

И. М. Смолякова<sup>1</sup>, В. Ю. Андреева<sup>1</sup>, Г. И. Калинкина<sup>1</sup>,  
С. Н. Авдеенко<sup>2</sup>, П. П. Щетинин<sup>1</sup>

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ И МЕТОДИКИ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСТРАКТА МАНЖЕТКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

<sup>1</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

<sup>2</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, Россия

Разработана рациональная технология получения экстракта манжетки методом многоступенчатого противоточного экстрагирования и методика стандартизации экстракта по флавоноидам.

**Ключевые слова:** манжетка обыкновенная, технология получения, жидкий экстракт, методика стандартизации, флавоноиды.

Манжетка обыкновенная — *Alchemilla vulgaris* L.s.l., семейство Rosaceae, многолетнее травянистое растение, распространена практически по всей Европе, в России — на большей части европейской территории и в Сибири, за исключением самых южных ее областей. По литературным данным в надземной части манжетки обыкновенной содержится комплекс разнообразных биологически активных веществ (БАВ), среди которых преобладают вещества фенольной природы (до 9,6 % в зависимости от фазы развития и места сбора растения): флавоноиды, кумарины и фенолкарбоновые кислоты, а также полисахариды (до 23 %). Флавоноиды представлены преимущественно лютеолин-7-глюкозидом, лютеолином, кверцетином, апигенином, рутином, апигенин-7-глюкозидом, кемпферолом [1, 2].

Трава манжетки широко используется в народной медицине разных стран в качестве отхаркивающего, противовоспалительного, противодиабетического, диуретического, ангиопротекторного средства; для улучшения обмена веществ, при атеросклерозе, малокровии, кровотечениях [3]. Манжетка также может быть рекомендована для лечения сахарного диабета в качестве гипогликемического и противовоспалительного средства [4]; настой травы обладает антимагистатическим действием [5]. Наибольший интерес представляют экспериментальные данные, в которых доказана эффективность использования полифенольного экстракта из надземной части манжетки обыкновенной и некоторых флавоноидов, идентифицированных в этом растении, для нормализации реологических показателей крови [6].

Для проведения комплекса экспериментальных фармакологических испытаний и последующей рекомендации использования манжетки в медицинской практике необходимым является разработка рациональной технологии экстракта данного растения с последующей оценкой качества готового продукта.

В настоящее время для получения экстрактов из растительного сырья широко используются различные методы: многоступенчатое противоточное экстрагирование, метод последовательной экстракции, циркуляционное экстрагирование, экстрагирование двухфазной системой экстрагентов [7, 8]. Некоторые из этих методов применяются в различных модификациях, от-

личающихся временем экстрагирования, способом распределения сырья в экстракторах и аппаратурой. Выбор метода определяется эффективностью производства готового продукта и зависит от свойств экстрагента и растительного материала.

Целью данной работы является разработка оптимальных условий экстрагирования биологически активного комплекса надземной части манжетки обыкновенной и оценка его качества.

### Экспериментальная часть

Для получения жидких экстрактов использовали образцы надземной части манжетки обыкновенной, заготовленные в фазу цветения растения в окрестностях Томска в 2008 – 2009 гг. Содержание флавоноидов в надземной части манжетки определяли с помощью ранее разработанной нами методики количественного определения флавоноидов в надземной части манжетки [9], которое составило  $5,5 \pm 0,2$  %.

Для разработки и теоретического обоснования технологии жидкого экстракта по методикам [10, 11] определены технологические параметры сырья манжетки обыкновенной: влажность, насыпная масса, коэффициент наполнения сухого сырья, коэффициент вытеснения, коэффициент наполнения набухшего сырья, коэффициент поглощения, коэффициент образования внутреннего сока, коэффициент увеличения объема. С помощью полученных коэффициентов наполнения сухого и набухшего сырья осуществляли подбор рабочего объема диффузоров. Используя коэффициенты вытеснения, образования внутреннего сока, поглощения сырья и насыпную массу, определяли количество экстрагента, необходимое для настаивания и перколяции. Полученные результаты представлены в табл. 1.

С целью выявления влияния технологических факторов на процесс экстрагирования использовали математическое планирование по латинскому квадрату [12], позволяющее сократить количество опытов, выявив при этом наиболее значимые факторы.

В качестве изучаемых факторов выбрали концентрацию экстрагента (20, 40, 70 % этанол), продолжительность настаивания 4, 12, 24 ч и степень измельчения сырья, которая варьировала от 1 – 3 до 5 – 7 мм.

Таблица 1  
Технологические параметры сырья надземной части манжетки обыкновенной

Обозначение	Параметр	Значение
<i>B</i>	Влажность сырья, %	5,79 ± 0,28
<i>Y</i>	Насыпная масса, г/см <sup>3</sup>	0,11 ± 0,01
<i>F</i>	Коэффициент наполнения сухого сырья, см <sup>3</sup> /г	7,51 ± 0,38
$\Delta$	Коэффициент вытеснения, см <sup>3</sup> /г	1,50 ± 0,08
$\phi$	Коэффициент наполнения набухшего сырья, см <sup>3</sup> /г	4,38 ± 0,22
<i>K<sub>n</sub></i>	Коэффициент поглощения, см <sup>3</sup> /г	2,91 ± 0,15
<i>K</i>	Коэффициент образования внутреннего сока, см <sup>3</sup> /г	3,47 ± 0,17
<i>Z</i>	Коэффициент увеличения объема при растворении экстрактивных веществ, см <sup>3</sup> /г	1,47 ± 0,07

Экстрагирование проводили равновесным методом [10]. Степень влияния того или иного фактора определяли относительно содержания суммы экстрактивных веществ и флавоноидов. Результаты полученных исследований представлены в табл. 2.

Дисперсионный анализ параметров, приведенных в табл. 2, показывает, что все 3 фактора — размер частиц сырья, экстрагент и продолжительность настаивания — являются значимыми для экстрагирования флавоноидов манжетки обыкновенной. Максимальное количество экстрактивных веществ и флавоноидов извлекается 40 % этанолом в течение 24 ч при размере частиц сырья 3 – 5 мм. В дальнейшем при разработке технологии жидкого экстракта учитывали полученные данные. В результате проведенных исследований нами предложены оптимальные условия получения жидкого экстракта манжетки обыкновенной, обеспечивающие максимальный выход биологически активного комплекса.

Для выбора наиболее рациональной технологии получения жидкого экстракта манжетки нами использованы методы многоступенчатого противоточного эк-

рагирования, последовательной экстракции и экстракции двухфазной системой экстрагентов, которые являются наиболее доступными и часто используются на фармацевтических предприятиях.

**Получение экстракта манжетки методом многоступенчатого противоточного экстрагирования.** Результаты исследования свойств сырья манжетки, его технологических параметров, влияния факторов на процесс извлечения действующих веществ (табл. 1, 2) позволили установить, что для данного сырья оптимальными условиями при многоступенчатом противоточном экстрагировании являются:

- Y* — соотношение фаз — 3,5;
- n* — количество ступеней экстракции — 5;
- y* — коэффициент съема готового продукта — 1;
- продолжительность настаивания — 24 ч;
- размер частиц сырья — 3 – 5 мм;
- экстрагент — 40 % этанол.

Измельченное до размера частиц 3 – 5 мм сырье манжетки (20,0 г), отделенное от пыли просеиванием через сито с диаметром отверстий 0,25 мм, загружали в первый перколятор и непрерывным потоком подавали экстрагент. Настаивание проводили в течение 24 ч при комнатной температуре. Перколяцию проводили вытеснением извлечения потоком свежего экстрагента. Полученное из первого перколятора извлечение подавали во второй перколятор, содержащий аналогичное количество измельченного сырья, и доводили объем экстрагента до «зеркала». С остальными перколяторами работали по той же схеме, загружая в каждый из них по 20,0 г сырья: для заполнения каждого последующего перколятора использовали вытяжку из предыдущего. С последнего перколятора сливали первую порцию готового продукта в объеме 20 мл. В следующие дни поступали аналогично со вторым, третьим, четвертым и пятым перколяторами [7]. Полученные извлечения объединяли, отстаивали в течение 3 сут при температуре 8 – 10 °С. Экстракт фильтровали через складчатый бумажный фильтр. В результате

Таблица 2

**Влияние ряда факторов на содержание флавоноидов и экстрактивных веществ**

Фактор А: размер частиц, мм, — *A*<sub>1</sub> (1 – 3); *A*<sub>2</sub> (3 – 5); *A*<sub>3</sub> (5 – 7)  
Фактор В: вид экстрагента, %, — *B*<sub>1</sub> (этанол 20 %); *B*<sub>2</sub> (этанол 40 %); *B*<sub>3</sub> (этанол 70 %)  
Фактор С: продолжительность настаивания, ч, — *C*<sub>1</sub> (4); *C*<sub>2</sub> (12); *C*<sub>3</sub> (24)

Планирование эксперимента		
<i>A</i> <sub>1</sub> <i>B</i> <sub>1</sub> <i>C</i> <sub>3</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>1</sub> <i>C</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>3</sub> <i>B</i> <sub>1</sub> <i>C</i> <sub>1</sub>
<i>A</i> <sub>1</sub> <i>B</i> <sub>2</sub> <i>C</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>2</sub> <i>C</i> <sub>3</sub>	<i>A</i> <sub>3</sub> <i>B</i> <sub>2</sub> <i>C</i> <sub>2</sub>
<i>A</i> <sub>1</sub> <i>B</i> <sub>3</sub> <i>C</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub>2</sub> <i>B</i> <sub>3</sub> <i>C</i> <sub>1</sub>	<i>A</i> <sub>3</sub> <i>B</i> <sub>3</sub> <i>C</i> <sub>3</sub>
Влияние факторов на содержание экстрактивных веществ, %		
25,26	23,91	11,09
18,14	34,69	25,30
20,75	15,47	24,74
<i>F</i> (по <i>A</i> ) = 307,161 Значимо	<i>F</i> (по <i>B</i> ) = 686,591 Значимо	<i>F</i> (по <i>C</i> ) = 2741,55 Значимо
<i>F</i> <sub>табл.</sub> = 4,72		
Влияние факторов на содержание флавоноидов, %		
2,80	2,61	1,96
2,61	3,50	2,73
1,76	1,49	1,82
<i>F</i> (по <i>A</i> ) = 21,0608 Значимо	<i>F</i> (по <i>B</i> ) = 246,331 Значимо	<i>F</i> (по <i>C</i> ) = 73,0811 Значимо
<i>F</i> <sub>табл.</sub> = 4,72		

Сравнительная оценка качества экстрактов манжетки обыкновенной, полученных различными методами

Экстрагент	Содержание флавоноидов, %	Выход флавоноидов, относительно содержания в сырье*, %	Сухой остаток, %
Экстракт, полученный методом многоступенчатого противоточного экстрагирования			
Этанол 40 %	3,52 ± 0,18	64,00 ± 3,25	8,89 ± 0,44
Экстракт, полученный методом последовательной экстракции			
Модификация 1 (70 и 40 % этанол)	2,30 ± 0,12	41,81 ± 2,09	5,11 ± 0,26
Модификация 2 (70 и 20 % этанол)	2,60 ± 0,13	47,27 ± 2,40	5,11 ± 0,26
Модификация 3 (40 и 20 % этанол)	3,15 ± 0,16	57,27 ± 2,86	4,99 ± 0,24
Модификация 4 (70 % этанол и вода)	2,83 ± 0,14	51,45 ± 2,57	6,05 ± 0,30
Модификация 5 (40 % этанол и вода)	4,16 ± 0,21	75,63 ± 3,64	6,45 ± 0,32
Экстракт, полученный методом экстракции двухфазной системой экстрагентов			
Этанол 40 %	2,25 ± 0,11	40,90 ± 2,04	3,39 ± 0,17

\* Содержание флавоноидов в сырье составило 5,5 ± 0,23 %.

переработки 100,0 г сырья получили 100 мл готового продукта (1:1).

**Получение экстракта манжетки методом последовательной экстракции.** При получении экстракта методом последовательной экстракции используют экстрагент различной полярности, что обеспечивает наиболее полное истощение сырья и извлечение действующих веществ [8]. Нами в качестве экстрагента использованы:

- 70 и 40 % этанол (модификация 1);
- 70 и 20 % этанол (модификация 2);
- 40 и 20 % этанол (модификация 3);
- 70 % этанол и вода (модификация 4);
- 40 % этанол (модификация 5).

Измельченное до размера частиц 3–5 мм сырье манжетки (20,0 г), отделенное от пыли просеиванием через сито с диаметром отверстий 0,25 мм, загружали в первый перколятор и непрерывным потоком подавали экстрагент. Настаивание проводили в течение 24 ч при комнатной температуре. Перколяцию проводили вытеснением извлечения потоком свежего экстрагента по схеме метода многоступенчатого противоточного экстрагирования. При этом экстрагенты различной концентрации (модификации 1–5) подавали последовательно. Полученные извлечения объединяли и отстаивали в течение 3 сут при температуре 8–10 °С. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр. В результате переработки 100,0 г сырья получили 100 мл готового продукта (1:1) за каждый цикл.

Таблица 4

Параметры качества жидкого экстракта манжетки обыкновенной

Параметр	Значение
Органолептические признаки	Жидкость темно-коричневого цвета, характерного запаха, горького вкуса
Содержание спирта этилового, %	31,15 ± 1,55
Сухой остаток, %	8,89 ± 0,44
Плотность, г/мл	0,9390–0,9410
Содержание флавоноидов, %	3,52 ± 0,18
Содержание тяжелых металлов, %	менее 0,01

Таким образом, нами было разработано 5 модификаций последовательной экстракции, каждая из которых отличается видом используемого экстрагента и последовательностью его применения (70, 40, 20 % этанол, вода очищенная).

**Получение жидкого экстракта манжетки методом экстракции двухфазной системой экстрагентов.** По данным литературы двухфазная экстракция по эффективности извлечения биологически активных веществ не уступает другим методам экстракции, традиционно применяемым в производстве суммарных фитопрепаратов [13, 14]. В качестве экстрагентов двухфазной системы использовали подсолнечное рафинированное масло и 40 % этанол.

10,0 измельченного до размера частиц 3–5 мм высушенного сырья манжетки отделяли от пыли просеиванием через сито с отверстиями диаметром 0,25 мм, помещали на дно круглодонной колбы, смачивали сырье 53,8 мл 96 % этанола и настаивали в течение 2 ч. Затем добавляли 75,3 мл воды очищенной (для доведения концентрации этанола до 40 %) и 100,0 г масла растительного. Экстрагирование проводили в той же колбе с обратным холодильником при нагревании на водяной бане (80 °С) при периодическом перемешивании в течение 3 ч. Затем вытяжку процеживали через марлю для отделения частиц сырья и разделяли по плотности в делительной воронке в течение 1 сут. Масляный и спиртовой экстракты сливали отдельно.

Оценку качества полученных различными методами экстрактов манжетки проводили по общепринятым технологическим параметрам [15] и содержанию флавоноидов, которые являются основными биологически активными веществами надземной части манжетки и обуславливают гемореологические свойства растения [1, 6].

Для оценки содержания флавоноидов в полученных экстрактах использовали принцип сквозной стандартизации: лекарственное сырье — субстанция — лекарственная форма. Поэтому для разработки методики количественного определения флавоноидов в экстрактах манжетки использовали предложенный нами спектрофотометрический метод, в основе которого лежит реакция комплексообразования со спиртовым раствором алюминия хлорида. При этом комплекс вызывает бато-

хромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения и дает основной максимум поглощения при длине волны  $400 \pm 2$  нм. Аналогичный максимум поглощения при длине волны 400 нм отмечен для комплекса государственного стандартного образца (ГСО) лютеолин-7-глюкозида (цинарозид) с алюминия хлоридом [16].

**Методика.** 2 мл жидкого экстракта манжетки (раствор А) помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 2 мл 2 % спиртового раствора алюминия хлорида, 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора 95 % этанолом до метки (раствор Б); через 20 мин измеряли оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре “СФ-2000” при длине волны 400 нм в кювете с толщиной слоя  $10 \text{ мм} \pm 2$  нм. В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: 2 мл жидкого экстракта манжетки помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 1 каплю разведенной хлористоводородной кислоты и доводили объем раствора 95 % этанолом до метки.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-глюкозид в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D_x \cdot V_2 \cdot 100}{145 \cdot V_1},$$

где  $D_x$  — оптическая плотность испытуемого раствора;  $V_1$  — объем раствора А в мл;  $V_2$  — объем раствора Б в мл; 145 — удельный показатель поглощения комплекса лютеолин-7-глюкозида с алюминия хлоридом при длине волны 400 нм.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили, используя пакет статистических программ “Statistica for Windows 6,0” [17].

### Результаты и их обсуждение

Для разработки технологии получения экстракта манжетки обыкновенной нами использованы методы многоступенчатого противоточного экстрагирования, последовательной экстракции и экстракции двухфазной системой экстрагентов. С помощью вышеперечисленных методов было получено по 5 опытных серий жидких экстрактов и проведена сравнительная оценка их качества по содержанию флавоноидов и сухому остатку. Результаты представлены в табл. 3.

Данные, представленные в табл. 3, свидетельствуют о том, что наиболее полный выход действующих веществ из сырья наблюдается при использовании методов многоступенчатого противоточного экстрагирования и последовательной экстракции (5 модификация).

В качестве наиболее рационального метода получения экстракта манжетки обыкновенной предлагаем метод многоступенчатого противоточного экстрагирования, который обеспечивает экономию экстрагента, не требует сложного аппаратного оформления и обеспечивает достаточный выход действующих веществ.

Для оценки качества экстракта, полученного предлагаемым методом, определяли общепринятые показатели: содержание спирта этилового в экстракте, сухой остаток, плотность, содержание флавоноидов и тяжелых металлов. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таким образом, на основании проведенных исследований предложен рациональный метод получения экстракта манжетки обыкновенной, обеспечивающий наибольший выход действующих веществ.

### ЛИТЕРАТУРА

1. В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина, *Химия растит. сырья*, № 2, 79 – 85, (2000).
2. В. М. Баева, С. А. Сасов, *Фармация*, № 2, 9 – 10, (2007).
3. Г. С. Миниджан, *Сборник по народной медицине и нетрадиционным способам лечения*, Т. 2, Багира, Москва (1994), с. 350.
4. А. Б. Седова, *Лекарственные растения в лечении сахарного диабета*, Пермь (2006).
5. В. М. Баева, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Москва (2009).
6. М. Б. Плотноков, А. А. Колтунов, О. И. Алиев и др., *Раст. ресурсы*, № 1, 87 – 91 (1998).
7. И. А. Муравьев, *Теоретические основы производства жидких экстрактов методом реперколяции с законченным циклом*, Пятигорск (1985).
8. В. И. Чуешов, *Промышленная технология лекарств*, т. 2, НФАУ, Харьков (2002).
9. В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина, *Химия раст. сырья*, № 1, 85 – 88 (2000).
10. Ю. Г. Пшуков, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Харьков (1987).
11. Ю. Г. Пшуков, *Фармация*, № 4, 24 – 27, (1990).
12. *Руководство по применению латинских планов при планировании эксперимента с качественными факторами*, Челябинск (1971).
13. С. А. Иванова, *Хим.-фарм. журн.*, 37(8), 30 – 33 (2003).
14. И. Е. Каухова, *Фармация*, № 1, 37 – 39 (2006).
15. *Государственная фармакопея СССР*, т. 2, МЗ СССР, Москва (1989).
16. *Временная фармакопейная статья. Лютеолин-7-глюкозид – стандартный образец. Цинарозид.* (ВФС 42-1940-89).
17. В. И. Кувакин, *Применение теории планирования эксперимента в медицинских исследованиях (включая персональный компьютер и пакет статистических программ Statistica for Windows)*, Санкт-Петербург (1999).

Поступила 26.08.10

## DEVELOPING RATIONAL TECHNOLOGY OF *Alchemilla vulgaris* EXTRACT

I. M. Smolyakova<sup>1</sup>, V. Yu. Andreeva<sup>1</sup>, G. I. Kalinkina<sup>1</sup>, S. N. Avdeenko<sup>1</sup>, and P. P. Shchetinin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

<sup>2</sup> Tomsk State University, Tomsk, Russia

Rational technology of obtaining extract from common lady's mantle (*Alchemilla vulgaris* L. S. L.) is proposed that is based on a multistage counterflow method. A procedure for standardization of the extract with respect to flavonoids has been developed.

**Key words:** *Alchemilla vulgaris*, technology of liquid extract, standardization procedure, flavonoids