

В. М. Петриченко, Е. Е. Галишевская, В. К. Данилова,
Н. И. Шрамм, Л. К. Бабиян

СТАНДАРТИЗАЦИЯ И ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТРАВЫ МАРЬЯННИКА ЛУГОВОГО

Пермская государственная фармацевтическая академия

Изучено содержание влаги, золы, экстрактивных веществ, примесей и действующих веществ – флавоноидов (0,18 – 0,64%) и иридоидов (1,35 – 5,90%) в траве *Melampyrum pratense*. Оптимальным для получения экстракционных препаратов является метод реперколяции в батарее из четырех перколяторов с использованием сырья измельченного $> 0,25 \leq 2,0$ мм и 50% этанола. Получены жидкий (1:1), сухой спиртовый и сухой водный экстракты у которых определена противосудорожная активность. Наиболее высокой активностью обладает сухой водный экстракт в дозе 100 и 200 мг/кг, что объясняется согласованным действием комплекса биологически активных веществ. Токсичность (ЛД₅₀) сухих экстрактов составляет 2930 мг/кг, а жидкого — 30,8 мл/кг.

Марьянник (М.) луговой (*Melampyrum pratense* L. — семейство *Scrophulariaceae*) — однолетнее полупаразитное растение высотой 40 – 50 см. Широко распространен в центральных и северных районах России, где произрастает в сосновых, еловых и смешанных лесах [1]. Надземная часть этого растения является старинным народным средством. Под названием “черная трава” [2] используется для лечения эпилепсии, невралгии, гипертонии [3]. Ранее проведенные исследования выявили у экстракционных препаратов М.лугового наличие седативной, гипотензивной, нейролептической, кардиотонической активности [4 – 7].

Фармакологическая активность связана с богатым и разнообразным комплексом биологически активных веществ (БАВ), содержащихся в растении, — это флавоноиды [8], иридоиды [9 – 11], алкалоиды [12], полисахариды [13], гликосапонины [14]. Выявленные биологические и химические свойства в сочетании с доступностью и широким распространением на территории России делают М.луговой перспективным источником БАВ и основой для разработки парафармацевтических и лекарственных препаратов.

Цель настоящего исследования — изучение товароведческих характеристик сырья марьянника лугового, определение оптимальных условий получения экстракционных препаратов, оценка их токсичности и противосудорожных свойств.

Материалы и методы исследования

Для исследования использовали надземную часть с корнями М.лугового, заготовленную в фазу цветения и высушенную воздушно-теньевым способом. Числовые показатели сырья определяли в соответствии с требованиями ГФ XI [15]. Содержание флавоноидов в сырье и экстрактах определяли методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции с алюминия хлоридом в пересчете на цинарозид при длине волны 385 нм [16], содержание иридоидов определяли фото-

метрическим методом Грегора и Симхена в пересчете на аукубин [17].

Острую токсичность определяли при пероральном введении на нелинейных белых мышах массой 17 – 25 г. Препараты вводили в виде водного раствора или суспензии из расчета 0,5 мл на 10 г массы в возрастающих дозах. Результаты обрабатывали по Прозоровскому с вычислением средней смертельной дозы (ЛД₅₀) при $P \leq 0,05$ [18].

Определение противосудорожной активности проводили на беспородных белых мышах обоего пола массой 17 – 25 г по методике [19]. Судороги вызывали внутрибрюшинным введением 0,7 % водного раствора коразола в дозе 70 мг/кг. Препараты вводили перорально в виде водного раствора или суспензии за 2 ч до инъекции коразола. Жидкий спиртовый экстракт перед введением упаривали на водяной бане до 1/3 объема для удаления спирта и доводили водой до первоначального объема. О противосудорожном действии судили по предупреждению тонической фазы судорог. Статистическую обработку данных фармакологического эксперимента проводили по критерию Стьюдента, эффект считали достоверным при $P \leq 0,05$ [20].

Результаты и их обсуждение

Количественные показатели сырья приведены в табл. 1. Как видно из результатов, влажность сырья изменяется в узком диапазоне от 7,11 до 8,00 %, что отражает структурную однородность и одинаковые условия хранения сырья. Зола общая находится в пределах 8,92 – 13,37 %, а зола нерастворимая в 10 % соляной кислоте в интервале 0,20 – 2,93 %. Довольно большой разброс показателей зольности вероятнее всего связан с присутствием подземных органов в сырье (трава — надземная часть с корнями) и объясняется различными адгезионными свойствами почв мест произрастания.

Содержание минеральных и органических примесей находится в интервале 0,1 – 0,5 % и 0,3 – 1,2 % со-

Результаты товароведческого анализа травы марьянника лугового, %

Образец, место и время сбора	Влажность	Зола		Содержание экстрактивных веществ					Флавоноиды	Иридоиды	Примеси		
		общая	нерастворимая в 10 % HCl	вода	этанол			минеральная			органическая	стебли без листьев	
					40 %	70 %	90 %						
г. Пермь, Кировский р-н, Парк культуры и отдыха, июнь 2000 г.	7,38	8,94	0,20	40,10	41,32	33,99	25,77	0,33 ± 0,08	3,330 ± 0,03	0,2	0,8	7,2	
Пермская обл., Краснокамский р-н, д. Калининцы, июль 2000 г.	7,69	10,91	1,41	40,01	38,28	32,75	26,06	0,22 ± 0,06	2,48 ± 0,07	0,1	1,0	5,0	
Пермская обл., Б. Сосновский р-н, д. Стафията, июнь 1999 г.	7,11	9,50	0,20	38,09	40,64	30,91	23,87	0,64 ± 0,08	1,81 ± 0,08	0,5	0,6	8,0	
Пермская обл., Краснокамский р-н, окрестности ж/д. станции Н. Курья, июнь 2000 г.	8,00	13,37	2,92	39,35	6,51	31,24	21,65	0,32 ± 0,07	2,24 ± 0,14	0,1	0,4	12,3	
г. Пермь, Дзержинский р-н, Сосновый бор, июнь 1999 г.	7,16	8,92	0,36	33,83	32,64	29,44	22,05	0,57 ± 0,03	5,90 ± 0,02	0,1	0,3	7,5	
Свердловская обл., Кушвинский р-н, п. Баранчинский, июнь 1999 г.	7,5	11,41	0,59	38,97	36,24	31,96	23,27	0,48 ± 0,02	1,35 ± 0,06	0,2	0,8	6,2	
Свердловская обл., окрестности г. Нижний Тагил, июнь 1999 г.	7,87	11,62	2,03	43,07	37,14	33,02	22,98	0,18 ± 0,06	4,05 ± 0,23	0,3	0,8	8,0	
Свердловская обл., окрестности г. Нижний Тагил, июнь 2000 г.	7,76	12,54	0,43	40,68	40,27	31,49	22,08	0,36 ± 0,02	3,64 ± 0,12	0,2	1,2	8,8	
Среднее значение	7,56	10,90	1,02	39,26	37,88	31,85	23,47	0,39 ± 0,05	3,11 ± 0,09	0,22	0,73	7,9	

ответственно и не превышает аналогичные показатели для фармакопейных видов лекарственного растительного сырья. Специфическим показателем качества травы М. лугового, отражающим особенности морфологического строения и консистенцию, является наличие в сырье стеблей без листьев, в том числе, отделенных при анализе. Этот показатель находится в пределах 5,0 – 12,3 %.

Данные по определению экстрактивных веществ показывают, что их максимальное количество извлекается водой (43,07 %). Содержание флавоноидов в сырье колеблется от 0,18 до 0,64 %, а иридоидов от 1,35 до 5,90 %. Различие в содержании БАВ, вероятно, связано с паразитической формой существования и отражает экологические условия мест обитания и специфику качества травы М. лугового.

С целью выбора оптимальных условий получения экстракционных препаратов М. лугового изучено влияние ряда факторов на выход биологически активных веществ из сырья. Для установления оптимальной концентрации этилового спирта, способной извлекать максимальное количество БАВ, были получены методом мацерации настойки в соотношении 1:5 (сырье – экстрагент). Результаты определения БАВ и сухой остаток в настойках, полученных с использованием спирта различной концентрации, представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что оптимальным экстрагентом для извлечения флавоноидов и иридоидов является 50 % этанол, а наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается 30 % этиловым спиртом.

Выход биологически активных веществ из сырья с различной степенью измельченности в настойки (1:5),

Таблица 2
Содержание БАВ и сухой остаток в настойках (1:5), полученных с использованием спирта различной концентрации

Концентрация этанола, %	Содержание БАВ, %		Сухой остаток
	флавоноиды	иридоиды	
30	0,11	0,41	4,17
40	0,09	0,28	2,71
50	0,13	0,71	4,09
60	0,10	0,69	4,00
70	0,08	0,68	3,25
90	0,02	0,64	1,86

Таблица 3
Содержание БАВ и сухой остаток в настойках (1:5) из травы марьянника лугового с различной степенью измельченности

Степень измельченности сырья, мм	Содержание БАВ, %		Сухой остаток
	флавоноиды	иридоиды	
> 0,25 ≤ 2	0,25	0,71	5,73
> 0,25 ≤ 7	0,26	0,37	5,08
> 0,25 ≤ 10	0,28	0,30	4,80

Содержание БАВ и экстрактивных веществ в экстрактах из травы марьянника лугового, полученных различными способами

Способ и условия экстрагирования	Выход БАВ, % от содержания в сырье		Сухой остаток
	иридоиды	флавоноиды	
Метод ремацерации с делением экстрагента на 4 части, время контакта фаз: 1 ступень 24 ч, последующие 1,5 ч	23,73	72,31	31,68
Реперколяция в батарее из 4-х перколяторов, с законченным циклом и равной загрузкой сырья, по 24 ч в каждом перколяторе	28,81	56,92	34,28
Вихревая экстракция при скорости вращения мешалки 5000 об/мин	25,93	29,23	30,91
Фильтрационная экстракция при фильтровании экстрагента через слой сырья (разряжение 0,5 атм)	31,52	35,39	43,90

Таблица 5

Динамика извлечения БАВ из травы марьянника лугового 50% этанолом

Время контакта фаз, ч	Содержание суммы иридоидов		Содержание суммы флавоноидов	
	в %	в %, от равновесной концентрации	в %	в %, от равновесной концентрации
0,5	2,57	53,99	0,17	75,22
1	4,72	99,16	0,18	81,86
2	4,76	100	0,19	84,07
3	4,76	100	0,20	89,80
4	4,76	100	0,23	95,80
6	4,76	100	0,24	100
8	4,76	100	0,24	100

полученные методом мацерации 50 % этанолом в течение 24 ч, приведены в табл. 3.

Как следует из полученных данных, степень измельченности сырья практически не влияет на выход флавоноидов, а выход иридоидов и экстрактивных веществ с уменьшением размера частиц возрастает. Максимальное количество БАВ извлекается при измельченности сырья $> 0,2 \leq 2$ мм.

С целью определения условий, обеспечивающих максимальный выход БАВ, изучены различные способы экстрагирования сырья [21] 50 % этанолом (табл. 4). Из данных табл. 4 следует, что максимальный выход иридоидов и экстрактивных веществ наблюдается при использовании метода фильтрационной экстракции, а флавоноидов — метода ремацерации с делением экстрагента на части.

Учитывая, что для извлечения различных групп БАВ марьянника лугового эффективны разные методы экстракции, для получения экстракта использовали метод реперколяции, так как он дает возможность получить комплексный препарат с высоким содержанием как иридоидов, так и флавоноидов.

При определении времени контакта фаз в процессе экстракции большое значение имеет время наступления равновесного состояния в системе твердое тело – жидкость. Этот показатель определяли путем экстракции серии навесок сырья 50 % этанолом до прекращения прироста концентрации БАВ в вытяжках [21]. Первые определения БАВ проводили через 30 мин, а последующие с интервалом 1 ч (табл. 5, рисунок). Из таблицы видно, что равновесие в системе по иридоидам устанавливается через 2 ч, а по флавоноидам — через 6 ч.

Разработанным методом был получен жидкий экстракт (1:1). Экстрагировали траву, измельченную до 2 мм, в батарее из четырех перколяторов с равной загрузкой сырья, 50 % этанолом. Время контакта фаз на каждой ступени 6 ч. Жидкий экстракт отстаивали двое суток при температуре 8 – 10 °С, фильтровали, определяли содержание БАВ. Данное извлечение использовали для получения сухого спиртового экстракта. Для этого его сгущали в ротационном вакуумном испарителе при температуре 80 – 90 °С. Сухой спиртовый экстракт представляет собой гигроскопическую массу черно-коричневого цвета с характерным специфическим запахом. Выход составляет 11,5 % от массы исходного сырья.

Для сравнительной фармакологической оценки был получен сухой водный экстракт. Для этого навеску сырья, измельченного до 2 мм, последовательно экстра-

Таблица 6

Содержание БАВ в экстрактах марьянника лугового

№	Препарат	Содержание, %			Качественные реакции*	
		флавоноиды	иридоиды	влажность	алкалоиды	сапонины
1	Жидкий экстракт 1:1, на 50 % этаноле	0,52 ± 0,01	4,28 ± 0,43	–	+**	–
2	Сухой спиртовый экстракт	3,67 ± 0,37	7,54 ± 0,44	9,22 ± 1,08	+++	–
3	Сухой водный экстракт	2,00 ± 0,01	5,35 ± 0,58	6,57 ± 0,17	–	++

* Реакция на алкалоиды с 3 % раствором кремневольфрамовой кислоты, на сапонины реакция пенообразования

** Интенсивность реакции: “–” отсутствует; “+” слабо выражена; “+++” положительная; “++++” высокая

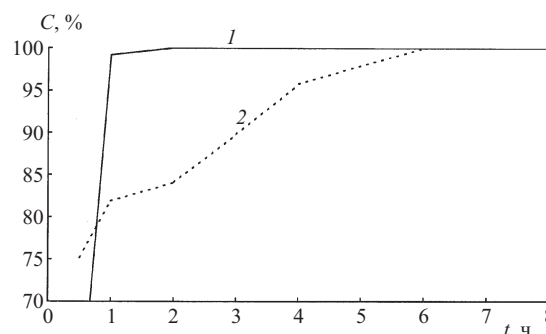
Противосудорожная активность экстракционных препаратов марьянника лугового

№	Образец	Токсичность ЛД ₅₀	Доза	Количество животных, шт	Латентный период судорог, с	Продолжительность жизни, с	Выживаемость, %
1	Коразол	–	100 мг/кг	6	80 ± 8,9	102 ± 8,3	0
2	Сухой водный экстракт	2930 мг/кг	100 мг/кг	6	81,7 ± 17,2 <i>P</i> > 0,5	237,5 ± 2,8 <i>P</i> < 0,01	50
			200 мг/кг	6	73,3 ± 12,6 <i>P</i> > 0,5	–	100
3	Сухой спиртовый экстракт	2930 мг/кг	100 мг/кг	6	82,4 ± 6,3 <i>P</i> > 0,5	107 ± 8,4 <i>P</i> > 0,5	0
			200 мг/кг	6	86,7 ± 12,9 <i>P</i> > 0,5	110,5 ± 23,0 <i>P</i> > 0,5	0
4	Жидкий экстракт 1:1, на 50 % этаноле	30,8 мл/кг	1 мл/кг	6	106,0 ± 15,2 <i>P</i> > 0,01	236,2 ± 1,4 <i>P</i> < 0,001	0

гировали водой в соотношении 1:10 на кипящей водяной бане в течение 2 ч, в трехкратной повторности. Водные извлечения объединяли, охлаждали, фильтровали, сгущали и сушили в условиях, описанных выше. Выход составляет 13 % от массы исходного сырья. Сухой водный экстракт представляет собой гигроскопическую массу темно-коричневого цвета со специфическим запахом. Результаты количественного определения БАВ и качественных реакций на алкалоиды и сапонины в экстракционных препаратах марьянника лугового приведены в табл. 6. Из данных табл. 6 видно, что сухой спиртовой экстракт отличается повышенным содержанием флавоноидов (3,67 %) и иридоидов (7,54 %), наличием алкалоидов и отсутствием сапонинов. Сухой водный экстракт характеризуется более низким содержанием флавоноидов (2,0 %) и иридоидов (5,35 %), наличием сапонинов и отсутствием алкалоидов. Жидкий экстракт содержит 0,52 % флавоноидов и 4,28 % иридоидов, а также в незначительных количествах алкалоиды и сапонины, что, вероятно, связано с особенностями технологического процесса.

Экстракционные препараты марьянника лугового испытаны на противосудорожную активность (табл. 7).

Данные табл. 7 показывают, что сухой спиртовой экстракт, несмотря на повышенное содержание флавоноидов и иридоидов, не обладает противосудорожным действием. Жидкий экстракт оказывает незначительное действие в дозе 1 мл/кг. По сравнению с контролем латентный период судорог удлиняется примерно на 20 %, а продолжительность жизни животных увеличивается более чем в два раза. Сухой водный экстракт не оказывает влияния на латентный период судорог, но в дозе 100 мг/кг достоверно увеличивает продолжительность жизни более чем в два раза, при этом выживаемость животных составляет 50 %, а в дозе 200 мг/кг – 100 %. Очевидно, противосудорожный эффект сухого водного и жидкого экстрактов обусловлен согласованным действием всего комплекса БАВ, содержащихся в растении, при этом, вероятно, определяющая роль отводится гликосапонинам.



Содержание БАВ в извлечениях марьянника лугового в % от равновесного, в зависимости от времени экстракции: 1 – иридоиды, 2 – флавоноиды

Испытания на острую токсичность показали, что ЛД₅₀ сухих водного и спиртового экстрактов составляет 2930 (2200 – 3000) мг/кг, а жидкого 30,8 (29,0 – 58,0) мл/кг, что позволяет отнести их к группе низко токсичных препаратов [22].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены товароведческие показатели качества сырья марьянника лугового и оптимальные условия получения экстракционных препаратов. Выявленная противосудорожная активность и низкая токсичность сухого водного и жидкого (1:1, 50 % этанол) экстрактов открывает перспективы для более глубоких исследований и внедрения их в медицинскую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ан. А. Федоров, Р. В. Камелин (ред.), *Флора Европейской части СССР*, Наука, Ленинград (1981), сс. 540.
2. Е. В. Кучеров, С. Г. Каримова, Д. Н. Лазарева и др., *Вопросы рационального использования растительных ресурсов южного Урала*, Уфа (1963), сс. 24 – 27.
3. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейства Caprifoliaceae – Plantaginaceae*, Наука, Ленинград (1990), сс. 149 – 150.
4. М. И. Рабинович, *3-я Уральская конференция физиологов, биохимиков и фармакологов, посвященная 40-летию Удмуртской АССР*, Ижевск (1960), сс. 192 – 193.

5. Д. Н. Лазарева, Ф. С. Зарудий, *Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии*, БФ АН СССР (1961), № 1, сс. 28 – 33.
6. Д. Н. Лазарева, Г. Г. Максимов, Ф. С. Зарудий и др., *Вопросы рационального использования растительных ресурсов Южного Урала*, Уфа (1963), сс. 29 – 31.
7. Е. Е. Галишевская, Б. Я. Сыропятов, В. М. Петриченко, О. В. Трошкова, *Здравоохранение Башкортостана*, № 2, 142 – 144 (2002).
8. С. Г. Каримова, *Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии*, Уфа, № 4, 89 – 105(1974).
9. А. В. Дьоготь, В. И. Литвиненко, Н. О. Черних, И. Г. Зоз, *Фармац. журн.*, **27**(1), **66**(1972).
10. L. Świątek, *Acta Pol. Pharm.*, **30**(2), 203 – 212 (1973).
11. M. Braecke, *C. r. Acad. Sci.*, **175**, 990 – 992(1922).
12. С. Г. Каримова, *Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии*, Уфа, № 1, 137 – 142(1961).
13. С. Wehmer, *Die Pflanzenstoffe.*, Jena, № 1, 640(1929); № 2, 1514(1931).
14. С. Г. Каримова, Е. В. Кучеров, Х. М. Насыров, и др., *Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии*, Уфа, № 3, 117 – 129(1971).
15. Государственная фармакопея СССР, 11-е изд., Вып. 1 и 2, Медицина, Москва (1987 и 1990).
16. В. М. Петриченко, Т. В. Сухинина, Н. С. Фурса, *Раст. ресурсы*, **38**(2), 104 – 109(2002).
17. G. Gröger, P. Simchen, *Die Pharmazie*, **22**(6), 315(1967).
18. В. В. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 497 – 552(1978).
19. В. С. Залесов, *Фармакол. и токсикол.*, **26**(4), 418 – 431, (1963).
20. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963), сс. 16 – 32.
21. В. Д. Пономарев, *Экстрагирование лекарственного сырья*, Медицина, Москва (1976).
22. Н. Ф. Измеров, И. В. Санацкий, К. К. Сидоров, *Параметры токсиметрии промышленных ядов при однократном воздействии*, Медицина, Москва (1977), сс. 196 – 197.

Поступила 02.02.04

STANDARTISATION AND PHARMACO-TECNOLOGICAL PROPERTIES OF THE HERB *Melampyrum Pratense*

V. M. Petrichenko, E. E. Galishevskaya, V. K. Danilova, N. I. Shramm, L. K. Babiyayn

The Perm State Pharmaceutical Academy

The content of moisture, zones, extractive substances impurities and active substances – flavonoids (0,18 – 0,64%) and iridoids (1,35 – 3,09%) in the herb *Melampyrum pratense* has been studied. The optimum conditions for obtaining extraction preparations are the use of raw material sectioned to $> 0,25 \leq 2,0$ mm, 50% aethanol and method of repercolation in the battery of four percolators. Liquid (1:1), dry alcoholic and dry aqueous extracts has been obtained and their anticonvulsive activity has been determined. The highest activity in the dose of 100 and 200 mg/kg possesses the dry aqueous extracts which is explained by the combined action of the complex of biologically active substances.