

© Коллектив авторов, 2008

Д. В. Демченко, Ю. Д. Папок, А. Б. Легостева

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ЖИДКОГО ЭКСТРАКТА НА ОСНОВЕ ЛИСТЬЕВ ЧЕРНИКИ И ЖЕНЬШЕНЯ

Санкт-Петербургская государственная химико-фармацевтическая академия, Санкт-Петербург

При разработке технологии противодиабетического препарата на основе листьев женьшеня и черники в форме жидкого экстракта исследованы методы экстракции — перколяция, а также реперколяция с делением сырья на неравные части, как методы, широко используемые в технологии жидких экстрактов. При изучении способа реперколяции с делением сырья на неравные части осуществлена оптимизация с использованием математического метода планирования экспериментов по Боксу-Уилсону. Проведена стандартизация по ряду основных показателей жидкого экстракта.

В последние годы в мире отмечается тенденция к увеличению заболеваемости сахарным диабетом. В большинстве стран мира им болеют примерно 3 % населения. Как причина смертности и инвалидизации населения диабет занял третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1].

В настоящее время арсенал противодиабетических лекарственных средств достаточно ограничен. Применение синтетических химических препаратов для лечения инсулиннезависимого диабета (диабет 2 типа) сопровождается побочными действиями на организм человека. В связи с чем совместное использование синтетических химических лекарственных средств и фитопрепаратов, либо одних фитохимических препаратов позволит снизить побочные эффекты при лечении этого заболевания.

Существует целый ряд лекарственных растений, извлечения из которых проявляют гипогликемические лечебные свойства. Представителями таких лекарственных растений являются черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) и женьшень (*Panax ginseng* C. A. Meу.).

Еще с давних времен люди использовали отвар из листьев черники для лечения сахарного диабета. В настоящее время побеги черники входят в состав таких противодиабетических сборов, как “Арфазетин” и “Мирфазин” [2].

Фармакологические исследования прошлых лет показали, что ряд панаксозидов женьшеня стимулируют синтез инсулина в  $\beta$ -клетках поджелудочной железы у мышей как с индуцированным, так и с генетически детерминированным диабетом [3, 4]. Но массовое применение этого растения в фитопрепаратах ограничено прежде всего сырьевой базой. Для ее увеличения целесообразно использовать листья женьшеня, которые составляют около 50 % биомассы этого ценного растения. Листья женьшеня по данным ранее проведенных исследований содержат до 8 % панаксозидов, что превосходит их содержание в традиционно применяемом корне женьшеня [5]. В настоящее время на основе листьев женьшеня производят препарат “Фолигин” [6]. Согласно [7] это лекарственное средство помимо основного стимулирующего эффекта обладает выраженной гипогликемической инсулиноподобной активностью.

Цель работы — создание противодиабетического препарата на основе листьев женьшеня и черники в форме жидкого экстракта и его стандартизация.

### Экспериментальная часть

В качестве объектов исследования использованы листья черники, собранные в Ленинградской области, и листья женьшеня, собранные в Приморском крае.

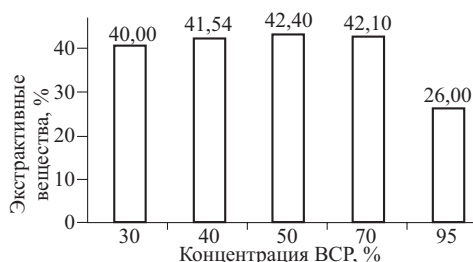


Рис. 1. Экстрактивные вещества, извлекаемые из композиции листьев черники и женьшеня в зависимости от концентрации водно-спиртового раствора (ВСП)

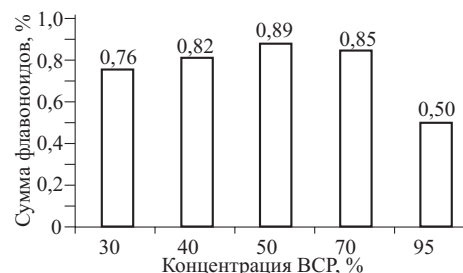


Рис. 2. Сумма флавоноидов (в пересчете на кверцетин), извлекаемых из композиции листьев черники и женьшеня в зависимости от ВСП

## Матрица планирования и результаты эксперимента

Опыт	Факторы эксперимента						$y_i, \%$			$\bar{y}_i, \%$			Ду		
	$x_0$	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$	$x_5$	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
1	+	-	+	-	+	-	26,32 28,88	9,43 9,95	0,511 0,533	27,60	9,69	0,522	1,28	0,26	0,011
2	+	+	+	-	-	+	19,38 20,66	7,21 7,71	0,349 0,381	20,02	7,46	0,365	0,64	0,25	0,016
3	+	-	-	-	-	+	23,47 25,27	8,91 9,39	0,465 0,475	24,37	9,15	0,470	0,90	0,24	0,005
4	+	+	-	-	+	-	15,08 17,38	5,77 6,17	0,225 0,245	16,23	5,97	0,235	1,15	0,20	0,010
5	+	-	+	+	-	-	26,22 27,42	9,17 9,67	0,517 0,527	26,82	9,42	0,522	0,60	0,25	0,005
6	+	+	+	+	+	+	20,21 22,71	7,46 7,88	0,322 0,356	21,46	7,67	0,339	1,25	0,21	0,017
7	+	-	-	+	+	+	25,21 26,97	9,10 9,62	0,484 0,508	26,09	9,36	0,496	0,88	0,26	0,012
8	+	+	-	+	-	-	14,28 15,98	4,92 5,30	0,246 0,276	15,13	5,11	0,261	0,85	0,19	0,015

Здесь и в табл. 2, 3: 1\* — сухой остаток; 2\* — сумма дубильных веществ; 3\* — сумма флавоноидов

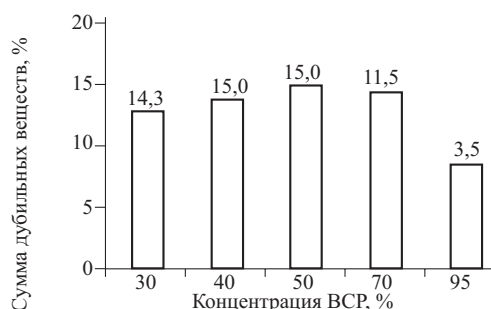


Рис. 3. Сумма дубильных веществ (в пересчете на танин), извлекаемых из композиции листьев черники и женьшеня в зависимости от концентрации ВСП

Установлены числовые показатели для листьев женьшеня (в соответствии с ФСП 42-0166-047-500) [5], при

этом методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в листьях женьшеня обнаружено не менее 8 панаксозидов, а спектрофотометрическим методом установлено, что содержание суммы панаксозидов составляет  $8,43 \pm 0,37 \%$ .

Для листьев черники, которые не являются официальным сырьем, числовые показатели определены согласно методикам Государственной фармакопеи XI [8]. Качественный анализ суммы флавоноидов в листьях черники проводили методом ТСХ. По результатам хроматографического анализа обнаружено 3 флавоноида, один из которых идентифицирован как кверцетин. Количественно сумму флавоноидов определяли спектрофотометрически, по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, при длине волны 425 нм, содержание суммы флавоноидов (в пересчете на кверцетин) составляет  $0,89 \pm 0,04 \%$ . Также для ли-

## Уравнения регрессии и их математические параметры

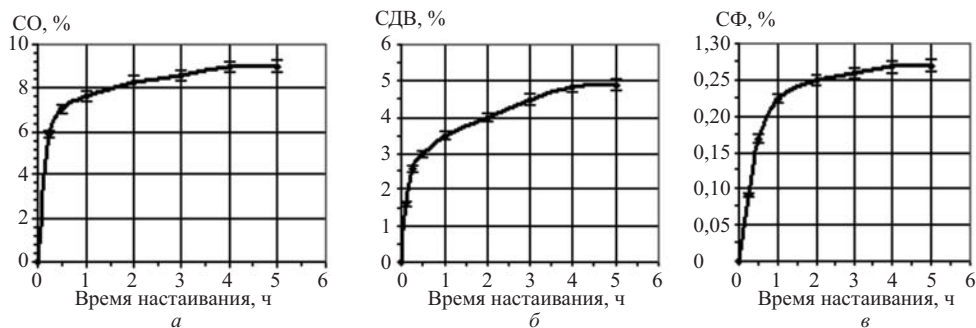
Опыт	$(y_i - y_i)^2$			$S_i^2$			$\bar{y}_i$			$(\bar{y}_i - \bar{y}_i)^2$		
	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
1	1,638	0,0676	$1,21 \cdot 10^{-4}$	3,276	0,1352	$2,42 \cdot 10^{-4}$	27,98	9,56	0,522	0,144	0,017	0
2	0,410	0,0625	$2,56 \cdot 10^{-4}$	0,820	0,1250	$5,12 \cdot 10^{-4}$	19,97	7,56	0,352	0,002	0,010	$1,69 \cdot 10^{-4}$
3	0,810	0,0576	$0,25 \cdot 10^{-4}$	1,620	0,1152	$0,50 \cdot 10^{-4}$	24,46	9,26	0,482	0,008	0,012	$1,44 \cdot 10^{-4}$
4	1,320	0,0400	$1,00 \cdot 10^{-4}$	2,264	0,0800	$2,00 \cdot 10^{-4}$	16,45	5,54	0,248	0,048	0,185	$1,69 \cdot 10^{-4}$
5	0,360	0,0625	$0,25 \cdot 10^{-4}$	0,720	0,1250	$0,50 \cdot 10^{-4}$	27,98	9,56	0,522	1,345	0,020	0
6	1,560	0,0441	$2,89 \cdot 10^{-4}$	3,120	0,0882	$5,78 \cdot 10^{-4}$	19,97	7,56	0,352	2,220	0,012	$1,69 \cdot 10^{-4}$
7	0,770	0,0676	$1,44 \cdot 10^{-4}$	1,540	0,1352	$2,88 \cdot 10^{-4}$	24,46	9,26	0,482	2,656	0,010	$1,96 \cdot 10^{-4}$
8	0,720	0,0361	$2,25 \cdot 10^{-4}$	1,440	0,0722	$4,50 \cdot 10^{-4}$	16,45	5,54	0,248	1,740	0,185	$1,69 \cdot 10^{-4}$
										8,173	0,450	$10,16 \cdot 10^{-4}$

Уравнения регрессии:

$$1) y_1 = 22,215 - 4,005x_1 + 1,76x_2 + 0,16x_3 + 0,63x_4 + 0,77x_5;$$

$$2) y_2 = 7,98 - 1,43x_1 + 0,58x_2 - 0,09x_3 + 0,19x_4 + 0,43x_5;$$

$$3) y_3 = 0,401 - 0,101x_1 + 0,036x_2 + 0,003x_3 - 0,003x_4 + 0,016x_5.$$



**Рис. 4.** Кинетические кривые настаивания по сухому остатку (СО) (а); по сумме дубильных веществ (СДВ) в пересчете на танин (б); по сумме флавоноидов (СФ) в пересчете на кверцетин (в)



**Рис. 5.** Кинетические кривые вытеснения по сухому остатку (СО) (а); по сумме дубильных веществ (СДВ) в пересчете на танин (б); по сумме флавоноидов (СФ) в пересчете на кверцетин (в)

ствьев черники титрометрическим методом определяли сумму дубильных веществ (в пересчете на танин) составляет  $15,01 \pm 0,23$  % [8].

Для создания противодиабетического препарата — жидкого экстракта — в соответствии с фармакологическими рекомендациями предложена композиция листьев черники и женьшеня. Для смеси сырья определены такие технологические показатели, как сыпучесть, насыпная масса, влагопоглощение, средний диаметр частиц [9].

Технологические показатели: насыпная масса смеси листьев черники и женьшеня  $0,12 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>; сыпучесть  $0,061 \pm 0,004$  г/с; средний диаметр частиц 1,06 мм; коэффициент поглощения сырья (водой —  $4,00 \pm 0,09$ ; 50 % этиловым спиртом —  $3,80 \pm 0,06$ ).

В ходе вопроса выбора растворителя для извлечения суммы биологически активных веществ (БАВ) из листьев черники и женьшеня при получении жидкого экстракта руководствовались тем, что экстрагент должен

максимально извлекать сумму БАВ и минимально — балластные вещества, обеспечивать бактерицидность и стабильность препарата. Нами изучены спирт и спирто-водные растворы различных концентраций, так как основные БАВ (фенольные соединения, панаксозиды) хорошо в них растворимы.

Исследования количеств извлекаемых экстрактивных веществ, флавоноидов, дубильных веществ из листьев женьшеня и черники (рис. 1 – 3) показывают, что они для всех изучаемых растворителей довольно близки и находятся в пределах погрешности эксперимента. Исключение составляют лишь данные для 95 % этилового спирта, что обусловлено спецификой свойств экстрагируемых БАВ.

В результате проведенных экспериментов в качестве экстрагента выбран 50 % водно-спиртовой раствор, посредством которого извлекается значительное количество БАВ (рис. 1 – 3), обладающих, по предварительным фармакологическим исследованиям, наибольшей

Таблица 3

**Критерии для проверки воспроизводимости и адекватности проведенных экспериментов**

$\Sigma S_i^2$			$G_p, G_p \leq G_T, G_T = 0,6798$			$S_{\text{воспр}}^2$			$S_{\text{ад}}^2$			$F_p, F_p \leq F_T, F_T = 3,7$		
1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*	1*	2*	3*
15,176	0,876	$2,37 \cdot 10^{-3}$	0,216	0,1543	0,244	1,897	0,1095	$2,96 \cdot 10^{-4}$	3,269	0,225	$5,08 \cdot 10^{-4}$	1,72	2,05	1,72

Уравнения регрессии приняты вид:

- 1)  $y_1 = 22,215 - 4,005x_1 + 1,76x_2$
- 2)  $y_2 = 7,98 - 1,43x_1 + 0,58x_2 + 0,43x_3$
- 3)  $y_3 = 0,401 - 0,101x_1 + 0,036x_2 + 0,016x_3$

гипогликемической активностью, в сравнении с суммой БАВ, экстрагируемой другими растворителями.

При разработке технологии жидкого экстракта исследованы методы экстракции — перколяция, а также реперколяция с делением сырья на неравные части, как методы, широко используемые в технологии жидких экстрактов.

С целью определения оптимальных параметров экстрагирования методом перколяции изучена кинетика процессов настаивания и вытеснения по сумме дубильных веществ, по сумме флавоноидов и сухому остатку.

В соответствии с построенными кинетическими кривыми зафиксировано, что при настаивании равновесие в системе растительный материал — экстрагент наступает через 4,5 ч, а в случае вытеснения через 5 ч достигается полнота истощения сырья по БАВ (рис. 4–5). Выход по действующим веществам составляет порядка 90 %.

При экстрагировании сырья методом перколяции концентрированное извлечение оставляют, а разбавленное сгущают в условиях вакуума при 60 °С, объединяют с ранее произведенным концентрированным, добавляют чистый экстрагент до соотношения сырье — извлечение (1:1) и очищают отстаиванием при 5 °С в течение 2 сут с последующей фильтрацией.

При изучении способа реперколяции с делением сырья на неравные части осуществляли его оптимизацию, используя математический метод планирования экспериментов по Боксу-Уилсону. Для сокращения числа опытов применяли математическое планирование методом дробного факторного эксперимента при  $k = 5$ ,  $p = 2$ , то есть, когда количество опытов составляет 8.

В связи с тем, что на полноту и скорость процесса экстракции суммы БАВ из листьев черники и женьшеня влияет целый ряд факторов, которые являются регулируемыми и наиболее значимыми в технологии жидкого экстракта методом реперколяции, то выбраны следующие:

- $x_1$  — средний размер частиц;
- $x_2$  — продолжительность настаивания;
- $x_3$  — время, затрачиваемое на процесс вытеснения в 1-м экстракторе;
- $x_4$  — время, затрачиваемое на процесс вытеснения во 2-м экстракторе;
- $x_5$  — время, затрачиваемое на процесс вытеснения в 3-м экстракторе.

Предварительно определяя значение среднего геометрического диаметра частиц узкой фракции, рассчитываем величину среднего диаметра частиц  $d_{cp}$  по формуле Козени. Предварительные результаты изучения кинетики экстракции 50 % этиловым спиртом положены в основу выбора диапазона варьирования времени настаивания — от 1 до 4 ч. Время, затрачиваемое на вытеснение суммы БАВ, изменяли в 1-м перколяторе от 1 до 2 ч, во 2-м перколяторе — от 2 до 4 ч и в 3-м перколяторе — от 4 до 8 ч. Экстрагирование проводили по американской методике с делением сырья на неравные части [9]. В опытах использовали навески сы-

рья 50, 30 и 20 г в 1-м, 2-м и 3-м перколяторах соответственно и перколяторы объемом 400 мл диаметром 65 мм.

С целью определения коэффициентов уравнения регрессии строили матрицу планирования (с закодированными значениями факторов), основываясь на которой осуществляли эксперименты (табл. 1). Результаты исследований представлены в табл. 1–3.

Полученное извлечение очищают отстаиванием, при 5 °С в течение 2 сут с последующей фильтрацией. Выход по действующим веществам составляет 80 %.

Таким образом, в итоге проведенных опытов и статистической обработки полученных данных с применением математического метода оптимального планирования экспериментов установлено, что не все выбранные факторы оказались значимыми. В результате определено, что наибольшее влияние на выход суммы БАВ оказывали средний диаметр частиц и время настаивания.

Показатели качества жидкого экстракта из листьев черники и женьшеня: органолептические свойства — жидкость коричневого цвета со своеобразным запахом, сладковато-горького вкуса; качественная реакция на дубильные вещества с раствором железоммониевых квасцов — образование черно-зеленого окрашивания; качественная реакция на дубильные вещества с 1 % раствором желатина — образование мути; качественный анализ суммы флавоноидов проводили методом ТСХ на пластинах “Sorbfil”, в системе растворителей бутанол — уксусная кислота — вода в соотношении 60:20:20. По результатам хроматографического анализа обнаружено 3 флавоноида в виде пятен желтого цвета с  $R_f$  0,6; 0,67; 0,79, пятно с  $R_f$  0,79 соответствует пятну стандарта кверцетина; ТСХ, на панаксозиды —  $R_f$  от 0,2 до 0,7 обнаружено 8 пятен сиреневого цвета. Количественно сумму флавоноидов обнаруживали спектрофотометрически по реакции комплексообразования с алюминия хлоридом, при длине волны 425 нм содержание суммы флавоноидов (в пересчете на кверцетин) составляет  $0,79 \pm 0,03$  %; содержание суммы дубильных веществ титриметрическим методом в пересчете на танин —  $13,97 \pm 0,22$  %; содержание суммы панаксозидов спектрофотометрическим методом (после очистки экстракта на колонке с окисью алюминия) в пересчете на эргокальциферол —  $0,29 \pm 0,02$  %; сухой остаток —  $35,23 \pm 0,27$  %; содержание спирта этилового —  $46,70 \pm 0,31$  %; тяжелые металлы  $< 0,01$  %.

Следует отметить, что в промышленности возможно применение как метода перколяции, так и реперколяции с делением сырья на неравные части. Каждый из них имеет свои достоинства (метод перколяции — высокий выход по действующим веществам, больший градиент концентрации, малые временные затраты, меньшее количество балластных веществ; метод реперколяции — малые количества экстрагента, отсутствие термообработки, меньшие материальные и энергозатраты) и применим в зависимости от возможностей предприятия.

Таким образом, в результате проделанной работы нами предложены 2 технологии жидкого экстракта. Проведена стандартизация по ряду основных показателей жидкого экстракта. Разработанная технология жидкого экстракта и его стандартизация позволяет в дальнейшем приступить к более глубоким фармакологическим исследованиям его гипогликемического действия.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Д. С. Молоковский, В. В. Давыдов, М. Д. Хегай, *Растит. ресурсы*, **38**(4), 15 – 28 (2002).
2. Л. В. Пастушенков, *Растения — друзья здоровья*, Лениздат, Ленинград (1989).
3. М. Kimura, I. Waki, T. Chujo, T. Kikushi, *J. Pharm. Dyn.*, **4**(6), 410 – 417 (1981).

4. I. Waki, H. Kyo, M. Yasuda, M. Kimura, *J. Pharm. Dyn.*, **5**(8), 547 – 554 (1982).
5. А. Б. Легостева, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Ленинград (1989).
6. ФСП 42-0166-04-7400. *Настойка из листьев женьшеня*, “Фолигин”, (2000).
7. Д. С. Молоковский, О. Д. Барнаулов, *Растит. ресурсы*, **22**(3), 387 – 393 (1986).
8. Д. В. Демченко, А. Б. Легостева, *Материалы IX Международного съезда “Фитофарм 2005” и конференции молодых ученых Европейского фитохимического общества “Растения и здоровье”*, Санкт-Петербург (2005), сс. 735 – 739.
9. В. Л. Багирова, В. А. Северцев (ред.), *Настойки, экстракты, эликсиры и их стандартизация*, СпецЛит, Санкт-Петербург (2001).

Поступила 13.11.06

## DEVELOPMENT OF LIQUID EXTRACT BASED ON GINSENG AND BILBERRY LEAVES

D. V. Demchenko, Yu. D. Papok, and A. B. Legosteva

St. Petersburg State Chemico-Pharmaceutical Academy, St. Petersburg, Russia

The number of diabetes patients continuously increases. Combined application of synthetic drugs and phytopreparations can decrease the negative side effect of drugs. The aim of this study was to create a new antidiabetic drug in the form of a liquid extract based on dry bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and ginseng leaves. Quantification of flavonoids in bilberry leaves was carried out using a spectrophotometric method (425 nm), while tannins were determined titrimetrically. Extraction was performed with a 50 % aqueous ethanol solution, which isolated a maximum amount of principal active substances (polyphenols, ginsenosides). The optimum characteristics of extraction were determined: time of infusion, 4.5 h; time of displacement, 5 h. Characteristics of the liquid extract are as follows: brown fluid with singular odor, bittersweet; the content of ethanol,  $46.70 \pm 0.31\%$ ; the content of solid residues,  $35.23 \pm 0.27\%$ . The content of tannins qualitatively determined using the reaction with  $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (development of a dark-green color) and with 1% gelatin solution (formation of feculence) was  $13.97 \pm 0.22\%$ . The content of flavonoids determined by TLC (silica gel; butanol : acetic acid : water, 60 : 20 : 20; 3 spots of flavonoids) was  $0.79 \pm 0.03\%$ . The content of panaxozides determined by TLC (silica gel; butanol : ethanol : 25% liquid ammonia, 9 : 2 : 5; 8 spots of panaxozides) was  $0.29 \pm 0.02\%$ .