

В. М. Петриченко, Т. В. Сухинина, Н. И. Шрамм,
Л. К. Бабиян, В. В. Юшков

ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ТРАВЫ ОЧАНКИ КОРТОКОВОЛОСИСТОЙ

Пермская государственная фармацевтическая академия

Изучено содержание влаги, золы, экстрактивных веществ и примесей в траве *Euphrasia brevipila*. Определено содержание действующих веществ – флавоноидов (3,56 – 6,81 %) и иридоидов (0,44 – 0,69 %). Оптимальным способом экстракции травы измельченной $> 0,25 \leq 2,0$ мм является метод реперколяции с использованием 40 % этанола и времени контакта фаз на каждой ступени 8 – 16 ч. Выход сухого экстракта, содержащего 19,84 % флавоноидов и 2,27 % иридоидов, составляет 14,75 %. Экстракт обладает противовоспалительной активностью в дозе 10 – 300 мг/кг. Острая токсичность ЛД₅₀ составляет 4470 мг/кг.

Очанка (о.) коротковолосистая (*Euphrasia brevipila* Burn, et Gremlí — семейство *Scrophulariaceae*), однолетнее полупаразитное растение, широко распространенное на территории России [1]. Надземная часть этого растения издавна применяется в народной медицине. Особенно часто ее используют для лечения катаракты, глаукомы и при воспалительных заболеваниях глаз (конъюнктивиты, блефариты) [2]. Водные извлечения из очанки оказывают гипотензивное [3] и гепатопротекторное действие [4].

Проведенные нами исследования показали, что преобладающими группами биологически активных веществ (БАВ) о. коротковолосистой являются иридоиды [5], флавоноиды [6] и фенолкарбоновые кислоты [7].

Виды рода Очанка являются перспективными растениями для введения в медицинскую практику и разработки на их основе лекарственных препаратов и биологически активных добавок. Некоторые из них включены в фармакопеи Западных стран так, например, трава о. Ростковиуса является официальным сырьем в Польше и Германии.

Цель настоящего исследования — разработка технологии получения сухого экстракта из травы о. коротковолосистой, содержащего различные группы БАВ и оценка его фармакологической активности.

Материалы и методы

Для исследования использовали надземную часть с корнями о. коротковолосистой, заготовленную в фазу цветения — начало плодоношения и высушенную воздушно-теневым способом.

Числовые показатели заготовленного сырья определяли в соответствии с требованиями ГФ XI [8].

Содержание флавоноидов в сырье и экстракционных препаратах определяли методом дифференциальной спектрофотометрии по реакции с алюминия хлоридом в пересчете на цинарозид [9], содержание иридоидов проводили фотоэлектроколориметрическим методом Грегера и Симхена [10] в пересчете на аукубин. Количество экстрактивных веществ, переходящих в извлечение, оценивали по сухому остатку, кото-

Таблица 1

Результаты товароведческого анализа цельного сырья очанки коротковолосистой, %

Обра- зец	Влаж- ность	Зола		Содержание экстрактивных веществ			Примеси		Почернев- ших, побуре- вших частей	Стеблей без листьев, в том числе отделен- ных при анализе	Содержание БАВ		
		общая	нерастворимая в 10 % HCl	вода	этанол			органиче- ская			минераль- ная	флавоноиды	иридоиды
					40 °	70 °	90 °						
1	7,45	7,24	0,50	33,84	37,77	37,93	23,05	1,02	0,32	–	0,61	4,95 ± 0,03	0,49 ± 0,02
2	7,27	6,78	0,64	38,23	42,60	40,71	25,62	2,91	0,85	–	0,93	5,60 ± 0,04	0,53 ± 0,01
3	7,27	8,47	0,81	38,25	41,49	44,03	28,09	0,94	0,36	–	0,82	6,75 ± 0,04	0,69 ± 0,03
4	7,68	13,07	5,85	27,95	37,28	32,35	20,46	1,01	0,67	0,91	3,34	3,56 ± 0,03	0,57 ± 0,05
5	7,64	7,74	2,28	32,20	40,45	35,97	24,69	2,35	0,38	–	1,83	5,40 ± 0,04	0,59 ± 0,02
6	6,85	8,45	0,08	30,97	30,24	30,58	21,55	1,33	0,23	0,33	0,54	3,59 ± 0,03	0,44 ± 0,02
7	6,83	7,29	0,19	31,45	33,39	31,99	24,14	1,42	0,42	0,42	1,25	4,21 ± 0,04	0,45 ± 0,04
8	6,95	10,15	0,53	30,53	27,57	25,08	17,46	0,82	0,44	0,11	1,84	5,54 ± 0,04	0,62 ± 0,05
9	7,03	7,53	0,08	33,55	34,67	30,95	24,52	1,80	0,70	0,50	0,20	5,12 ± 0,04	0,66 ± 0,03
10	6,73	7,43	0,15	31,31	30,47	27,63	21,68	0,70	0,30	–	0,60	6,81 ± 0,04	0,67 ± 0,04

Таблица 2
Соотношение фаз и содержание биологически активных веществ в извлечениях из травы очанки коротковолосистой в зависимости от степени измельченности сырья, %

Степень измельчения сырья, мм	Соотношение фаз (сырье – экстрагент)	Содержание в извлечениях, %		
		флавоноидов	иридоидов	экстрактивных веществ
$> 0,25 \leq 2,0$	1:4,3	1,23	0,27	6,5
$> 0,25 \leq 7,0$	1:4,9	0,92	0,14	4,5
$> 0,25 \leq 10,0$	1:5,2	0,66	0,13	3,6

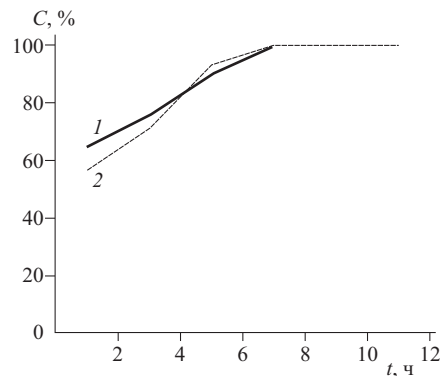
рый определяли по методике ГФ XI [8] и выражали в процентах от содержания в сырье или извлечениях.

Определение противовоспалительной активности экстракционных препаратов проводили на беспородных крысах обоего пола массой 180 – 200 г по общепринятой методике [11]. Асептическое воспаление конечности вызывали субплантарным введением в правую заднюю лапу крысы 0,1 мл 1 % раствора каррагинена. Водный раствор сухого экстракта вводили перорально в дозах 10, 50, 150, 300 мг/кг в объеме 1 мл на 100 г массы животного за 1 ч до моделирования воспаления. Статистическую обработку данных фармакологического эксперимента проводили по критерию Стьюдента, эффект считали достоверным при $p \leq 0,05$ [12].

Острую токсичность определяли при пероральном введении на нелинейных белых мышках массой 17 – 25 г. Экстракт вводили в виде водного раствора или суспензии из расчета 0,5 мл на 10 г массы в возрастающих дозах. Результаты обрабатывали по методу Прозоровского с вычислением средней смертельной дозы (ЛД₅₀) при $p \leq 0,05$ [13].

Результаты и их обсуждение

Количественные показатели сырья приведены в табл. 1. Как видно из приведенных результатов, наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается 40 % этиловым спиртом. Содержание флавоноидов находится в пределах от 3,56 до 6,81 %; иридоидов — от 0,44 до 0,69 %. Различия в содержании БАВ, вероятно,



Содержание БАВ в извлечениях очанки коротковолосистой в зависимости от времени экстракции. 1 — флавоноиды; 2 — иридоиды; по оси абсцисс — время экстракции в часах; по оси ординат — концентрация в % от равновесного содержания

связаны с уклоняющимся типом питания (растение полупаразит) и экологическими условиями произрастания. Так как в качестве сырья используется надземная часть с корнями, то отмечается повышенное содержание золы нерастворимой в 10 % соляной кислоте (0,08 – 5,85 %). Специфическими показателями качества сырья очанки, связанными с морфологическими особенностями производящего растения, являются стебли без листьев, в том числе отделенных при анализе, а также наличие почерневших и побуревших частей, что обусловлено химической деструкцией иридоидных веществ в процессе сушки [10]. Остальные показатели находятся в пределах величин, предъявляемых к качеству различных видов лекарственного растительного сырья, и отражают специфику качества травы о. коротковолосистой.

С целью выбора оптимальных условий получения сухого экстракта было изучено влияние ряда факторов (концентрации этанола, степени измельченности сырья, способа получения, времени контакта фаз) на извлечение биологически активных и экстрактивных веществ из травы о. коротковолосистой. В качестве экстрагента нами были использованы вода и этанол в концентрации 40, 70 и 90 %. Экспериментально установлено, что максимальное количество флавоноидов извлекается 70 %, а иридоидов 40 % этиловым спир-

Таблица 3
Выход биологически активных и экстрактивных веществ в извлечениях из травы очанки коротковолосистой, полученных различными способами

№	Способ и условия экстрагирования	Выход, в % от содержания в сырье		
		флавоноиды	иридоиды	экстрактивные вещества
1	Ремацерация с делением экстрагента на 4 части, время контакта фаз: 1 ступень 24 ч, последующие 2 ч	47,44	52,31	36,49
2	Реперколяция в батарее из 4-х перколяторов, с равной загрузкой сырья и законченным циклом, время контакта фаз 8 – 16 ч	62,53	70,12	40,61
3	Перколяция при скорости слива, равного 1/48 объема перколятора за 1 ч	50,80	36,67	45,06
4	Вихревая экстракция при скорости вращения мешалки 5000 об/мин	30,09	59,62	32,77
5	Фильтрационная экстракция при фильтровании экстрагента через слой сырья (разряжение 0,5 атм.)	33,03	65,38	36,07

Противовоспалительная активность сухого экстракта очанки коротковолосистой

Препарат	Доза, мг/кг	Число животных	Торможение отека, %	
			через 3 ч	через 5 ч
Сухой экстракт	10	6	44***	23*
	50	6	51***	50***
	150	6	64**	49**
	300	6	66*	53**
Индометацин	10	6	30***	52**
Контроль (вода)		7	—	—

* $p < 0,05$.
** $p < 0,02$;
*** $p < 0,01$.

том. Учитывая близкие результаты при использовании 40 и 70 % этилового спирта, а также то, что при использовании 70 % этанола извлекаются липофильные вещества, ухудшающие качество сухого экстракта, для дальнейших исследований мы выбрали 40 % этанол.

Для выявления оптимальной степени измельченности растительного сырья использовали траву, измельченную до 2,0; 7,0 и 10,0 мм. Извлечение получали настаиванием сырья с 40 % этанолом в течение 24 ч. Параллельно определяли соотношение фаз (сырье – экстрагент), обеспечивающее величину зеркала над слоем сырья. Результаты исследования приведены в табл. 2.

Из данных табл. 2 следует, что оптимальной степенью измельчения сырья по выходу флавоноидов, иридоидов и экстрактивных веществ является размер частиц $> 0,25 \leq 2$ мм.

С целью определения условий, обеспечивающих максимальный выход БАВ, были изучены различные способы экстрагирования сырья 40 % этанолом [14]. Результаты определения БАВ в извлечениях и условия экстракции приведены в табл. 3.

Как видно из представленных данных, максимальный выход биологически активных веществ (флавоноидов 62,53 % и иридоидов 70,12 %) отмечается при использовании метода реперколяции. Выход экстрактивных веществ при использовании различных методов экстракции находится в пределах 32,77 – 45,06 % от содержания в сырье. Учитывая важную роль флавоноидов и иридоидов в фармакологическом эффекте, для получения сухого экстракта был выбран метод реперколяции.

При определении времени контакта фаз в процессе экстракции важное значение имеет время наступления равновесного состояния в системе твердое тело – жидкость. Этот показатель мы определяли путем настаивания серии навесок сырья с 40 % этанолом до прекращения прироста концентрации БАВ в вытяжках [14]. Определение концентраций флавоноидов и иридоидов проводили через каждые 2 ч. Результаты представлены на рисунке.

Как следует из приведенных данных (рисунок), равновесие в системе по всем определяемым группам БАВ устанавливается в течение 8 ч.

Вытяжку для сухого экстракта получали из травы о. коротковолосистой, измельченной до 2 мм, методом реперколяции с делением сырья на равные части, с законченным циклом в батарее из четырех перколяторов. В качестве экстрагента использовали 40 % этиловый спирт, соотношение фаз, обеспечивающее оптимальную величину “зеркала” над поверхностью сырья в перколяторе, составляло 1:4,3, время контакта фаз на каждой ступени экстракции 8 – 16 ч.

Полученные вытяжки отстаивали двое суток при $t = 8 - 10$ °С, фильтровали, сгущали в роторном выпарном аппарате при $t = 70$ °С и остаточном давлении 40 – 50 мм рт. ст. Густую массу сушили в сушильном шкафу при $t = 80 - 90$ °С. Выход сухого экстракта составил 14,75 % от массы исходного сырья.

Сухой экстракт представляет сыпучую гигроскопическую массу темно-коричневого цвета, с характерным специфическим запахом. Содержание флавоноидов в экстракте составляет $19,84 \pm 0,07$ %; иридоидов $2,27 \pm 0,21$ %; влажность $3,1 \pm 0,01$ %.

Результаты испытания сухого экстракта на противовоспалительную активность приведены в табл. 4.

Как следует из приведенных данных, сухой экстракт очанки во всех исследуемых дозах проявил противовоспалительное действие. При этом противовоспалительный эффект зависит от используемой дозы. Если при введении экстракта в дозе 10 мг/кг торможение отека составляет 44 %, то увеличение дозы испытуемого экстракта сопровождается повышением активности. Так, введение экстракта в дозах 50, 150 и 300 мг/кг угнетает развитие отека на 50, 64 и 66 % по сравнению с данными контрольной группы. Препарат сравнения (индометацин) в данных условиях оказывает аналогичное противовоспалительное действие.

Острая токсичность сухого экстракта о. коротковолосистой ЛД₅₀ составляет 4470 (3700 – 5900) мг/кг и позволяет отнести его к группе низко токсичных препаратов [15].

Таким образом, в результате проведенных исследований установлены основные товароведческие показатели качества сырья очанки коротковолосистой. На основании изучения экстракционных свойств травы определены оптимальные условия получения сухого экстракта. Выявлена противовоспалительная активность и низкая токсичность сухого экстракта о. коротковолосистой. Полученные данные открывают перспективы для более глубоких исследований и внедрения сухого экстракта в качестве противовоспалительного средства.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Флора Европейской части СССР* (ред. АН. А. Федорова, Р. В. Камелина), Наука, Ленинград (1981), сс. 268 – 281.
2. *Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Caprifoliaceae — Plantaginaceae*, Наука, Ленинград (1990), сс. 139 – 141.
3. Н. Я. Юсупова, *Дисс ... канд. мед. наук*, Ташкент (1956).

4. Е. И. Гришина, А. В. Гришин, Н. В. Кармацкая, *Лекарственные растения Алтайского края*, Томск (1986), сс. 46 – 49.
5. Т. В. Сухинина, В. М. Петриченко, С. Н. Лепина, *Материалы юбилейной межвуз. научно-практ. конференц.*, Пермь (2000), с. 195.
6. Т. В. Сухинина, В. М. Петриченко, В. Д. Белоногова и др., *Материалы междунаро. науч. конференц., посвящ. 80-лет. со дня образования ЕНИ при ПГУ (18 – 22 сентября 2001 г.)*, Пермь (2001), Т. 1, сс. 206 – 210.
7. Т. В. Сухинина, Т. С. Шестакова, В. М. Петриченко, *Материалы X Всерос. науч.-практ. конф. (25 – 27 апреля 2002 г.)*, Ч.2, Пермь (2002), сс. 181 – 187.
8. *Государственная фармакопея СССР*, 11-е изд. Вып. 1 и 2. Медицина, Москва (1987 и 1990).
9. В. М. Петриченко, Т. В. Сухинина, Н. С. Фурса, *Раст. ресурсы*, **38(2)**, 104 – 109 (2002).
10. D. Groger and P. Simchen, *Die Pharmazie*, **22(6)**, 315 – 317 (1967).
11. *Методические рекомендации по экспериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ*, МЗ СССР, Москва (1982).
12. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Медгиз, Ленинград (1963).
13. В. В. Прозоровский, М. П. Прозоровская, В. М. Демченко, *Фармакол. и токсикол.*, № 4, 497 – 552 (1978).
14. В. Д. Пономарев, *Экстрагирование лекарственного сырья*, Медицина, Москва (1976).
15. Н. Ф. Измеров, И. В. Санацкий, К. К. Сидоров, *Параметры токсиметрии промышленных ядов при однократном воздействии*, Медицина, Москва (1977), сс. 196 – 197.

Поступила 19.12.02.

THE TECHNOLOGY OF THE PREPARATION OF THE DRY EXTRACT FROM HERB EUPHRASIA BREVIPILA AND ITS PHARMACOLOGICAL PROPERTIES

V. M. Petricheko, T. V. Suhinina, N. I. Shramm, L. K. Babiyan, V. V. Ushkov

The Perm State Pharmaceutical Academy

The content of moisture, zones, extractive substances and impurities in the herb *Euphrasia brevipila* has been studied. It has been also determined the content of acting substances – flavonoids (3,56 – 6,81%) and iridoids (0,44 – 0,69%). The optimum way of the extracting herb sectioned to $> 0,25 \leq 2,0$ mm was the method of repercolation with the using 40% aethanol and contact time of phases at every stage 8 – 16 hours. The yield of dry extract, containing 19,84% of flavonoids and 2,27% of iridoids was 14,75%. This extract possessed antiinflammatory activity.