v9i6.8185>.
6. Divya B. J., Sravani M. J., Chandana J. H., T. Sumana & Thyagaraju K. (2019). Phytochemical and phytotherapeutic activities of *celosia argentea*: a review. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 8 (3), 488-505. <https://doi.org/10.20959/wjpps20193-13312>.
7. Bhujbal L.S., Chitlange S. S., Suralkar A. A., Shinde D. B. & Patil M. J. (2008). Antiinflammatory activity of an isolated flavonoid fraction from *Celosia argentea*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2 (3), 052-054 https://www.researchgate.net/publication/228993086_Anti-inflammatory_activity_of_an_isolated_flavonoid_fraction_from_Celosia_argentea_Linn
8. Sayeeda R., Thakura M. & Gani A. (2020). *Celosia cristata* Linn. flowers as a new source of nutraceuticals- A study on nutritional composition, chemical characterization and in-vitro antioxidant capacity. *Heliyon*, 6 (12), 05792-05797. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05792>
9. Bandura V. M. & Kolanovska L. M. (2014). Analysis of modern methods and factors affecting the process of extracting. *Collection of scientific works of Vinnytsia National Agrarian University*, 2 (85), 130-135. [in Ukrainian]. <http://socrates.vsau.edu.ua/repository/getfile.php/16643.pdf>
10. Gureyeva S. N. (2012). The use of methods of mathematical planning for the selection of the optimum composition of the polymer shell for tablets «Antral». *Farmatsevtichnyi zhurnal*, 2, 69-72. [in Ukrainian]. http://www.irbis-nbuv.gov.ua/cgi-bin/irbis_nbuv/cgiirbis_64.exe?I21DBN=LINK&P21DBN=UJRN&Z21ID=&S21REF=10&S21CNR=20&S21STN=1&S21FMT=ASP_meta&C21COM=S&S21P03=FILEA=&S21STR=pharmazh_2012_2_11
11. Kyslychenko O. A., Protska V. V. & Zhuravel I. O. (2018). Selection of optimal conditions for the development of technology for obtaining 50% ethanol extract of carrot fruits using mathematical planning method. *Phytotherapy. Annals*, 4, 67-71. [in Ukrainian]. http://www.phytotherapy.vernadskyjournals.in.ua/journal/2018/4/4_2018.pdf
12. Ruban O. A., Kolisnyk T. Ye. & Slipchenko G. D. (2018). Application of experimental design method in optimization of composition and technology for matrix tablets containing *Vaccinium myrtillus* leaf dry extract. *Pharmaceutical review*, 2, 41-47. [in Ukrainian]. <https://ojs.tdmu.edu.ua/index.php/pharm-chas/article/view/9003/8242>
13. Deyneka A. S., Protska V. V. & Zhuravel I. O. (2021). Study of the qualitative composition and determination of the quantitative content of flavonoids in the raw material of *Celosia cristata*. *PLANTA+. science, practice and education: abstr. International scientific-practical conference* (19 February 2021, Kyiv), 73-74. [in Ukrainian]. <https://dspace.nuph.edu.ua/bitstream/123456789/24744/1/PLANTA%2B19.02.2021.pdf>
14. Joshi D. R. & Adhikari N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 28(3), 1-18. DOI: 10.9734/jpri/2019/v28i330203