

УДК 615.322:582.924.4:581.192'44'46'81

ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ БЕЛОКУДРЕННИКА ЧЕРНОГО С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

© 2012 А.А. Круглая, С.Г. Тираспольская, Г.В. Алфимова, О.В. Мичник,
Л.А. Мичник, М.В. Мазурина, Т.А. Шаталова, Х.Н. Гюльбякова

Пятигорский филиал Волгоградского государственного медицинского университета

Поступила в редакцию 03.10.2012

Целью работы является выявление диагностических признаков и изучение биологически активных соединений травы белокудренника черного. В водном извлечении травы были обнаружены: полисахариды, дубильные вещества конденсированной структуры, тритерпеновые сапонины, аминокислоты, 20 биоэлементов, органические кислоты (аскорбиновая, щавелевая, яблочная и янтарная). В спиртоводных извлечениях (40% и 70%) были обнаружены флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты. Установлено, что извлечения из травы белокудренника черного обладают антимикробной активностью в отношении стафилококков, бактерий кишечной группы.

Ключевые слова: *трава белокудренника черного, дубильные вещества, флавоноиды, полисахариды, аминокислоты, сапонины, органические кислоты, микроэлементы, антимикробная активность*

Одной из задач отечественного здравоохранения является изыскание новых эффективных лекарственных средств, среди которых важным источником остаются растения. В связи с этим проблема использования растительных ресурсов остается актуальной. Настоящее исследование посвящено изучению надземной части белокудренника черного (*Ballota nigra* L.) семейства яснотковых (*Lamiaceae*), который широко распространен на территории Европейской части России. Растение применяется в народной медицине при нервных расстройствах, затрудненных болях, как мочегонное средство; наружно – при болях в суставах и мышцах. Известно, что белокудренник черный по седативному действию приближается к валериане и пустырнику [5]. В научной медицине растение не используется, химический состав растения изучен недостаточно, поэтому фитохимическое исследование и выделение групп биологически активных соединений (БАС) с целью изыскания новых

лекарственных средств и стандартизация сырья является актуальным.

Цель работы: выявить диагностические признаки травы белокудренника черного; изучить надземную часть растения на присутствие БАС; провести их количественный анализ.

Материал и методика. Материалом для исследований служила трава белокудренника черного, собранные в фазу цветения (Ростовская область, Ставропольский край). На предварительном этапе выявляли характерные диагностические признаки сырья. Его обрабатывали смесью 95% спирта, глицерина и воды (1:1:1) или 3% раствором натрия гидроксида, готовили срезы стебля, листа, цветка, исследовали их с помощью микроскопа. Для предварительной идентификации БАС сырья были получены водные и спиртоводные извлечения (40%, 70%, 96% растворы этанола) из травы белокудренника черного. Для получения извлечения 5,0 г (точная навеска) измельченной травы заливали экстрагентом и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Вытяжки сливали, фильтровали, операцию повторяли дважды. Извлечения, полученные после трехкратной экстракции, объединяли, упаривали до 25 мл, использовали для проведения качественных реакций по методикам ГФ XI и ГФ XII [1, 2] и расчета содержания экстрактивных веществ. Водные вытяжки использовали для определения углеводных соединений, дубильных веществ, органических кислот, аминокислот, сапонинов, спиртоводные – для определения флавоноидов.

Для качественного анализа полифенольных соединений в спиртоводных извлечениях использовали методы бумажной и тонкослойной хроматографии (ТСХ). В качестве неподвижной фазы использовали хроматографическую бумагу марки «Ленинградская-С». Системой растворителей служили: н-бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:2) для бумажной восходящей хроматографии; 15% уксусная кислота и 2% уксусная кислота для ТСХ.

Круглая Анна Александровна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры фармакогнозии. E-mail: annandreiko@yandex.ru

Тираспольская Светлана Георгиевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии. E-mail: maklea@yandex.ru

Алфимова Галина Васильевна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры фармацевтической химии

Мичник Олег Викторович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарств. E-mail: shatab1@bk.ru

Мичник Людмила Андреевна, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры технологии лекарств

Мазурина Майя Викторовна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры биохимии и микробиологии. E-mail: lameros@amik.ru

Шаталова Татьяна Анатольевна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры технологии лекарств

Гюльбякова Христина Николаевна, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры фармацевтической химии. E-mail: xristnik@yandex.ru

Проявление зон адсорбции БАС осуществляли следующими способами:

1) просматривали в УФ свете и отмечали собственную флуоресценцию веществ;

2) обрабатывали парами аммиака и просматривали в УФ свете;

3) просматривали в видимом и УФ свете после обработки 5% спиртовым раствором алюминия хлорида;

4) обрабатывали 5% спиртовым раствором гидроксида натрия и отмечали зоны адсорбции в видимом свете;

5) обрабатывали 0,04% водным раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия.

Далее было определено наличие свободных органических кислот в сырье белокудренника черного. Для этого использовали метод ТСХ. Пластинки «Силуфол УФ-366», система растворителей: 95% этанол: раствор аммиака (16:4,5), проявитель – раствор бромкрезолового зеленого. Содержание макро-и микроэлементов в траве белокудренника черного определяли спектральным методом на базе испытательной лаборатории при ФГУП «Кавказгеолсъемка» (г. Ессентуки) по методике предприятия. Пробу измельченного сырья массой 10,0 г (точная навеска) минерализовали методом сухого разложения в фарфоровых тиглях при температуре 450⁰С до получения белой золы. Зольный остаток обрабатывали 5 мл смеси, состоящей из концентрированной азотной, серной кислоты и воды (1:1:1) и выпаривали на водяной бане досуха. Остаток растворяли в 15 мл 1% раствора азотной кислоты, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем до метки тем же растворителем. Атомно-адсорбционное определение элементов проводили на спектрофотометре ДФС-8-1 при определенных аналитических параметрах.

После качественного анализа сырья был проведен его количественный анализ на содержание полисахаридов, дубильных веществ, флавоноидов, кислот (фенолкарбоновых и органических). По методикам ГФ XI и ГФ XII [1, 2], определяли товароделовые показатели сырья, необходимые для расчета количественного содержания основных БАС. Выделение полисахаридов для количественного анализа проводили по методике Н.К. Кочеткова [4]. Очистку сырья от липофильных соединений осуществляли с помощью последовательного добавления хлороформа и 95% спирта. 3-х кратную экстракцию полисахаридов проводили, используя соотношение сырья и экстрагента 1:20, на водяной бане с обратным холодильником по 30 мин. Полученные водные извлечения объединяли, сгущали под вакуумом, осаждали 2-х кратным объемом 95% спирта. Осадок отделяли центрифугированием, высушивали при 40⁰С и взвешивали – получали водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПС). Шрот, полученный после отделения ВРПС, заливали водой, прибавляли концентрированную хлористоводородную кислоту и экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. После

охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтровали и осаждали 2-х кратным объемом 95% спиртом. Осадок отделяли центрифугированием, высушивали и взвешивали – получали пектиновые вещества (ПВ). Шрот после выделения ПВ экстрагировали 10% раствором натрия гидроксида при комнатной температуре в течение 12 часов. Извлечение фильтровали и осаждали 50% раствором уксусной кислоты – отделяли осадок гемицеллюлозы А. В фильтрате после отделения гемицеллюлозы Б осаждали гемицеллюлозу Б 2-кратным объемом 96% спирта. Все полученные фракции высушивали и взвешивали.

Для количественного определения дубильных веществ в водном извлечении из травы белокудренника использовали перманганатометрию с индикатором индигосульфокислотой [1, 2]. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту определяли спектрофотометрически по методике ГФ XI [1] при длине волны 325 нм. Аминокислотный состав определяли на аминокислотном анализаторе BiotronicLC-15001 на базе лаборатории патологии обмена веществ животных ГУП НИИЖК (г. Ставрополь) с использованием внутреннего стандарта. При работе с автоматизированным аминокислотным анализатором смесь аминокислот, получаемых после полного кислотного гидролиза в 6 М р-ре кислоты хлористоводородной, высушивали в сушильном шкафу при 105⁰С в течение 24 часов. Расчеты проводили по величине площади каждого пика с помощью логарифмической линейки, прилагаемой к анализатору. Наличие флавоноидов в сырье также подтверждали по УФ спектрам спирто-водного извлечения из травы белокудренника черного с 2% р-ром алюминия хлорида. При этом отмечен максимум поглощения при 430±2 нм, характерный для кверцетина. Для количественного определения суммы флавоноидов применили дифференциальную спектрофотометрию [1, 2].

Для определения антимикробной активности водного и спиртоводных извлечений (40%, 70% растворы этанола) из травы белокудренника черного использовали метод диффузии в агар (способ «колодец»), основанный на угнетении роста микроорганизмов исследуемым образцом [3]. Определение проводили по отношению к 10 тест-культурам. Для определения антимикробной активности использовали 24-часовые тест-культуры, выращенные на мясопептонном агаре. Микробные культуры смывали 2-3 мл физиологического раствора и готовили взвесь, содержащую 500 млн. микробных тел в 1 мл, по стандарту мутности. В лунки вносили по 0,1 мл испытуемого извлечения, в качестве контроля использовали растворитель в соответствующей концентрации. Результаты учитывали по диаметру зон задержки роста вокруг «колодца», включая диаметр самого колодца. Интерпретацию результатов проводили по следующим критериям: отсутствия зоны задержки роста – испытуемая культура не чувствительна к данной концентрации испытуемого образца; диаметр зоны задержки 10 мм – умеренная чувствительность;

диаметр задержки роста более 10 мм – высокая чувствительность испытуемой культуры к данной концентрации испытуемого образца.

Результаты. Было изучено анатомическое строение стебля, листа, цветка белокудренника черного. Покровной тканью стебля является эпидерма. Коровая часть неширокая, состоит из трех-четырех рядов клеток овальной формы, несколько тангентально удлинённых. В ребрах стебля наблюдаются мощные участки колленхимы. Паренхима коры, расположенная под ними, состоит из нескольких рядов вытянутых клеток. Осевая часть стебля отделена от коровой эндодермой, состоящей из крупных клеток овальной формы. Проводящая система образует сплошные кольца флоэмы и ксилемы, наиболее развитые в ребрах. Отдельными группами встречаются лубяные волокна. Сердцевина стебля состоит из тонкостенных округлых клеток с постепенно увеличивающимися размерами по направлению к центральной полости. Между клетками заметны трех-четырёхугольные межклетники. При микроскопическом исследовании поверхностных препаратов верхней и нижней эпидермы листа видно, что клетки верхней эпидермы крупные, слабоизвилистостенные, а нижней – глубокоизвилистостенные, более мелкие. На верхней эпидерме листа устьица отсутствуют. Здесь в значительном количестве встречаются простые двух-, реже трехклеточные толстостенные волоски с бородавчатой кутикулой, а также редко наблюдаются головчатые волоски на одноклеточной и трехклеточной ножке. На нижней эпидерме листа находятся устьица в значительном количестве. Они сопровождаются двумя, реже тремя-

четырьмя клетками. Здесь, в отличие от верхней эпидермы, встречаются простые одно- и двухклеточные более короткие волоски. Головчатые волоски на нижней и верхней эпидерме листа аналогичны. Редко встречаются эфирномасличные железки с крупными головками, характерными для семейства губоцветных (яснотковых). Внешняя эпидерма чашечки цветка состоит из извилистостенных клеток. Устьица – в незначительном количестве, сопровождаются двумя, очень редко четырьмя-шестью клетками. На внешней эпидерме в большом количестве встречаются простые короткие одноклеточные и двухклеточные (на жилках) волоски с бородавчатой кутикулой. Реже наблюдаются головчатые волоски с двухклеточной головкой на одноклеточной ножке. Внутренняя эпидерма состоит из сильно извилистостенных клеток. Устьица отсутствуют. В значительном количестве встречаются простые одноклеточные короткие волоски и двухклеточные с бородавчатой кутикулой, а также головчатые. Характерной особенностью чашечки цветка является наличие в средней части краев зубчиков головчатых волосков на длинной трех-четырёхклеточной ножке с крупной двухклеточной головкой.

Результаты определения величин влажности и экстрактивных веществ, полученных после экстракции травы белокудренника черного различными растворителями, приведены в табл. 1. Из данных, представленных в табл. 1 следует, что наибольшее количество экстрактивных веществ из травы белокудренника черного извлекается 40% этанолом.

Таблица 1. Товароведческие показатели травы белокудренника черного

Наименование показателя	Значение показателя, %
влажность	11,34 ± 0,14
экстрактивные вещества (вода очищенная)	10,65 ± 0,24
экстрактивные вещества (этанол, 40%)	20,43 ± 0,43
экстрактивные вещества (этанол, 70%)	19,40 ± 0,33
экстрактивные вещества (этанол, 95%)	12,45 ± 0,32

В водном извлечении травы белокудренника черного были обнаружены: полисахариды, дубильные вещества конденсированной структуры, тритерпеновые сапонины, органические кислоты (аскорбиновая, шавелевая, яблочная и янтарная). При изучении полисахаридов были идентифицированы водорастворимые полисахариды; пектиновые вещества, гемицеллюлоза А и гемицеллюлоза Б. В водном извлечении найдено 15 аминокислот (глутаминовая кислота, глицин, аланин, изолейцин, лейцин, треонин, валин, метионин, изолейцин, тирозин, гистидин). Кроме того, установлено, что сырье и водное извлечение из него богато биологически активными макро-, микро- и ультрамикроэлементами (всего найдено 20 биоэлементов), из которых 10 являются эссенциальными (К, Na, Са, Mg, Cu, Zn, Mn, Fe, Co, Li) и 4 – условно эссенциальными (Ni, Ti, V, Cr). При этом наибольшее содержание приходится на К, Са, Cr, Mg, P и Fe. В

спиртоводных извлечениях (40% и 70%) были обнаружены флавоноиды (рутин, кверцетин), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая и кофейная). Количественное содержание отдельных БАС в траве белокудренника черного составило: полисахаридов – 13,71% (в том числе: ВРПС – 3,45±0,08%; ПВ – 0,32±0,04%; ГЦА – 2,49 ±0,11%; ГЦБ – 7,47±0,12%), дубильных веществ в пересчете на танин – 9,44±0,25%; аминокислот – 11,82 мг/%; флавоноидов в пересчете на кверцетин – 1,82±0,07%; фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – 2,83±0,03%; кислоты аскорбиновой – 0,27±0,04%; органических кислот в пересчете на яблочную кислоту – 0,41±0,06%. Результаты изучения антимикробной активности извлечений из травы белокудренника черного представлены в табл. 2.

Таблица 2. Изучение антимикробной активности извлечений из травы белокудренника черного

Исследуемый объект	Диаметр задержки роста тест-культур микроорганизмов, мм									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
водное извлечение	9	7	-	6	-	-	3	-	-	-
извлечение (экстрагент 40% этанол)	14	17	10	11	20	23	25	-	-	-
извлечение (экстрагент 70% этанол)	10	-	-	11	-	-	14	-	-	-

Примечание: используемые тест культуры: 1. *Staphylococcus aureus*(209); 2. *Staphylococcus aureus* (Макаров); 3. *Staphylococcus aureus* (Type); 4. *Staphylococcus epidermidis* Wood-46; 5. *Escherichia coli* 675; 6. *Escherichia coli* 055; 7. *Salmonella galenarum*; 8. *Bacillus subtilis* L₂; 9. *Bacillus anthracoides* – 1; 10. *Bacillus anthracoides* – 96

Из данных, представленных в таблице 2 следует, что извлечения из травы белокудренника черного обладают антимикробной активностью в отношении стафилококков, бактерий кишечной группы и не оказывают действия на споровые культуры. Наибольшей активностью обладает вытяжка, полученная с помощью 40% этанола.

Выводы: данные проведенных исследований позволяют продолжить дальнейшее изучение и использование извлечения из травы белокудренника черного, полученного с помощью 40% этанола, в качестве потенциального антимикробного средства для лечения заболеваний, вызванных патогенными стафилококками, бактериями кишечной группы и протеей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Государственная фармакопея СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа/ МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1987. 336 с.
2. Государственная фармакопея РФ. 12-е изд. Ч.1. – М.: «Национальный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. 704 с.
3. Гунар, О.В. Определение антимикробного действия лекарственных веществ. Практические подходы / О.В. Гунар, Н.И. Каматова, Н.С. Евтушенко // Фармация. 2002. №2. С. 4-7.
4. Кочетков, Н.К. Химия биологически активных природных соединений. – М.: Наука, 1970. 631 с.
5. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: учеб. пособие. Под ред. Г.П. Яковлева и К.Ф. Блиновой. – СПб.: Спец.лит., 1999. 407 с.

STUDYING THE *BALLÓTA NÍGRA* L. HERB WITH THE PURPOSE OF CREATION THE NEW MEDICINES

© 2012 A.A. Kruglaya, S.G. Tiraspol'skaya, G.V. Al'fimova, O.V. Michnik, L.A. Michnik, M.V. Mazurina, T.A. Shatalova, Kh.N. Gyulbyakova

Pyatigorsk Branch of Volgograd State Medical University

The purpose of the work is identification the diagnostic features and studying the biologically active compositions of the *Ballóta Nígra* L. herb. In water extract of herb were found: polysaccharides, tannins of the condensed structure, saponins, amino acids, 20 microelements, organic acids (ascorbic, oxalic, malic and succinic acid). In alcohol ethyl extract (40% and 70%) were found flavonoids, phenolcarbolic acids. It is established that extraction from the *Ballóta Nígra* L. herb possesses antimicrobial activity in the relation of staphylococcus, bacteria of intestinal group.

Key words: *Ballóta Nígra* L. herb, tannins, flavonoids, polysaccharides, amino acids, saponins, organic acids, microelements, antimicrobial activity

Anna Kruglaya, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Pharmacognosy Department. E-mail: annandreiko@yandex.ru

Svetlana Tiraspol'skaya, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Pharmaceutical Chemistry Department. E-mail: maklea@yandex.ru

Galina Al'fimova, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Pharmaceutical Chemistry Department

Oleg Michnik, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Drugs Technology Department. E-mail: shata61@bk.ru

Lyudmila Michnik, Candidate of Pharmacy, Associate Professor at the Drugs Technology Department

Maiya Mazurina, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Biochemistry and Microbiology Department. E-mail: lameros@amik.ru

Tatiana Shatalova, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Drugs Technology Department

Khristina Gyulbyakova, Candidate of Pharmacy, Lecturer at the Pharmaceutical Chemistry Department. E-mail: xristnik@yandex.ru