

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ПЕРМСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ АКАДЕМИЯ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

*На правах рукописи*

**СКРЯБИНА ЕВГЕНИЯ НИКОЛАЕВНА**

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ И  
БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И  
МАРЬЯННИКА ЛУГОВОГО**

**14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия**

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:  
кандидат фармацевтических наук  
доцент Е.Е. ГАЛИШЕВСКАЯ

Пермь – 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	Стр
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	4
<b>ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР</b>	12
1.1. Систематическое положение и распространение растений рода Марьянник	12
1.2. Биологические особенности и морфологическая характеристика марьянника лесного и лугового	14
1.3. Химический состав растений рода Марьянник	17
1.4. Биологическая активность и применение марьянников в научной и народной медицине	19
Выводы	23
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	24
2.1. Объекты исследования	24
2.2. Метод ресурсоведческого исследования	26
2.3. Методы анатомического исследования	26
2.4. Методы химического исследования	27
2.4.1. Качественные реакции	27
2.4.2. Хроматографические методы исследования	30
2.4.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография	30
2.4.2.2. Газожидкостная хроматография	32
2.4.2.3. Тонкослойная хроматография	34
2.4.2.4. Бумажная хроматография	35
2.4.3. Спектральные методы исследования	36
2.4.3.1. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области спектра	36
2.4.3.2. Фотоэлектроколориметрия	38
2.4.3.3. Атомно-эмиссионная спектрометрия	38
2.5. Методы фармакологического исследования	38
2.5.1. Метод исследования антикоагулянтной активности	39
2.5.2. Метод исследования противосудорожной активности	39
2.5.3. Метод исследования седативной активности	40
2.5.4. Метод исследования нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активности	41
2.5.5. Испытания на острую токсичность	42
2.6. Статистическая обработка результатов эксперимента	42
<b>ГЛАВА 3: РЕСУРСОВЕДЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И ЛУГОВОГО</b>	43

3.1. Флористический состав растительных сообществ	43
3.2. Ресурсоведческая характеристика	45
Выводы	48
<b>ГЛАВА 4: ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО В СРАВНЕНИИ С МАРЬЯННИКОМ ЛУГОВЫМ</b>	49
4.1. Анатомическое строение листа	49
4.2. Анатомическое строение стебля	51
4.3. Анатомическое строение корня	52
4.4. Анатомическое строение семян	55
Выводы	57
<b>ГЛАВА 5. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ГРУПП БАВ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЫРЬЯ И ЭКСТРАКТОВ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И ЛУГОВОГО</b>	58
5.1. Качественный анализ на содержание основных групп БАВ	58
5.2. Анализ фенольных соединений	62
5.3. Анализ иридоидов	76
5.4. Аминокислотный состав	80
5.5. Изучение жирных кислот в семенах марьянника лесного и марьянника лугового	87
5.6. Изучение элементного состава	89
Выводы	93
<b>ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ТРАВЫ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И ЛУГОВОГО</b>	94
6.1. Изучение антикоагулянтной активности	94
6.2. Изучение противосудорожной активности	97
6.3. Изучение седативной активности	100
6.4. Изучение нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активности	106
6.5. Испытания на острую токсичность	113
Выводы	114
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	115
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	117
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ</b>	132
Приложение 1	133
Приложение 2	138
Приложение 3	139

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Одной из актуальных проблем современной фармацевтической науки является поиск новых эффективных лекарственных препаратов для лечения сердечно-сосудистых патологий и заболеваний нервной системы. Настоящие заболевания часто протекают в хронической форме и являются причиной смерти. Нередко при лечении хронических форм заболеваний требуется длительный прием лекарственных средств. В таком случае важную роль играют фитопрепараты, которые имеют ряд преимуществ по сравнению с синтетическими, а именно мягкость действия, малая токсичность, редкая частота возникновения аллергических реакций. Важным аспектом при этом является поиск и внедрение в научную медицину новых видов лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе.

Источниками для поиска новых лекарственных растений являются растения народной медицины, а также близкие по систематическому ряду. С этой точки зрения, особый интерес представляют растения семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae*), обладающие многосторонней биологической активностью и применяемые при лечении различных заболеваний, в том числе и патологий сердечно-сосудистой системы, такие как растения рода Наперстянка (*Digitalis*), вероника лекарственная (*Veronica officinalis* L.), коровяк скипетровидный (*Verbascum densiflorum* Bertol.) (Никонов Г. К., 2005). Для марьянника лугового (*Melampyrum pratense* L.), одного из представителей данного семейства, ранее было доказано наличие гипотензивной, противосудорожной, антикоагулянтной активности (Галишевская Е.Е., 2004). Марьянник лесной (*Melampyrum sylvaticum* L.) является близким морфологическим видом к марьяннику луговому. Оба марьянника применяются в народной медицине при лечении сердечно-сосудистых патологий и заболеваний нервной системы. При этом низкая изученность марьянника лесного не позволяет ввести его в научную медицину. В связи с этим является актуальным комплексное изучение сырья марьянника лесного, а также лекарственных средств на его основе.

**Степень разработанности.** На сегодняшний день растения рода Марьянник широко применяют в народной медицине многих стран при лечении заболеваний нервной системы, сердечно-сосудистых патологий и ряда других заболеваний (Tennant D.J., 2008, Masuya H. и др., 2005, Стрижов А.Н., 2007, Растительные ресурсы СССР, 1990). В нашей стране широко изучали марьянник луговой и марьянник гребенчатый в 60-70-х годах XX-века в Башкирском медицинском институте (Каримова С.Г., 1961, 1968, 1974, 1983, Каримова С.Г., Лазарева Д.Н., 1971, Лазарева Д.Н., Зарудий Ф.С., 1961), в 2000-х годах – марьянник луговой в Пермской фармацевтической академии (Галишевская Е.Е., 2004). Было установлено наличие противосудорожной, седативной, противомикробной, антиагрегационной активности, а также положительное влияние марьянников при лечении сердечно-сосудистых патологий. Доказана перспективность введения марьянника лугового в научную медицину.

Марьянник лесной, близкий морфологический вид марьянника лугового, является малоизученным, при этом также применяется в народной медицине. Сведений о его морфолого-анатомических особенностях, химическом составе, биологической активности не достаточно для введения марьянника лесного в научную медицину.

**Цель и задачи исследования.** Целью нашей работы являлось сравнительное комплексное фармакогностическое изучение двух морфологически близких видов, произрастающих на территории России, марьянника лесного и лугового, изучение их биологической активности для введения в научную медицину и получения средства, применяемого при лечении заболеваний нервной и сердечно-сосудистой систем.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи:**

1. Провести ресурсоведческое исследование и дать сравнительную характеристику запасов сырья марьянника лесного и лугового в центре ареала произрастания и в наиболее типичных растительных сообществах.

2. Выявить общие анатомические и анатомодиагностические признаки марьянника лесного и лугового.

3. Изучить в сравнении качественный состав сырья и экстрактов марьянника лесного и лугового.

4. Определить количественное содержание основных групп биологически активных веществ (БАВ) в траве и экстрактах марьянника лесного и лугового.

5. Провести фармакологический скрининг экстрактов марьянника лесного и лугового.

6. Разработать фармакопейную статью (ФС) «Марьянника лесного трава».

**Научная новизна работы.** Впервые проведены ресурсоведческие исследования марьянника лесного в центре ареала распространения на территории России. Доказана возможность промышленной заготовки марьянника лесного травы.

Впервые проведено анатомическое изучение марьянника лесного, которое позволило выявить анатомодиагностические признаки, позволяющие отличить его от близкородственного вида марьянника лугового.

Проведен фитохимический анализ травы и изучена динамика накопления БАВ по органам марьянника лесного.

Впервые обнаружены флавоноиды в траве и органах марьянника лесного, идентифицированы цинарозид и гиперозид. Впервые проведен качественный и количественный анализ аминокислотного состава марьянников сырья. Установлено наличие глутаминовой кислоты, глицина, фенилаланина, лизина.

Определено количественное содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид, иридоидов – в пересчете на аукубин, аминокислот – в пересчете на глутаминовую кислоту.

Изучен микроэлементный состав травы и органов марьянника лесного и состав жирного масла семян.

Исследование качественного и количественного состава основных групп БАВ позволило обосновать использование всей надземной части с корнями марьянника лесного.

Впервые установлено прямое антикоагулянтное действие суммы фенольных соединений, оказывающих влияние на плазменные факторы свертывания.

Доказано наличие седативной и противосудорожной активности, подтверждающие литературные данные об использовании марьянников в народной медицине. Установлено нейромодуляторное антиалкогольное действие экстрактов марьянника лесного.

Изучена острая токсичность экстрактов марьянника лесного травы, определен четвертый класс (вещества малотоксичные) по ГОСТ.

Научная новизна диссертационных исследований подтверждена патентом РФ № 2613312 «Способ получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейропротекторной антиалкогольной активностью».

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Научно обоснована целесообразность использования травы марьянника лесного наряду с марьянником луговым для получения препаратов антикоагулянтного, седативного, нейромодуляторного антиалкогольного и противосудорожного действия. Для стандартизации травы и экстрактов марьянника лесного обоснован выбор методик количественного определения суммы флавоноидов, иридоидов, аминокислот.

Результаты исследования внедрены в учебный процесс на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. На основании данных фитохимического, фармакологического, морфолого-анатомического анализов разработан проект фармакопейной статьи (ФС) «Марьянника лесного трава».

**Методология и методы диссертационного исследования.** Методология диссертационного исследования построена на изучении и обобщении литературных данных по фармакогностическому изучению и биологической активности растений рода *Melampyrum*, оценке степени разработанности и актуальности темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения всех этапов диссертационной работы; научно обоснован выбор объектов и современных методов исследования.

Объектами исследования являлись трава с корнями однолетних дикорастущих растений марьянника лесного (*Melampyrum sylvaticum* L.) и марьянника лугового (*Melampyrum pratense* L.) семейства Норичниковые (*Scrophulariaceae*), а также сухие спиртовые экстракты, сухие водные экстракты, высокоочищенные фракции флавоноидов и иридоидов марьянников лесного и лугового. В процессе исследования использованы методы цифровой микроскопии, бумажной (БХ), колоночной, газожидкостной хроматографии (ГЖХ), хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ), высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), фотоэлектроколориметрии (ФЭК), спектрофотометрии в видимой и УФ-области спектра, атомно-эмиссионной спектрометрии. Также использовались пробирочные реакции, фармакологические методы исследования. Математическая обработка данных проводилась с использованием современных компьютерных технологий.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. Результаты ресурсоведческого исследования марьянника лесного и лугового в центре ареала распространения на территории России.
2. Результаты анатомического исследования марьянника лесного.
3. Результаты фитохимического исследования травы и экстрактов марьянника лесного и лугового.
4. Результаты фармакологического скрининга экстрактов марьянника лесного и лугового.

**Степень достоверности.** Достоверность полученных результатов проведенного исследования основана на экспериментальных данных, полученных с помощью цифровой микроскопии, БХ, ТСХ, ГЖХ, ВЭЖХ, спектрофотометрии в видимой и УФ-области спектра, ФЭК, атомно-эмиссионной спектрометрии, фармакологических тестов. Статистическая обработка данных проводилась в соответствии с государственной фармакопеей XIII Российской Федерации с применением программ Microsoft Office Excel 2007, STAT.

**Апробация полученных результатов.** Основные положения работы доложены и обобщены на научно-практических конференциях «76 Всероссийская

научная конференция студентов и молодых ученых с международным участием» (Курск, 2011), «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, 2011), «Научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии» (Пермь, 2011), «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami – 2011» (1, 2011), «Фармакологическая наука – от теории к практике» (Казань, 2015).

**Внедрение результатов исследования.** Теоретические положения и результаты экспериментальных исследований используются в учебном процессе и научно-исследовательской работе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Пермской государственной фармацевтической академии. Подготовлен к рассмотрению проект ФС «Марьянника лесного трава». Получен 1 патент РФ на изобретение «Способ получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью».

**Личный вклад автора.** Автор непосредственно участвовал в проведении научных экспериментов, обработке и интерпретации экспериментальных данных, в апробации результатов исследования, подготовке основных публикаций по выполненной работе, написанию диссертации и автореферата.

**Связь темы исследования с планом основных научно-исследовательских работ академии.** Работа выполнена в рамках комплексной научной темы кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России. Номер государственной регистрации – 01.9.10018875

**Соответствие паспорту специальности.** Работа соответствует специальности 14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по нескольким областям:

1. Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье.
2. Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка

методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

**Публикации по теме диссертации.** По материалам исследования опубликовано 14 научных работ, из них 5 в журналах, включенных ВАК Минобрнауки РФ в перечень рецензируемых научных изданий. Получен 1 патент РФ на изобретение.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 139 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, четырех глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, заключения, приложения. Работа иллюстрирована 37 таблицами и 46 рисунками. Библиографический указатель включает 133 источника, из них 20 на иностранных языках.

Во введении изложена актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, обозначена новизна и практическая значимость проведенных исследований; описаны положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы: систематическое положение, распространение рода *Melampyrum* L. и видов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. в Российской Федерации и за рубежом, ботаническое описание; химический состав и биологические свойства основных активных компонентов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L., данные о применении растений рода Марьянник в народной медицине и экспериментальной фармакологии, обоснование перспективности изучения *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. и разработки на их основе фитопрепаратов направленного действия.

Вторая глава включает описание объектов и методов исследования.

В третьей главе приведены результаты ресурсоведческого исследования марьянника лесного в сравнении с марьянником луговым.

В четвертой главе отражены результаты анатомического исследования марьянника лесного.

В пятой главе отражены результаты исследований качественного и количественного состава БАВ травы и экстрактов марьянника лесного и лугового; определения состава фенольных соединений, иридоидов, аминокислот, жирных кислот, микроэлементов.

В шестой главе приведен фармакологический скрининг экстрактов марьянника лесного и лугового.

В приложении представлен проект ФС, акт внедрения полученных результатов, патент РФ на изобретение.

## ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

### 1.1. Систематическое положение и распространение растений рода Марьянник

Род Марьянник *Melampyrum* L. (*M.*) относится к семейству Норичниковые *Scrophulariaceae*. Представители данного семейства широко распространены по всему земному шару [103, 109]. Род Марьянник (*m.*) насчитывает от 35 до 50 видов, распространенных в странах как Южного, так и Северного полушария, но в основном в Евразии. Виды, наиболее часто встречающиеся в странах Северного полушария, представлены в таблице 1 [107, 108].

Таблица 1

Распространение видов *Melampyrum* L. в мире и на территории России

Вид	Распространение		Литература
	в мире	в России	
Марьянник полевой <i>Melampyrum arvense</i> L.	Европа, Турция	Европейская часть России, Кавказ, Западная Сибирь	103, 109, 123
Марьянник гребенчатый <i>Melampyrum cristatum</i> L.	Европа, Средняя Азия, Малая Азия	Европейская часть России, Кавказ, Сибирь	103, 109, 123
Марьянник дубравный <i>Melampyrum nemorosum</i> L.	Европа	Европейская часть России, Восточная Сибирь	103, 109, 123
Марьянник луговой <i>Melampyrum pratense</i> L.	Европа, включая Арктику, Малая Азия	Европейская часть России, Сибирь	103, 109, 123
Марьянник розовый <i>Melampyrum roseum</i> Maxim.	Китай, Япония, Корея	Дальний Восток России	103, 109, 121
Марьянник щетинистый <i>Melampyrum setaceum</i> (Maxim.) Nakai	Китай, Корея, Япония	Дальний Восток России	103, 109
Марьянник лесной <i>Melampyrum sylvaticum</i> L.	Европа, включая Арктику	Европейская часть России	103, 109, 123

На территории России наиболее часто встречаются четыре вида рода Марьянник: *M. sylvaticum* L., *M. pratense* L., *M. nemorosum* L., *M. cristatum* L. [31, 103].

Ранее было изучено распространение, химический состав и фармакологическая активность м. гребенчатого, м. дубравного и м. лугового [12, 38, 39, 40,]. При этом м. лесной остается мало изученным видом. Согласно литературным данным м. луговой и м. лесной имеют перекрывающийся ареал, произрастают в сходных местообитаниях, часто образуя совместные заросли.

М. лесной в Европе встречается от Исландии и Скандинавии до бывшего СССР, в Альпах, на Пиренеях и простирается до центральной Италии, Болгарии и Балкан (рис. 1); м. лесной является эндемичным видом данной территории [131].



Рис. 1. Распространение *M. sylvaticum* и *M. pratense* на территории Европы [124]

М. луговой произрастает на всей территории Европы от Скандинавии до западного Средиземноморья и Балкан (рис. 1).

В России м. лесной встречается в европейской части [103, 107, 109], м. луговой – в арктической Европе, европейской части, западной и восточной Сибири [103, 107, 109, 123] (рис. 2). Обитает *M. sylvaticum* в смешанных и хвойных лесах, в кустарниках по берегам озер, рек, на заболоченных лугах и лесных луговинах [32, 31, 103, 107, 120, 130].

*M. pratense* обитает в тундре, смешанных и лиственных лесах, на полянах, лесных, разнотравных, а также болотистых лугах, сфагновых и ключевых болотах, по берегам морей, озер [103].



Рис. 2. Ареал распространения *M. sylvaticum* и *M. pratense* на территории России [5]

- - *M. pratense*
- ▨ - *M. sylvaticum* и *M. pratense*

Представленные данные обосновывают целесообразность изучения биологических особенностей, химического состава, фармакологической активности малоизученного м. лесного в сопоставлении с экологически близким видом – м. луговым.

## 1.2. Биологические особенности и морфологическая характеристика марьянника лесного и лугового

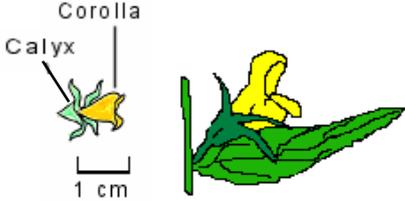
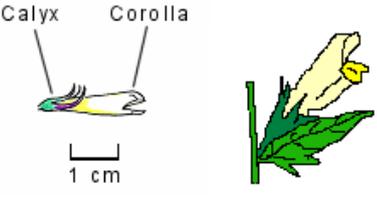
Марьянники являются облигатными однолетними полупаразитами, с помощью корневых гаусторий получают минеральные вещества и воду от растений-хозяев. Растениями-хозяевами м. лугового могут выступать любые из таких деревьев как береза пушистая (*Betula pubescens* Ehrh.), лещина обыкновенная (*Corylus avellana* L.) и рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), или кустарники, такие как вереск обыкновенный (*Calluna vulgaris* (L.) Hull) и черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) [131]. Хотя травянистые растения произрастают рядом с м. луговым, они маловероятно могут относиться к растениям-хозяевам. М. луговой никогда не произрастает один, но его всегда обнаруживают около деревьев или специфических кустарников. Однако, травянистые растения, включая некоторые виды трав, например трясунка средняя

(*Briza media* L.) и м. луговой выступали как растения-хозяева для м. лесного, в дополнение к древесным кустарникам, упомянутым выше [131]. М. лесной встречается на несколько более богатых питательными веществами почвах, чем м. луговой. В местах его обитания произрастают те же виды растений, а также м. луговой, и эти растений, вероятно, выступают в роли растения-хозяина для м. лесного [131]. Полупаразитная организация м. лесного и м. лугового позволяют им получать воду, неорганические и органические растворы от растения-хозяина с помощью гаусторий, структура которых создает неразрывную связь между ксилемой хозяина и корнями паразита. Полупаразиты способны также автотрофно питаться с помощью обычных процессов фотосинтеза, проходящих в основном в листьях. М. лесной в значительной мере использует листья для получения углеводов, большая площадь поверхности листьев способствует поддержанию высоких темпов транспирации. Транспирация полупаразитов определяет скорость, с которой ресурсы могут быть транспортированы от хозяина, и требуется, чтобы водный потенциал паразитов был ниже, чем у хозяина, что обеспечит непрерывный поток воды и растворенных веществ из ксилемы хозяина в растение-паразит [119]. Зависимость м. лугового как мелкокорневого растения от древесных растений является выгодной в период засухи. То же, несомненно, относится и к м. лесному [131].

Исследования ученых также подтверждают, что марьянники имеют узкий круг растений-хозяев. Так лучшими хозяевами для *M. sylvaticum* являются черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.) и ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.) [37], а для *M. pratense* в качестве хозяев выступают тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.), буквица лекарственная (*Betonica officinalis* L.), тмин обыкновенный (*Carum carvi* L.), чина лесная (*Lathyrus sylvestris* L.), девясил высокий (*Inula helenium* L.), кровохлебка лекарственная (*Sanguisorba officinalis* L.), растения рода Колокольчик (*Campanula*) [41, 52, 101].

М. лесной имеет достаточные отличия в морфологическом строении, тем не менее, его часто путают с м. луговым (рис. 3, 4, табл. 2) [32, 47, 131].

## Морфологические особенности м. лесного и м. лугового

Характеристика	М. лесной <i>M. sylvaticum</i>	М. луговой <i>M. pratense</i>	Литература
1	2	3	4
Высота растения	10 – 40 см	15 – 30 (60) см	12, 31, 32, 47, 103, 119, 130, 131
Стебель	Прямой или ветвистый, с прямыми, длинными, отогнутыми ветвями Голый или опушенный короткими, белыми, редкими, вниз отклоненными волосками.	Прямой или ветвистый, с 1 – 2 парами тонких ветвей Голый или в верхней части опушенный редкими, короткими, вниз отклоненными волосками	
Листья	Эллиптические или линейно-ланцетные, длинно заостренные, цельнокрайние, почти сидячие Голые или с редкими, белыми, короткими волосками с обеих сторон и по краю с ресничками	Яйцевидно-ланцетные или линейно-ланцетные, длинно заостренные, цельнокрайние, почти сидячие Голые или с обеих сторон рассеянно волосистые и по краям покрыты короткими жесткими ресничками	
Цветок	Одиночные в пазухах верхних листьев и прицветников, в однобокой колосовидной, редкой кисти	В редком кистевидном соцветии	
Верхние прицветники	Почти такой же длины, как и среднестеблевые листья, за исключением больших растений	Обычно много короче, чем среднестеблевые листья, зубчатые, исключение – маленькие растения	
Цветоножка	Опушенная	Голая	
Околоцветник			
Чашечка	Опушенная	Почти голая	
Венчик	Обычно 8-10 мм длиной, резко сужающийся в узкую трубку к основанию, с ярко-выраженным, часто луковичевидным, шлемом и широким зевом, нижняя губа сильно отклонена с 3 равными продолговато-овальными, тупыми или слабо-заостренными долями с отдельными, обычно закругленными в основании пазухами	11-20 мм длиной, постепенно заостряющийся от более широкой трубки в основании, шлем менее выражен и зев уже; нижняя губа выдается вперед или иногда отклонена, с 3, часто неравными, обычно тройными (треугольными), ± заостренными зубцами с узко заостренными в основании пазухами	

Продолжение таблицы			
1	2	3	4
Плод	Яйцевидные, довольно резко заостренные с острой верхушечной точкой или клювом, довольно уплощенные (сильноэллиптические в поперечном сечении); 2-семенные, раскрывающиеся дорсальным и вентральным швом.	Грушевидные, сильнее сужающиеся к верхушечному клюву, сильно сплюснуты (узкоэллиптические в поперечном сечении); 2 – 4-семенные, раскрывающиеся дорсальным швом	

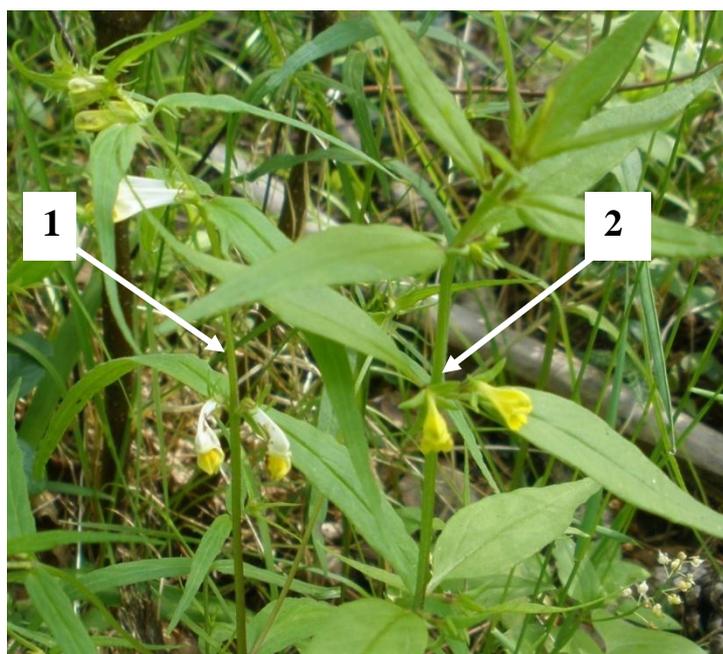


Рис. 3. Внешний вид *M. sylvaticum* и *M. pratense* (фото, окрестности п. Маяк Костромской обл., 2009), 1 – *M. pratense*, 2 – *M. sylvaticum*



Рис. 4. Внешний вид *M. sylvaticum* и *M. pratense* [117]

### 1.3. Химический состав растений рода Марьянник

Растения рода Марьянник в своем химическом составе содержат богатый комплекс биологически активных веществ [84].

Для м. лугового основными группами биологически активных соединений являются флавоноиды и иридоиды, в незначительных количествах содержатся азотсодержащие соединения, сапонины, углеводы (табл. 3). Химический состав экологически и морфологически близкого вида – м. лесного – изучен недостаточно полно. О наличии флавоноидов в м. лесном данные отсутствуют.

Согласно доступным литературным источникам, в траве этого растения содержится комплекс веществ иридоидной природы, такие как аукубин, аукубозид, каталпол, мелампирозид и некоторые другие. Помимо иридоидов в м. лесном доказано наличие холина и каротиноидов (каротины, лютеин и его эфир, элксантин, вилоксантин) [68, 84], аскорбиновой кислоты.

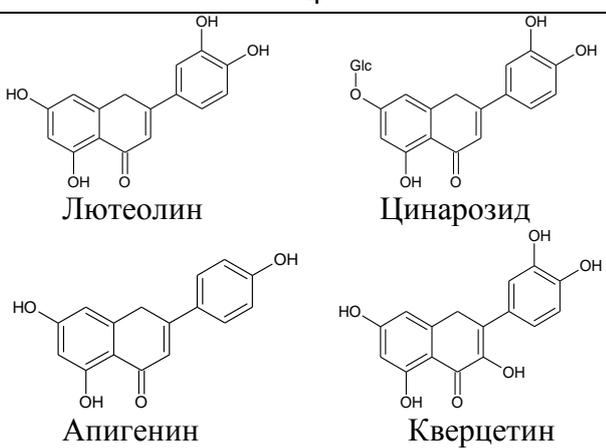
В начале XX века были впервые изучены иридоиды м. лугового и м. гребенчатого [26, 118], методом ферментативного расщепления доказано наличие аукубина. Было установлено, что аукубин является запасным веществом, накапливающимся в основном в семенах.

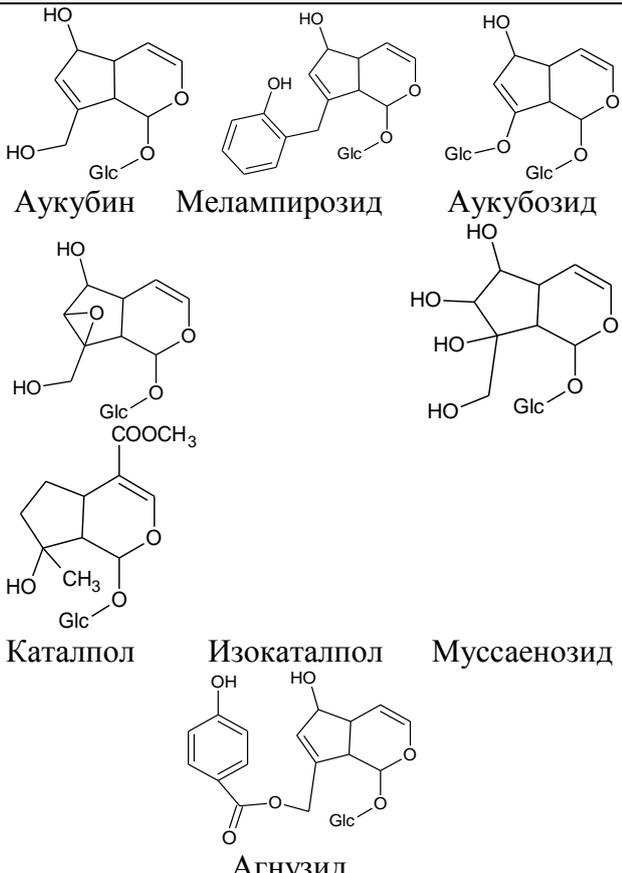
Для марьянников характерна локализация иридоидов преимущественно в надземной части – в цветках, семенах, листьях. Доминирующим иридоидом изученных марьянников является аукубин [41].

Из литературных данных следует, что химический состав м. лесного изучен недостаточно полно. Отсутствует исчерпывающая информация о распределении групп биологически активных соединений по вегетативным и генеративным органам м. лесного, нет описания методов количественного определения основных групп действующих соединений, что не позволяет рекомендовать это растение в научную и официальную медицину.

Таблица 3

Биологически активные вещества марьянника лесного и марьянника лугового

Вид	М. лесной	М. луговой	Структурная формула	Литература
1	2	3	4	5
Флавоноиды	–	Лютеолин; 7-глюкозиды лютеолина; производные кверцетина, апигенина, лютеолина.	 <p>Лютеолин</p> <p>Цинарозид</p> <p>Апигенин</p> <p>Кверцетин</p>	12, 14, 37

Продолжение таблицы				
1	2	3	4	5
Иридоиды	Аукубин, аукубозид, мелампирозид, муссаенозид, каталпол	Аукубин, аукубозид, агнузид, изокаталпол	 <p>Аукубин    Мелампирозид    Аукубозид</p> <p>Каталпол    Изокаталпол    Муссаенозид</p> <p>Агнузид</p>	12, 84
Другие БАВ	Витамины: аскорбиновая кислота, каротиноиды: α-каротин, β-каротин, элоксантин, лютеин, эфир лютеина, вилоксантин, алкалоиды, холин.	Витамины: аскорбиновая кислота, каротиноиды: α-каротин, β-каротин, элоксантин, лютеин, флавоксантин, алкалоиды, углеводы, дульцит; сапонины.		12, 40, 84

#### 1.4. Биологическая активность и применение марьянников в научной и народной медицине

Многие представители сем. Норичниковые имеют важное медицинское значение, такие как растения рода Наперстянка - *Digitalis*, вероника лекарственная (*Veronica officinalis* L.), коровяк скипетровидный (*Verbascum densiflorum* Bertol.) [63].

Растения рода Марьянник широко применяют в народной медицине разных стран при лечении различных заболеваний (табл. 4).

Таблица 4

Фармакологическая активность и применение в народной медицине растений рода *Melampyrum*

Вид	Фармакологическая активность и применение в народной медицине
М. гребенчатый <i>M. cristatum</i>	Отвар используют для полоскания рта при острых болях и инфекционных высыпаниях, было доказано наличие мочегонной и противовоспалительной активности [115].
М. полевой <i>M. arvense</i>	При лечении гепатита, в виде ванн для лечения ревматизма [115], надземная часть проявляет антипротозойную активность [129], для лечения поражения ног крупного рогатого скота [115], обладает инсектицидным, противовоспалительным и хорошим ранозаживляющим действием. Настой травы применялся при лечении золотухи, различных сыпях, чесотке. Свежая и измельченная трава ускоряет заживление ран [54].
М. луговой <i>M. pratense</i>	В австрийской народной медицине применяется наружно в виде компрессов для лечения подагры и ревматизма, в Румынии используют для лечения ревматических заболеваний и инфекций кожи, в Англии рекомендован в виде отвара для лечения заболеваний почек [132].
М. лесной <i>M. sylvaticum</i>	Отвар при болезнях сердца [84], употреблялся от золотухи у детей [96]
М. дубравный <i>M. nemorosum</i> ( <i>bihariense</i> )	Водный экстракт надземной части применяется как седативное, кардиотоническое, гипотензивное средство. Порошком из цветков посыпали раны, порезы; отварами лечили чесотку, растирались от простуды, применяли при лечении золотухи [96]. Обладает инсектицидным, противовоспалительным, ранозаживляющим действием [53]; В виде ванн при ревматизме, в сочетании с другими растениями для лечения желтухи, было доказано наличие мочегонной и противовоспалительной активности [115]. Применяют как средство, успокаивающее сердцебиение, боли в желудке, а также при нарушениях обмена веществ; оказывает успокаивающее действие при зуде кожи при лечении диатеза и туберкулеза кожи, при опрелостях, ревматизме [49], при лечении эпилепсии в виде водного настоя [18].

В народе марьянники называют «черная трава», золотушная трава, иван-дамарья. Их широко применяют в народной медицине в качестве седативных, противосудорожных, противовоспалительных средств, а также при лечении заболеваний сердечно-сосудистой системы [26].

В народной медицине м. дубравный применяют как средство, успокаивающее сердцебиение, боли в желудке, а также при нарушениях обмена веществ. Используют его и наружно, особенно в детской практике – отвары из м. дубравного, также как и череды трехраздельной (*Bidens tripartita* L.), и фиалки трехцветной (*Viola tricolor* L.), оказывают успокаивающее действие при зуде кожи, поэтому их применяют для лечения диатеза и туберкулеза кожи, при опрелостях у новорожденных детей, при ревматизме [49].

Известно, что м. дубравный обладает седативным, противосудорожным, гипотензивным, ранозаживляющим, противовоспалительным, инсектицидным действием. Применяется при гипертонической болезни, головокружениях, болезнях сердца, невралгиях, эпилепсии, заболеваниях желудка и органов желудочно-кишечного тракта. Свежая измельченная трава и ее порошок также ускоряют заживление ран. Подобными свойствами обладают м. полевой, м. гребенчатый, м. луговой [50].

В народной медицине Коми-Пермяцкого автономного округа настоек м. лугового принимают при повышенном давлении, болезнях сердца, головокружении, от бессонницы. Из порошка травы делают присыпки на раны и порезы [51].

В клинических исследованиях при использовании настоя м. гребенчатого для лечения гипертонической болезни наблюдалось существенное улучшение состояния больных. Также м. гребенчатый проявляет выраженное противосудорожное действие при лечении начальной стадии эпилепсии [17].

Настой из травы м. лугового, усиливая влияние вагуса на сердце, проявляет тонизирующее действие на парасимпатическую иннервацию, а также устраняет ганглиоблокирующее действие камфоры [81], уряжает ритм и повышает амплитуду изолированного сердца лягушки [48]. Встречаются сведения, что настой м. лугового увеличивает тонус кишечника, возбуждает его сократительную деятельность, увеличивает амплитуду маятникообразных сокращений, а также снижает диурез [82]. Настой м. луговой угнетает центральную нервную систему подопытных животных, проявляет

нейролептические свойства; вызывает удлинение латентного периода и более быстрое угасание условных рефлексов, оказывает отчетливое успокаивающее действие без снотворного эффекта [65].

Имеются данные, что седативное действие марьянника подобно действию транквилизаторов, и превышает успокоительное влияние настоя валерианы [59].

Известно, что аукубин - основной иридоидный гликозид м. лугового - оказывает желчегонное и антимикробное действие, увеличивает физическую работоспособность, оказывает стимулирующее действие на выделение из почек мочевой кислоты [57].

Данные о применении м. лесного в литературе встречаются редко. Известно, что отвар травы применялся при лечении болезней сердца [84], а также употреблялся от золотухи у детей [96].

## Выводы

1. Анализ литературных источников показал, что растения рода «Марьянник» широко распространены на территории Северного полушария. М. луговой и м. лесной имеют перекрывающийся ареал, аналогичные места обитания, часто образуют совместные заросли.

2. По морфологическим признакам оба марьянника очень схожи между собой, но имеют ряд отличительных признаков.

3. Химический состав представителей рода *Melampyrum* изучен достаточно подробно, изучены и основные группы БАВ м. лугового, однако экологически и морфологически близкий м. лесной остается малоизученным, что определяет актуальность исследований в данном направлении.

4. Отсутствие полной информации о качественном и количественном составе БАВ м. лесного не позволяет рекомендовать его в научную медицину. В доступных источниках нет сведений о качественном составе, количественном содержании и распределении БАВ по органам растения, фармакологической активности.

5. С целью введения в медицинскую практику новых видов лекарственного растительного сырья, необходимо детальное изучение химического состава и биологической активности, а также выбор методов стандартизации растительного сырья и лекарственных средств на его основе.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

Объектом фармакогностического исследования была собранная в период от начала цветения до начала плодоношения и высушенная трава (надземная часть с корнями) дикорастущих, однолетних растений м. лесного – *Melampyrum sylvaticum* L. и м. лугового *Melampyrum pratense* L. – сем. Норичниковые (*Scrophulariaceae*).

Сырье собирали с участков, представленных в таблице 5.

Таблица 5

Районы заготовки травы марьянника лесного и марьянника лугового

Вид	Место заготовки	Сроки заготовки
М. лесной	Окрестности п. Маяк Вохомского района Костромской области	Июнь – август 2007 – 2016
	Окрестности с. Тимошино Октябрьского района Костромской области	
	Левый берег реки Ирдом, Вохомский район Костромской области	
М. луговой	Окрестности д. Нижняя Курья Кировского района Пермского края	
	Окрестности г. Пермь, Кировский район, ур-е Сосновый бор Пермского края	
	Окрестности г. Нижний Тагил Свердловской области	

Сырье со всех участков, собранное в течение одного заготовительного периода, объединялось в общую массу. После сбора сырье марьянников делили на две части. Одну часть рассматривали целиком – траву (надземная часть с корнями); другую часть делили на вегетативные и генеративные органы (листья, цветки, стебли, корни). Сырье сушили воздушно-теневым способом.

Семена м. лугового для анатомического изучения собирали в Костромской области в Октябрьском районе в июле 2009, семена м. лесного – в Костромской области в Вохомском районе в июле 2009. Плоды высушивали воздушно-теневым способом, коробочки вскрывали, семена высыпали, очищали от примесей.

Экстракты получали способом, разработанным для травы м. лугового и защищенным Патентом РФ [13, 72].

### **Технология сухого спиртового экстракта**

Траву марьянника измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм. Для экстракции использовали метод реперколяции по Босину с законченным циклом с равной загрузкой сырья в батарее из четырех перколяторов. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 50%. Время настаивания шесть часов. Полученные извлечения объединяли, сгущали и высушивали в роторном выпарном аппарате при температуре реакционной массы  $50\pm 2^\circ\text{C}$  и давлении  $0.01 \text{ кгс/см}^2$  (9.81 гПа) до получения сухого остатка. Выход экстракта составляет 12% от массы сырья.

Сухой спиртовый экстракт представляет собой гигроскопичный порошок темно-коричневого цвета, растворимый в воде. Запах слабый специфический, вкус горький.

### **Технология сухого водного экстракта**

Траву с размером частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, последовательно экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение двух часов в трехкратной повторности. В качестве экстрагента использовали воду очищенную в соотношении 1:10. Извлечения объединяли, охлаждали, фильтровали, сгущали и высушивали в роторном выпарном аппарате при температуре реакционной массы  $50\pm 2^\circ\text{C}$  и давлении  $0.01 \text{ кгс/см}^2$  (9.81 гПа) до получения сухого остатка.

Сухой водный экстракт представляет собой гигроскопичный порошок темно-коричневого цвета. Запах слабый специфический, вкус горький.

### **Технология комплексных очищенных препаратов (фракция флавоноидов и иридоидов)**

Очищенные фракции флавоноидов и иридоидов получали методом колоночной хроматографии на полиамиде [13].

Флавоноидная фракция представляет собой темно-коричневый порошок, горьковатого вкуса, без запаха. Выход составил 0.8% от массы сухого сырья.

Иридоидная фракция - коричневый порошок, горького вкуса, без запаха. Выход составил 1% от массы сухого сырья.

## **2.2. Метод ресурсоведческого исследования**

Запасы м. лесного определяли способом работы на конкретных зарослях. Учетные площадки закладывали методом «челнока» через равные промежутки. Плотность запаса сырья определяли методом модельных экземпляров [7].

## **2.3. Методы анатомического исследования**

Анатомическое исследование проводили на растениях среднего размера, свежих и зафиксированных в спирте этиловом 70%. Для микроскопического анализа были приготовлены временные микропрепараты. Для просветления использовали 5% раствор натрия гидроксида, разведенный водой (1:1). Включающая жидкость – вода очищенная. Для окрашивания одревесневших клеток срезы обрабатывали 10% раствором сернокислового анилина. Одревесневшие клетки окрашивались в желтый цвет.

Изучение микропрепаратов проводили с помощью микроскопа марки LCD MICRO (Германия) с жидкокристаллическим дисплеем, при увеличении 10x4; 10x10; 10x40.

Макроскопический анализ семян проводили согласно рекомендациям общей фармакопейной статьи [24, 88].

Для изучения анатомического строения семян марьянника использовали стандартную методику приготовления срезов семян в парафиновом блоке. Семена предварительно размягчали, помещая в воду на одни сутки, а после в смесь глицерин-вода-этанол (1:1:1) на трое суток [24, 88].

## 2.4. Методы химического исследования

### 2.4.1. Качественные реакции

Для определения качественного состава БАВ использовали общепринятые методики, а также спектральные и хроматографические методы.

Для проведения качественного анализа получали извлечения из сухого растительного сырья: водой очищенной и спиртом этиловым различных концентраций (10%, 20%, 40%, 50%, 70%).

Методика: 1 г измельченного до 2 мм сырья марьянника помещают в колбу на 10 мл и заливают 10 мл соответствующего экстрагента. Колбу соединяют с обратным холодильником, нагревают на водяной бане в течение 10 минут с момента закипания экстрагента в колбе. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр. Полученные извлечения использовали для проведения качественных реакций.

Извлечения были получены из цельной травы, листьев, стеблей, корней, цветков.

Присутствие флавоноидов устанавливали по следующим реакциям:

Цианидиновая проба (проба Синода). Извлечение наливают в две пробирки по 0.5 мл, добавляют в каждую пробирку по 3 капли концентрированной хлористоводородной кислоты. В одну из пробирок добавляют несколько крупинок металлического магния. Нагревают обе пробирки на водяной бане до кипения, оставляют на 5 минут. При наличии флавоноидов извлечение должно окраситься в оранжево-красный, розовый, алый или малиновый цвет.

Реакция с 1% спиртовым раствором алюминия хлорида. К 0.5 мл извлечения добавляют несколько капель 1% спиртового раствора алюминия хлорида. Ожидаемый эффект реакции – желтое окрашивание.

Реакция с 5% спиртовым раствором натрия гидроксида. К 0.5 мл извлечения добавляют несколько капель 5% спиртового раствора натрия гидроксида. Положительная реакция – появление желтого окрашивания.

Реакция с 5% спиртовым раствором железа хлорида. К 0.5 мл извлечения добавляют 0.5 мл 5% раствора железа хлорида. При наличии флавоноидов должно появиться бурое окрашивание.

Реакция с 5% раствором свинца ацетата. К 0.5 мл извлечения добавляют несколько капель 5% раствора свинца ацетата. Наблюдают выпадение желтого осадка при присутствии флавоноидов.

Кумарины:

Реакция со щелочью. К 3 – 5 мл спиртового извлечения прибавляют 5 – 10 капель 10% спиртового раствора натрия гидроксида или калия гидроксида и нагревают на водяной бане несколько минут. При наличии кумаринов раствор желтеет.

Лактонная проба (реакция с 10% раствором натрия гидроксида) является продолжением реакции со щелочью. К содержимому пробирки добавляют 5 – 10 мл дистиллированной воды и перемешивают. После прибавления 5 – 10 капель хлористоводородной кислоты 10% в присутствии кумаринов наблюдается помутнение или, реже, выпадение осадка.

Реакция азосочетания с солями диазония. К 3 – 5 мл спиртового извлечения прибавляют 5 – 10 капель 10% спиртового раствора натрия гидроксида или калия гидроксида, нагревают на водяной бане и затем прибавляют 3 – 5 капель раствора диазобензолсульфокислоты или свежеприготовленного диазореактива. При наличии кумаринов раствор окрашивается от оранжево-красного до вишневого цвета.

Для проведения качественных реакций на иридоиды и проявления хроматограмм в качестве специфических реагентов использовали:

Реактив Тримм – Хилла (2 мл концентрированной хлористоводородной кислоты, 10 мл 2% водного раствора меди сульфата (II), ледяной уксусной кислоты до 100 мл). В пробирку наливают 1 мл извлечения, добавляют 0.5 мл реактива Тримм – Хилла, нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 минут. При проведении реакции в пробирке при наличии иридоидов наблюдается синее окрашивание с зеленым или серым оттенком.

Реактив Бэкона-Эдельмана (0.5 г бензидина и 10.0 г трихлоруксусной кислоты растворяются в 100 мл спирта этилового 95%). Извлечения приобретают темно-коричневую или черную окраску в присутствии иридоидов.

Реактив Шталя (3.0 г *n*-Диметиламинобезальдегида растворяют в 100 мл спирта этилового 95%, добавляют 5 мл концентрированной хлористоводородной кислоты). Положительный эффект реакции – появление голубого окрашивания.

Алкалоиды определяли с помощью общесадительных реактивов:

Реактив Бушарда – раствор 1.27 г йода и 2 г калия йодида в 100 мл воды;

Реактив Вагнера – раствор 1 г йода в 2 г калия йодида в 50 мл воды;

С подкисленными водными растворами алкалоидов реактивы образуют бурые, труднорастворимые в воде осадки.

Реактив Драгендорфа – раствор основного висмута нитрата и калия йодида с добавлением уксусной кислоты; с большинством алкалоидов в кислых растворах реактив образует оранжевые или красно-бурые осадки.

Реактив Майера – водный раствор ртути дихлорида и калия йодида; в слабокислых и нейтральных растворах образуются осадки белого или желтоватого цвета.

Реактив Шейблера – 1% раствор фосфорновольфрамовой кислоты; Образуется белый аморфный осадок с алкалоидами.

На дубильные вещества проводили:

Реакция с 1% раствором желатина. Появляется хлопьевидный осадок или муть, растворимые при добавлении избытка желатина. Отрицательная реакция с желатином говорит об отсутствии дубильных веществ.

Реакция с 1% спиртовым раствором железозаммониевых квасцов (ЖАК). К 1 мл извлечения добавляют 2 - 3 капли ЖАК – наблюдается черно-синее окрашивание в присутствии дубильных веществ.

Наличие аскорбиновой кислоты проверяли реакцией с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. К 1 мл извлечения добавляют 3 – 5 капель реактива. Видимый эффект реакции – обесцвечивание реактива.

Аминокислоты определяли с помощью нингидриновой реакции. Реакция основана на способности аминокислот образовывать в щелочной среде окрашенный комплекс с нингидрином.

К 1 мл извлечения прибавляют 0.5 мл 0.5% спиртового раствора нингидрина и нагревают до кипения. Появляется фиолетово-синее окрашивание [106].

## **2.4.2. Хроматографические методы исследования**

### **2.4.2.1. Высокоэффективная жидкостная хроматография**

Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) веществ фенольной природы проводили на базе Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН, г. Москва, ВЭЖХ аминокислот проводили на кафедре фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА под руководством к. фарм.н., доцента кафедры Гилевой А. А.

ВЭЖХ веществ фенольной природы выполняли на жидкостном хроматографе фирмы Agilent 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на два растворителя, диодно-матричным детектором, термостатом колонок, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер). Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation. Для разделения соединений флавоноидной природы предложено использовать хроматографическую колонку Atlantis C18 (WATERS) для обращенно-фазовой ВЭЖХ, длиной 250 мм и внутренним диаметром 4.6 мм, с размером частиц 5 мкм, заполненную силикагелем, химически связанным с октадецилсиланом.

Длина волны детекции соответствовала максимумам пиков, выбиралась после записи спектров поглощения при длинах волн 190-700 нм. Аналитическая длина волны составляла 350 нм. Принадлежность соединений к классу флавоноидов оценивали на основании спектров поглощения: для подтверждения флавоноидной природы должны наблюдаться максимумы поглощения при длинах волн 250,  $350 \pm 5$  нм.

При проведении эксперимента использовали стандартные образцы цинарозида (лютеолин-7-О-β-D-глюкозида, CAS [5373-11-5], secondary HPLC 98,0%) и гиперозида (кверцетин-3-D-галактозида, CAS [482-36-0], secondary HPLC 97,0%) производства Sigma-Aldrich (США).

Система растворителей: 0,01 % раствор муравьиной кислоты, и метанол – ацетонитрил (15:75) (для ВЭЖХ, PanReac AppliChem), температура колонки 35°C. Время анализа 90 мин. Скорость потока подвижной фазы 0,8 мл/мин. Максимальное давление 400 бар. Объем вводимой пробы 10 мкл. Схема градиентного элюирования представлена в таблице 6.

Таблица 6

Схема градиентного элюирования

Время	Метанол - ацетонитрил (15:75)	0,01 % раствор муравьиной кислоты
0	0	100
80	80	20
85	0	100
90	0	100

Извлечение флавоноидов из сырья проводили в соответствии с методикой количественного определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии [8]. 2 мл полученного извлечения помещали в центрифужные пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин. Надосадочную жидкость помещали в вials для хроматографирования. Расчет количественного содержания суммы флавоноидов (%) в сырье проводили в пересчете на цинарозид по формуле 1.

$$X = \frac{S_1 \cdot a_2 \cdot R}{S_2 \cdot a_1 \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

где  $S_1$  – сумма площадей пиков флавоноидов на хроматограмме испытуемого образца;  $S_2$  – площадь пика цинарозида на хроматограмме СО;  $a_1$  – навеска сырья, г;  $a_2$  – масса цинарозида в растворе СО, г;  $W$  – влажность сырья,  $R$  – разведение.

Определение содержания флавоноидов в экстрактах проводили по следующей методике: точную навеску экстракта 50 мг растворяли в 2 мл соответствующего растворителя (вода, 40% этанол), помещали в центрифужные

пробирки и центрифугировали в течение 15 мин со скоростью 4500 об/мин. Надосадочную жидкость помещали в вials для хроматографирования.

Расчет количественного содержания суммы флавоноидов (%) в экстрактах и фракциях флавоноидов проводили в пересчете на цинарозид по формуле 2.

$$X = \frac{S_1 \cdot a_2 \cdot R}{S_2 \cdot a_1 (100 - W)}, \quad (2)$$

где  $S_1$  – сумма площадей пиков флавоноидов на хроматограмме испытуемого образца;  $S_2$  – площадь пика цинарозида на хроматограмме СО;  $a_1$  – навеска сырья, г;  $a_2$  – масса цинарозида в растворе СО, г;  $W$  – влажность сырья,  $R$  – разведение.

Высокоэффективную жидкостную хроматографию аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе марки LC 20 Prominence фирмы SHIMADZU. Обнаружение аминокислот проводили в извлечении 1:10 (экстрагент спирт этиловый 50%).

Для определения свободных аминокислот отбирали аликвоту спиртового извлечения в количестве 0.1 мл. Пробу высушивали под вакуумом при температуре 60 °С. К высушенной аликвоте добавляли 0.35 мл раствора фенилизотионата в изопропанол, перемешивали и добавляли 0.05 мл воды очищенной. Выдерживали полученную смесь в течение 20 минут при комнатной температуре и высушивали при тех же условиях. Сухой остаток растворяли в 1 мл воды очищенной и центрифугировали. Пробу вводили в хроматограф.

Перед анализом проводили градуировку хроматографа по градуировочным растворам в порядке возрастания массовой концентрации компонента.

Содержание свободных аминокислот устанавливали по площади пиков удерживания идентифицированных аминокислот и выражали в процентах.

#### 2.4.2.2. Газожидкостная хроматография

Метод газожидкостной хроматографии использовали для анализа жирного масла. Жирное масло получали путем растирания семян (точная навеска) в

ступке. После растирания навеску высушивали до постоянной массы при температуре  $102\pm 2^\circ\text{C}$  и помещали в патроны из фильтровальной бумаги. Жирное масло из семян извлекали в аппарате Соксклета гексаном в течение 48 часов. Растворитель отгоняли в вакууме при температуре  $45 - 50^\circ\text{C}$ , остаток выдерживали в вакуум-сушильном шкафу при  $30^\circ\text{C}$  в течение 30 мин для удаления остаточных паров гексана [73].

Масло подвергали горячему метанолизу в среде абсолютного метанола [16]. Полученные метиловые эфиры жирных кислот анализировали на газовом хроматографе (ГХ) Hewlett-Packard 5890/II (США) с квадрупольным масс-спектрометром (MS) (HP MSD 5971) с ионизацией электронным ударом (70 эВ). Использовали кварцевую колонку HP-5 (5% фенильных групп) длиной 30 м и внутренним диаметром 0.25 мм и толщиной пленки неподвижной фазы 0.25 мкм, газ-носитель гелий с постоянным потоком 1 мл/мин. Температура испарителя  $250^\circ\text{C}$ , источника ионов 170, интерфейса между ГХ и MS детектора  $280^\circ\text{C}$ . Температуру колонки программировали в следующем режиме: 2 мин при  $100^\circ\text{C}$ ,  $10^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $200^\circ\text{C}$ , 2 мин при  $200^\circ\text{C}$ ,  $20^\circ\text{C}/\text{мин}$  до  $300^\circ\text{C}$ , 2 мин при  $300^\circ\text{C}$ . В инжектор вводили 1 мкл раствора, скорость сканирования 1.2 скан/с для области 45 – 450 а. е. м.

Жирные кислоты идентифицировали путем сравнения времен удерживания и полных масс-спектров с соответствующими данными для их метиловых эфиров из базы данных 275 (275 тыс. масс-спектров). Использовали эталонные образцы пальмитиновой, стеариновой, олеиновой, линолевой и линоленовой кислот. Содержание индивидуальных кислот вычисляли по площадям пиков, без использования градуировочных коэффициентов, с программным автоматическим интегрированием.

### 2.4.2.3. Тонкослойная хроматография

Для проведения хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) использовали пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-АФ-В-УФ, «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ и ПТСХ-П-А-В-УФ, DC-Fertigfolien ALUGRAM SIL G/UV<sub>254</sub>.

Для определения флавоноидов использовали системы:

1. Этилацетат – муравьиная кислота – вода (80:10:10);
2. Этилацетат – уксусная кислота – вода (10:4:1).
3. Уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат – пропанол (0.5:10:20:20)
4. Этилацетат – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота – вода (100:10:10:25).

Пластинки обрабатывали 2% спиртовым раствором алюминия хлорида. Обработанные пластинки выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 5 минут. Флавоноиды окрашивались в жёлтый цвет. При просмотре в УФ свете наблюдается жёлто-зелёная флуоресценция пятен.

Кумарины определяли в системе гексан – ацетон (1:1). Пластинки обрабатывали 1% спиртовым раствором калия гидроксида, сушили на воздухе, при комнатной температуре, продукты реакции приобретают жёлтое окрашивание.

Для обнаружения иридоидов использовали системы:

1. Бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (БУВ) (4:1:2)
2. Бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:5)
3. Изопропанол – вода (4:1)

Наилучшее разделение иридоидов наблюдалось в системе №3. В качестве проявляющих реагентов использовали реактив Шталя и реактив Бэкона-Эдельмана. После обработки пластинки выдерживали в сушильном шкафу в течение 5 минут при температуре 100°C. Видимый эффект реакции – появление пятен голубого (реактив Шталя) или темно-коричневого цвета (реактив Бэкона-Эдельмана).

Для хроматографирования аминокислот использовали системы:

1. Бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1)
2. Пропанол – вода (1:1)
3. Изопропанол – вода (7:3)
4. Ацетон – вода – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота (50:15:12:3)

Оптимальными для хроматографического разделения аминокислот оказались системы № 2 и 4. Хроматограммы проявляли 0.2% спиртовым раствором нингидрина (раствор получали путем растворения 0.2 г нингидрина в спирте этиловом 96%). После обработки пластинки выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 5 минут. Аминокислоты проявлялись в виде пятен от светло-розового до темно-фиолетового цвета.

#### 2.4.2.4. Бумажная хроматография

Исследование проводили на хроматографической бумага марки FN-1 Munktell & Filtrak.

Круговую хроматографию фенольных соединений проводили в системе – уксусная кислота – вода (15:85) [69]. Извлечения из травы готовили на 70% спирте этиловом, соотношение сырья к экстрагенту (1:10). Свидетель – спиртовой (спирт этиловый 70%) раствор цинарозида. Использовали бумагу марки F1 (Ленинградская). В качестве подвижной фазы использовали 15% раствор уксусной кислоты. На хроматограмму наносили извлечение в количестве 0.02 – 0.04 мл (2 – 4 капилляра).

Хроматограммы просматривали в УФ-свете до и после обработки хромогенными реактивами: парами аммиака и 1% спиртовым раствором алюминия хлорида.

Двумерную хроматографию для разделения веществ фенольной природы проводили в системах растворителей [13]:

- A. Первое направление: изопропанол – муравьиная кислота – вода (2:5:6);

В. Второе направление: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

Извлечения на хроматограмму наносили в количестве 0.04 – 0.12 мл (4 – 12 капилляров). Хроматограммы просматривали в УФ – свете до и после обработки хромогенными реактивами: парами аммиака, 1% спиртовым раствором алюминия хлорида, реактивом Гепфнера.

Реактив Гепфнера готовили следующим образом: 1% водный раствор натрия нитрита и 10% раствор уксусной кислоты смешивают в равных объемах. После обработки реактивом хроматограммы высушиваются и обрабатываются 10% раствором щелочи в метаноле.

Для разделения иридоидных веществ использовали нисходящую хроматографию на бумаге в системе н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2). Хроматограммы обрабатывали хромогенными реактивами, для четкого проявления окрашенных пятен хроматограммы нагревали при температуре 110 - 115°C в течение 10 минут.

Реактив Тримм – Хилла – появление пятен серо-синего цвета.

Реактив Бекон – Эдельмана. Эффект – коричневое окрашивание.

Реактив Шталя – пятна голубого цвета.

Для разделения аминокислот также использовали нисходящую хроматографию на бумаге в системе н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2) с достоверными образцами аминокислот. Хроматограммы высушивали на воздухе, обрабатывали 0.2% спиртовым раствором нингидрина и нагревали в сушильном шкафу при 100 – 105°C в течение 5 минут. Аминокислоты проявлялись в виде пятен, цвет которых варьировал от голубого до темно-фиолетового.

### **2.4.3. Спектральные методы исследования**

#### **2.4.3.1. Спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области спектра**

Определение количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид проводили методом дифференциальной спектрофотометрии на

основе реакции с алюминия хлоридом при длине волны 396 нм на спектрофотометре СФ 2000 в кюветах с толщиной слоя 10 мм [15].

Количественное содержание аминокислот проводили методом прямой спектрофотометрии на основе реакции с нингидрином при длине волны 568 нм на спектрофотометре СФ 2000 в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Для определения была использована унифицированная методика определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах [29].

В мерную колбу на 100 мл помещали около 0.1 г экстракта (точная навеска), растворяли в 50 мл воды очищенной, доводили водой до метки и перемешивали (раствор А). К 5 мл раствора А в мерной колбе на 50 мл добавляли 4 мл фосфатного буфера, 2 мл 1% спиртового раствора нингидрина, 2 мл 0.05% раствора аскорбиновой кислоты. Нагревали на водяной бане в течение 30 мин, быстро охлаждали, доводили до метки, перемешивали.

Параллельно проводили аналогичные опыты с 5 мл раствора В рабочего стандартного образца (РСО) глутаминовой кислоты и 5 мл воды (контрольный опыт).

Измеряли оптическую плотность полученных растворов на спектрофотометре СФ 2000 в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 568 нм, в качестве раствора сравнения использовали контрольный опыт.

Приготовление раствора РСО глутаминовой кислоты: около 0.05 г (точная навеска) глутаминовой кислоты помещали в мерную колбу на 200 мл, растворяли в 50 мл воды, доводили объем раствора водой до метки и перемешивали (раствор В). Фосфатный буферный раствор с рН 6.4 готовили согласно ОФС 01.3.0003.15 «Буферные растворы» [23].

Содержание суммы свободных аминокислот в экстрактах вычисляли по формуле 3:

$$X = \frac{A * 100 * 50 * a_0 * 5 * 100 * 100\%}{A_0 * a * 5 * 200 * 100 * (100 - W)}, \quad (3)$$

где  $A$  - оптическая плотность исследуемого экстракта, нм;  $A_0$  – оптическая плотность РСО глутаминовой кислоты, нм;  $a$  – точная навеска экстракта, г;  $a_0$  – навеска РСО глутаминовой кислоты, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании экстракта, %.

#### **2.4.3.2. Фотоэлектроколориметрия**

Определение количественного содержания иридоидов выполняли методом фотоэлектроколориметрии на основе реакции с реактивом Тримм-Хилла [112], модифицированным для м. лугового [13]. Оптическую плотность измеряли на фотометре КФК-3-01-«ЗОМЗ» в кюветах с толщиной слоя 5 мм при длине волны 590 нм (желтый светофильтр).

#### **2.4.3.3. Атомно-эмиссионная спектрометрия**

Микроэлементный состав определяли методом эмиссионного спектрального анализа на дифракционном спектрографе ДФС-13-1 испарением из кратера угольного электрода, в лаборатории физико-химического анализа ООО «Галополимер» г. Пермь. Пробоподготовку проводили методом мокрой минерализации [21].

### **2.5. Методы фармакологического исследования**

Фармакологические свойства изучали с использованием беспородных взрослых мышей обоего пола. Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [78] и требованиями Фармкомитета РФ к проведению доклинических испытаний. Опыты на животных выполнены в соответствии с Европейской конвенцией по защите и использованию позвоночных животных для экспериментальных и других целей

EST №123 (1986 г.) [27], ст.11 и ст.12 Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» (2010 г.) [66], «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (2010 г.) [67]. Все манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии, регламентированными «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» и «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [78]. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха +18-26°C, влажности не более 50%, объеме воздухообмена (вытяжка-приток) 8:10. В комнате поддерживался 12-часовой цикл освещения. Животные находились в стандартных пластиковых клетках, в качестве подстила использовалась резаная автоклавируемая бумага. Регулярно проводилась рутинная проверка подстила на микробиологические загрязнения. Животные адаптировались в лаборатории в течение 10 дней до начала введения исследуемых веществ.

### **2.5.1. Метод исследования антикоагулянтной активности**

Изучение влияния экстрактов марьянников на гемостаз проводили *in vitro* с помощью коагулометра «Минилаб 701». Для исследования использовали цитратную (3.8%) кровь (9:1) собаки. Влияние экстрактов на свертывание крови изучали в одинаковой концентрации 1 мг/мл крови. В качестве контроля использовали цитратную кровь с раствором натрия хлоридом. В качестве эталона использовали раствор гепарина в концентрации 1 ЕД/мл крови.

### **2.5.2. Метод исследования противосудорожной активности**

Исследование противосудорожной активности проводили на белых мышах с массой 17 – 25 г. Судороги вызывали введением водного раствора коразола 1%

в дозе 120 мг/кг внутривенно. От данной дозы у всех животных возникают тонико-клонические судороги с латентным временем  $48 \pm 1.2$  с и смерть 100% животных в фазу тонической экстензии.

Экстракты в виде водного раствора или суспензии вводили перорально за полчаса до инъекционного введения раствора коразола.

Оценивали латентный период, продолжительность жизни, выживаемость животных.

### 2.5.3. Метод исследования седативной активности

Определение седативной активности проводили на белых мышах массой  $25 \pm 3$  г. За пять дней до начала эксперимента регистрировали исходные характеристики поведения мышей, после чего животные были разделены на 6 групп. Животные распределялись по группам рандомизированно. В качестве критерия принималась масса тела таким образом, чтобы ее индивидуальное значение не отклонялось от среднего значения в пределах одного пола более чем на 10%. Измерение поведенческих показателей в каждой из шести групп животных проводили до начала эксперимента (контроль), и далее через 10, 20 и 30 дней после введения препаратов.

Седативную активность оценивали в тесте «открытое поле». Исследование проводили в специальной камере диаметром 34 см и высотой 17 см, дно которой разбито на окружности и сектора площадью  $9 \text{ см}^2$  (рис. 5).

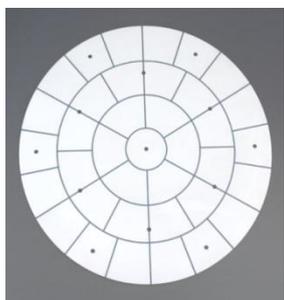


Рис. 5. Схема установки «Открытое поле»

Экстракты в виде водного раствора или суспензии вводили перорально в дозе 200 мг/кг. В качестве контроля использовали изотонический раствор натрия

хлорида в дозе 1 мл/кг. В качестве препарата сравнения был использован экстракт валерианы лекарственной заводского изготовления (ФС 42-3865-98). Согласно международной практике, терапевтическая доза экстракта валерианы составляет от 300 мг до 1 г. Дозы менее 100 мг оказывают эффект плацебо [71]. Экстракт валерианы вводили в дозе 0.015 мг/кг, что соответствует средней терапевтической дозе [116]. Экстракты и изотонический раствор натрия хлорида вводили ежедневно в одно и то же время утром в течение месяца.

Оценивали влияние экстрактов на горизонтальную активность (число выходов животного в центр площадки и переходов по секторам), вертикальную активность (по числу вставаний мышей на задние лапки с упором на стенку поля и на весу), косметическую активность (короткий и длительный груминг).

#### **2.5.4. Метод исследования нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активности**

Определение нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активности проводили в тесте «крестообразный лабиринт» (рис. 6). Изучение влияния доз алкоголя *in vivo* (соответствующие концентрации в крови в пределах 0.01% - 0.5%) проводили при внутрибрюшинном введении спирта этилового 12%. Контрольной группе животных вводили внутрибрюшинно изотонический раствор натрия хлорида.

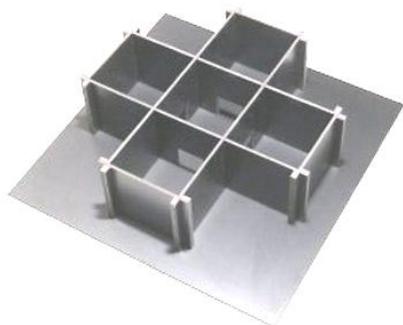


Рис. 6. Установка «Крестообразный лабиринт»

Влияние указанных доз алкоголя изучали на фоне действия экстрактов м. лесного. Экстракты вводили перорально в виде суспензии или водного раствора за 30 минут до инъекции спирта этилового.

### **2.5.5. Испытания на острую токсичность**

Острую токсичность экстрактов м. лесного определяли в соответствии с базовым документом «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС» [56], при пероральном введении на нелинейных белых мышах массой 17-25г. Экстракты вводили в виде водных растворов или суспензий в дозе 5000 мг/кг. Экстракты проверяли на группе из шести животных. После введения исследуемых экстрактов в течение двух недель наблюдали за двигательной активностью и поведенческими реакциями животных, регистрировали их гибель. Определяли класс опасности.

### **2.6. Статистическая обработка результатов эксперимента**

Статистическую обработку результатов фитохимических исследований проводили в соответствии с фармакопеей XIII [23].

Результаты фармакологических исследований обрабатывали статистическим методом с использованием критерия Стьюдента на персональном компьютере с применением стандартного пакета Microsoft Office Excel 2007 и программы «STAT». Все расчеты проводили по общепринятым формулам. Результат считали достоверным, если показатель достоверности (P) был меньше 0.05 [35].

## ГЛАВА 3: РЕСУРСОВЕДЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И МАРЬЯННИКА ЛУГОВОГО

### 3.1. Флористический состав растительных сообществ

Как показал анализ литературных данных, марьянники широко распространены на территории России и европейских стран [103, 123]. Нами было определено несколько типов фитоценозов, в которых произрастают исследуемые виды [9, 10, 93].

Участки №1 и №2 находятся в сосняке разнотравном. Лесообразующей породой является сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), редко встречается береза повислая (*Betula pendula* Roth), ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), лиственница сибирская (*Larix sibirica* Ledeb.). Подлесок составляют рябина обыкновенная (*Sorbus aucuparia* L.), малина (*Rubus idaeus* L.), черемуха раскидистая (*Padus avium* Mill.), ракитник Цингера (*Chamaecytisus zingeri* (Nenukow ex Litv.) Klask.). Травяно-кустарничковый ярус составляют брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), земляника лесная (*Fragaria vesca* L.), костяника (*Rubus saxatilis* L.), кошачья лапка двудомная (*Antennaria dioica* (L.) Gaertn.), ястребинка волосистая (*Hieracium pilosella* L.), ястребинка зонтичная (*Hieracium umbellatum* L.), золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea* L.), ортилия однобокая (*Pyrola secunda* L.), грушанка груглолистная (*Pyrola rotundifolia* L.). Часто встречаются вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), щавелек малый (*Rumex acetosella* L.), фиалка удивительная (*Viola mirabilis* L.). Из мхов встречаются плевроциум Шребера (*Pleurozium schreberi* (Brid.) Mitt.), мниум средний (*Plagiomnium medium* (Bruch et al.) T.J.Кор.) и дикранум многоножковый (*Dicranum polysetum* Sw.). Почва сухая песчаная. Сомкнутость крон высокая и составляет 0.8 [9, 10].

Участки №3, №4 и №5 выделены в смешанном лесу. Лесообразующими породами являются береза повислая (*Betula pendula* Roth), ольха серая (*Alnus*

*incana* (L.) Moench), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.), ель европейская (*Picea abies* (L.) Н. Karst.). Подлесок образован рябиной обыкновенной (*Sorbus aucuparia* L.), бузиной красной (*Sambucus racemosa* L.), жимолостью обыкновенной (*Lonicera xylosteum* L.), раkitником Цингера (*Chamaecytisus zingeri* (Nenukow ex Litv.) Klask.), смородиной черной (*Ribes nigrum* L.). В травяно-кустарничковом ярусе преобладают брусника обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), костяника (*Rubus saxatilis* L.), звездчатка средняя (*Stellaria media* (L.) Vill.), золотарник обыкновенный (*Solidago virgaurea* L.), вейник наземный (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth), иван-чай узколистный (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop.), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.), лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), тмин обыкновенный (*Carum carvi* L.) и др. Почва влажная дерново-подзолистая. Сомкнутость крон составляет 0.6, что свидетельствует о хорошей освещенности фитоценоза [9, 10].

Участок №6 выделен на вырубке. Вырубка зарастает березой повислой (*Betula pendula* Roth), осинкой (*Populus tremula* L.), черемухой (*Padus avium* Mill.), елью обыкновенной (*Picea abies* (L.) Н. Karst.), малиной (*Rubus idaeus* L.), ольхой серой (*Alnus incana* (L.) Moench). В травяно-кустарничковом ярусе преобладают сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.), черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), копытень европейский (*Asarum europaeum* L.), хвощ лесной (*Equisetum sylvaticum* L.), щитовник схожий (*Dryopteris assimilis* S. Walker), черноголовка обыкновенная (*Prunella vulgaris* L.), ветреница лютиковая (*Anemone ranunculoides* L.), ежа сборная (*Dactylis glomerata* L.), козлец кистистый (*Tragus racemosus* (L.) All.) и др. Почва подзолистая [9, 93].

Участки №7 и №8 находятся в темнохвойном лесу. Лесообразующей породой является ель европейская, редко встречается сосна обыкновенная; подлесок образуют ива черничная (*Salix myrtilloides* L.), ива чернеющая (*Salix myrsinifolia* Salisb.), черемуха раскидистая (*Padus avium* Mill.), осина (*Populus tremula* L.), береза повислая (*Betula pendula* Roth). В травяно-кустарничковом ярусе присутствуют черника обыкновенная (*Vaccinium myrtillus* L.), брусника

обыкновенная (*Vaccinium vitis-idaea* L.), костяника (*Rubus saxatilis* L.), сныть обыкновенная (*Aegopodium podagraria* L.), земляника лесная (*Fragaria vesca* L.), копытень европейский (*Asarum europaeum* L.), щитовник схожий (*Dryopteris assimilis* S. Walker). Почва влажная подзолистая. Сомкнутость крон достаточно высокая и составляет 0.7 [9, 93].

### 3.2. Ресурсоведческая характеристика

Нами была проведена оценка запасов сырья м. лесного в центральной части ареала распространения на территории России: Костромской области. Оценка запасов сырья м. лугового была проведена ранее [10].

Исследуемые марьянники произрастают пятнами, плотные заросли образуют на опушках, полянах, участках редколесья, вдоль лесных дорог – местах, характеризующихся относительно высокой освещенностью. Процент плотных зарослей от общей площади фитоценоза составляет от 5 до 80%, что учитывали при расчете запасов сырья. При проведении ресурсоведческого исследования м. лесного было отмечено, что в местах произрастания последнего всегда обнаруживается м. луговой. Таким образом, подтверждаются литературные данные о перекрывающемся ареале изучаемых видов и образовании ими совместных зарослей в ареале распространения м. лесного.

Ресурсоведческие исследования м. лугового проводили в Пермском крае и Свердловской области в 2003 г., м. лесного – в Костромской области в 2011 г. по общепринятым методикам. Плотность запасов сырья определяли методом модельных экземпляров. Все ресурсоведческие показатели обработаны статистически [7].

Количество модельных экземпляров на 1 м<sup>2</sup> в пределах плотных зарослей составляет в сосняках разнотравных от 3 до 54, в смешанном лесу – от 8 до 68, на вырубке – от 15 до 91, в светлохвойном лесу – от 19 до 107. Средние показатели по фитоценозам представлены в таблице 7.

Масса модельного экземпляра после высушивания колеблется для м. лугового от 0.20 до 1.29 г., для м. лесного – от 0.22 до 0.98 г.

Таблица 7

Ресурсоведческая характеристика зарослей  
марьянника лугового и марьянника лесного

№ участка	Местоположение заросли	S, га	Кол-во экз-ов на 1 м <sup>2</sup>	ПЗС, кг/га	% встречаемости плотных зарослей	БЗС, кг	∑ БЗС, кг	ЭЗС, кг
<b>Марьянник луговой</b>								
1	Пермский край, окрестности г. Пермь, Кировский р-н, м/р-н Волгодонская	20	26 ± 2.2	178 ± 20	5	178 ± 20	3200-4000	138
2	Пермский край, окрестности г. Пермь, Кировский район, ур-е Сосновый бор	12	18 ± 2.7	76 ± 13	5	45 ± 8		30
3	Пермский край, Кировский р-н, окрестности д. Нижняя Курья	10	43 ± 2.6	240 ± 23	40	959 ± 90		779
4	Пермский край, Краснокамский р-н, окрестности д. Калининцы	10	30 ± 2.1	170 ± 17	60	1021 ± 101		818
5	Свердловская обл., окрестности г. Нижний Тагил	15	21 ± 1.5	116 ± 12	80	1391 ± 142		1108
<b>Марьянник лесной</b>								
6	Костромская обл., Октябрьский р-н, окрестности с. Тимошино	6	20 ± 2.2	60 ± 12	15	54 ± 11	1200-1400	32
7	Костромская обл., Вохомский р-н, окрестности п. Маяк	5	38 ± 3.6	184 ± 19	80	736 ± 76		584
8	Костромская обл., Вохомский р-н, левый берег реки Ирдом	7	29 ± 2.6	147 ± 12	50	515 ± 42		431

Примечание: S – площадь, ПЗС – плотность запаса сырья, БЗС - Биологический запас сырья, ∑ БЗС - Суммарный биологический запас сырья, ЭЗС - Эксплуатационный запас сырья

Плотность запасов воздушно-сухого сырья м. лугового составляет от 76 ± 13 (участок №2) до 240 ± 23 кг/га (участок №3), м. лесного – от 60 ± 12 (участок №6) до 184 ± 19 кг/га (участок №7).

Биологический запас сырья м. лугового в сумме на пяти зарослях варьирует от 3.2 т. до 4 т. воздушно-сухого сырья, м. лесного на трех зарослях – от 1.2 т. до 1.4 т. Эксплуатационный запас м. лугового составляет около 2.9 т., м. лесного – около 1 т.

М. луговой образует продуктивные заросли, биологический и эксплуатационный запасы значительны, что свидетельствует о возможности промышленной заготовки травы м. лугового. М. лесной встречается на территории нашей страны реже, чем м. луговой, образует меньшие по площади, но достаточно продуктивные заросли.

## **Выводы**

1. Выделено несколько типов растительных сообществ, характерных для центральной части ареала произрастания м. лесного и м. лугового.
2. М. лесной и м. луговой образуют продуктивные заросли, часто произрастают совместно в одних растительных сообществах.
3. Размеры биологического и эксплуатационного запасов сырья м. лесного и лугового свидетельствуют о возможности промышленной заготовки травы.

## ГЛАВА 4: ИЗУЧЕНИЕ АНАТОМИЧЕСКОГО СТРОЕНИЯ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО В СРАВНЕНИИ С МАРЬЯННИКОМ ЛУГОВЫМ

С целью разработки проекта ФСП, регламентирующего качество растительного сырья, изучали анатомическое строение м. лесного в сравнении с микродиагностическими признаками м. лугового, изученными ранее на кафедре ботаники ПГФА под руководством профессора Петриченко В.М. [12, 73].

### 4.1. Анатомическое строение листа

Покровная ткань листа *m. sylvaticum* – эпидерма. Форма клеток эпидермы на обеих сторонах листа меняется в направлении от края листовой пластинки к главной жилке. Вдоль жилки располагаются клетки веретенообразной формы, которые постепенно переходят в волнистые и извилистые (рис. 8).

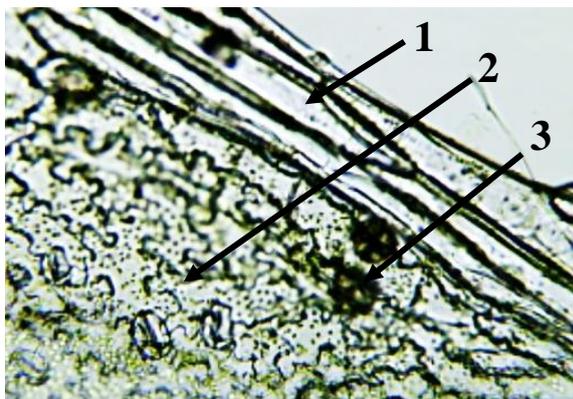


Рис. 8. Фрагмент нижней эпидермы, примыкающей к жилке листа *M. sylvaticum*: 1 - клетки веретеновидной формы; 2 – извилистые клетки; 3 – железка.

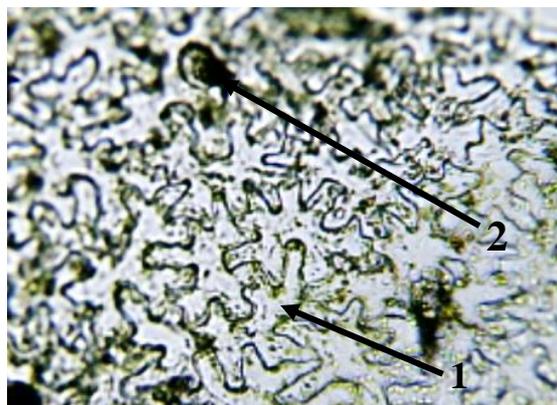


Рис. 9. Фрагмент верхней эпидермы листа *M. sylvaticum*: 1 – извилистые клетки; 2 – железка

На верхней эпидерме листа клетки более извилистые, чем с нижней стороны. В клетках верхней и нижней эпидермы хорошо видны лейкопласты (рис. 9).

По характеру расположения устьиц лист *M. лесного* является гипостоматическим, что характерно для растений из местообитаний с умеренным увлажнением.

Устьичный аппарат *M. лесного* аномоцитного типа. Устьица овальной формы, окружены 4-6 околоустьичными клетками с извилистыми стенками (рис. 10).

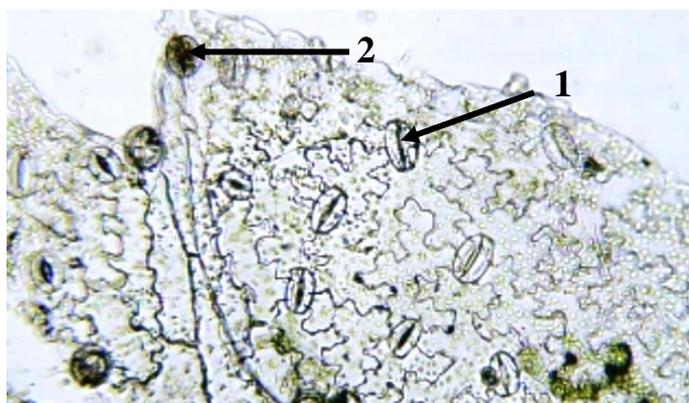


Рис. 10. Фрагмент нижней эпидермы листа *M. sylvaticum*: 1 – замыкающие клетки устьиц; 2 – железка

На эпидерме листа *M. лесного* было отмечено два типа трихом: простые волоски и железки. Одноклеточные, толстостенные, конические, слегка изогнутые, с гладкой кутикулой волоски встречаются на всей поверхности листовой пластинки (рис. 11). Железки, более сконцентрированные вдоль крупных жилок, имеют крупную однорядную шаровидную головку из четырех клеток (рис. 8, 9, 10, 12, 13, 14).



Рис. 11. Фрагмент нижней эпидермы листа *M. sylvaticum*: простой одноклеточный волосок



Рис. 12. Фрагмент нижней эпидермы листа *M. sylvaticum*: железка (вид сбоку)

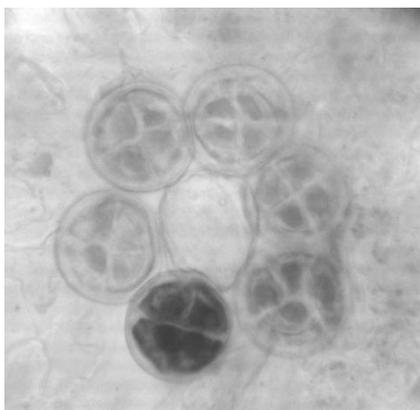


Рис. 13. Фрагмент нижней стороны листа *M. sylvaticum*: группа железок (вид сверху)

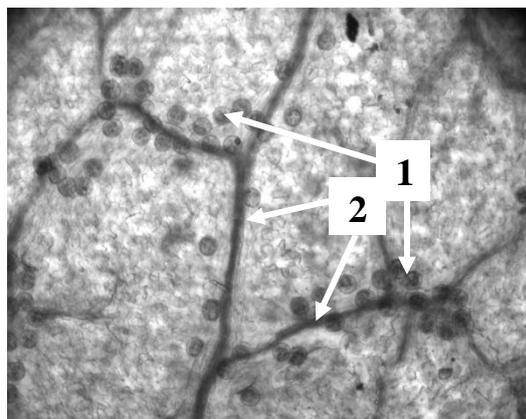


Рис. 14. Фрагмент нижней стороны листа *M. sylvaticum*: 1 – группы железок, 2 – жилки листа

Анатомическое строение клеток эпидермы, устьичного аппарата и такие же типы трихом были отмечены и для листьев м. лугового [13].

#### 4.2. Анатомическое строение стебля

Стебель м. лесного тонкий, гладкий, в поперечном сечении округлый, имеет беспучковое строение; покрыт эпидермой с гладкой кутикулой. На эпидерме также встречаются простые 2-4 клеточные волоски и четырехклеточные железки (рис. 15, 16).

Первичная кора слабо дифференцирована. Экзодерма представлена одним – двумя слоями рыхлой колленхимы (рис. 17); мезо- и эндодерма – крупноклеточной паренхимой. Перицикл также образован клетками основной ткани. Флоэма располагается узким кольцом, состоит из мелких клеток. Камбий заметен в виде тонкого слоя на границе ксилемы. Ксилема представлена сосудами и древесинными волокнами, расположенными рядами по радиусу; древесинная паренхима располагается в основном на границе с сердцевинной. Количество рядов ксилемы варьирует от 7 до 30 в зависимости от уровня среза. Хорошо выражена сердцевина, состоящая из крупных, тонкостенных клеток. В зависимости от уровня среза в центре стебля наблюдается полость (рис. 18).

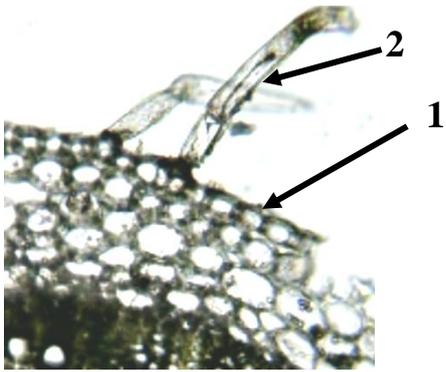


Рис. 15. Фрагмент поперечного среза стебля *M. sylvaticum*: 1 – эпидерма; 2 – простой двухклеточный волосок

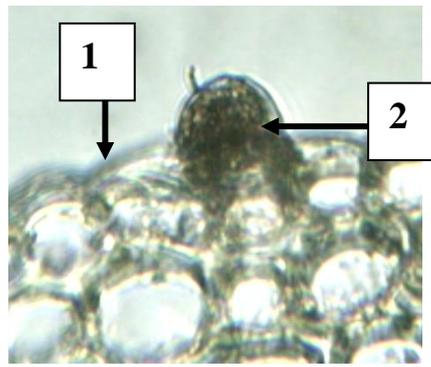


Рис. 16. Фрагмент поперечного среза стебля *M. sylvaticum*: 1 – эпидерма; 2 – четырехклеточная железка

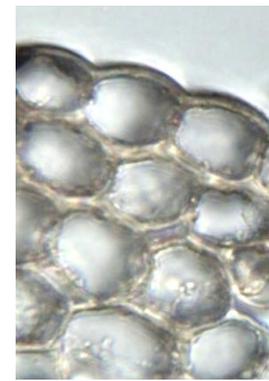


Рис. 17. Фрагмент поперечного среза стебля *M. sylvaticum*: рыхлая колленхима под эпидермой.

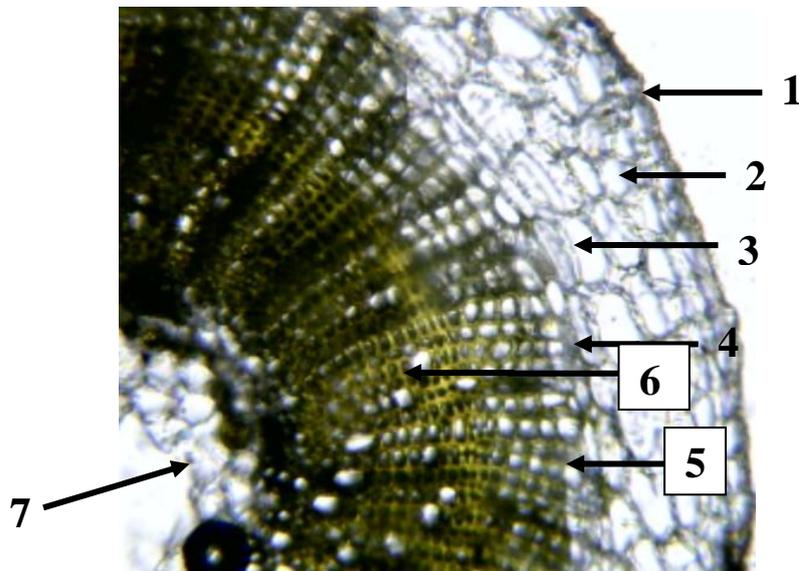


Рис. 18. Фрагмент поперечного среза стебля *M. sylvaticum*: 1 – эпидерма, 2 – рыхлая колленхима, 3 – перицикл, 4 – флоэма, 5 – камбий, 6 – ксилема, 7 – сердцевина

Анатомическое строение характерно для покровной ткани, первичной коры, проводящей системы и центральной части стебля м. лугового [12, 73].

### 4.3. Анатомическое строение корня

Главный корень имеет вторичное строение (рис. 19, 20). Покровная ткань представлена тонким слоем пробки, состоящим из крупных овальных клеток с

опробковевшими оболочками. Клетки наружного слоя частично разрушены, местами начинают отслаиваться (рис. 19). Под покровной тканью в коровой части располагаются крупные тангентально вытянутые паренхимные клетки. Флоэма состоит из мелких клеток, отдельные клетки слабо различимы, расположена кольцом. Линия камбия выражена нечетко. Центральную часть корня занимает древесина с крупными сосудами и древесинными волокнами, которые расположены лучами по радиусу (рис. 21). Паренхимные ткани практически отсутствуют.

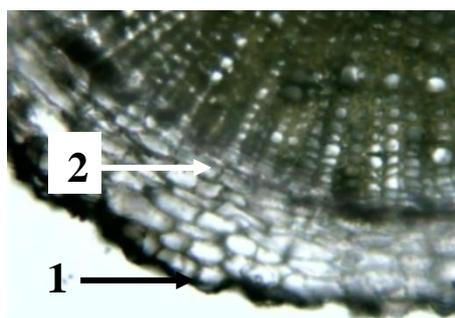


Рис. 19. Фрагмент поперечного среза главного корня *M. sylvaticum*: 1 – пробка, 2 – флоэма

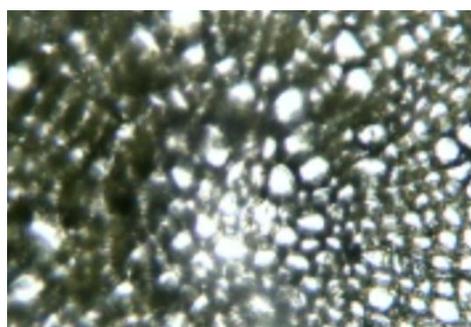


Рис. 20. Фрагмент поперечного среза главного корня *M. sylvaticum*: ксилема

Слабо выраженная покровная ткань, а также большое количество крупных сосудов с большим просветом в ксилемной части проводящей системы, очевидно, являются характерными особенностями корней растений-полупаразитов [42], активно поглощающих водно-солевой раствор из корневой системы растений-хозяев.

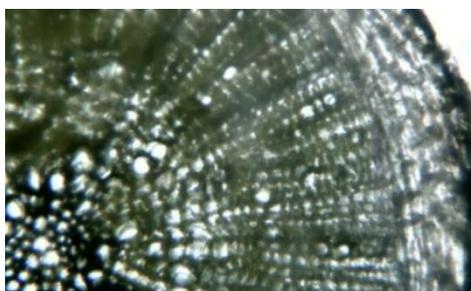


Рис. 21. Фрагмент поперечного среза главного корня *M. sylvaticum*

Картина анатомического строения корня м. лесного соответствует строению корня м. лугового и является типичной для растений-полупаразитов [42].

Анатомодиагностические признаки м. лесного и м. лугового представлены в таблице 8.

Таблица 8

## Анатомодиагностические признаки м. лесного и м. лугового

№ п/п	Органы и их составляющие	Характеристика признаков	
		М. лесной	М. луговой [12, 13]
<b>1</b>	<b>Лист:</b>		
	а) общее строение	Гипостоматический, с аномоцитным (беспорядочноклетным) расположением побочных клеток	Амфистоматический, с аномоцитным (беспорядочноклетным) расположением побочных клеток
	б) эпидерма	Клетки вдоль жилки веретенообразной формы, последовательно переходящие в волнистые и сильноизвилистые.	
	в) волоски: 1) простые	Одноклеточные, толстостенные, слегка изогнутые, с гладкой кутикулой	Одноклеточные, толстостенные, конические, слегка изогнутые, с гладкой поверхностью.  Двух-трехклеточные, толстостенные, с округлой базальной клеткой.
	г) железки	Крупная шаровидная однорядная головка из четырех клеток	
<b>2</b>	<b>Стебель:</b>		
	а) общее строение	Беспучкового строения. Первичная кора слабо дифференцирована (представлена двумя типами ткани). Сосуды и древесинные волокна расположены по радиусу рядами.	
	б) трихомы	Двух-трехклеточные, слегка изогнутые	Имеют однотипное строение с трихомами листа
	в) экзодерма коровой части	Представлена 1-2 слоями рыхлой колленхимы	Представлена прерывистым слоем пластинчатой колленхимы
	г) флоэма	Мелкоклеточная, расположена узким кольцом, лубяных волокон не содержит	
	в) сердцевина	Крупные тонкостенные паренхимные клетки, может содержать полость	Крупные тонкостенные паренхимные клетки, полость отсутствует.
<b>3</b>	<b>Корень:</b>		
	а) общее строение	Вторичное непучковое строение.	
	б) покровная ткань	Тонкий слой пробки	Эпидерма с опробковевшими оболочками

#### 4.4. Анатомическое строение семян

В связи с тем, что фаза плодоношения марьянников перекрывается с фазой цветения, при сборе травы в сырье могут встречаться плоды и отдельные семена.

Нами впервые были изучены морфолого-анатомические особенности семян м. лесного и м. лугового и выявлены их диагностические признаки [92].

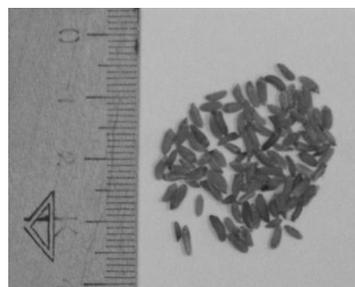
Семена двух видов рода Марьянник схожи по морфологическим признакам. Семена м. лугового и лесного имеют гладкую поверхность. Поскольку марьянники имеют мимеркохорный тип распространения, их семена имеют эллипсоидную форму, схожую по внешнему виду с личинками муравьев и имеют мясистые пирамидальные светло-коричневые или светло-желтые присемянники на конце (рис. 22, 23).

Исследуемые морфологические параметры представлены в таблице 9. Семена м. лесного более крупные, чем семена м. лугового, с достаточно большим ариллуcom. Также семена отличаются окраской.

Таблица 9

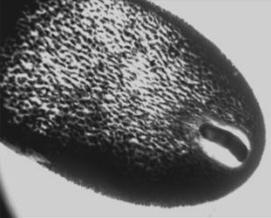
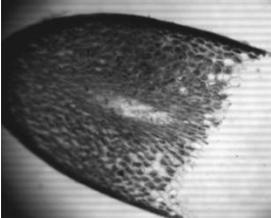
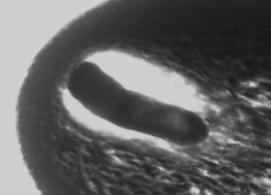
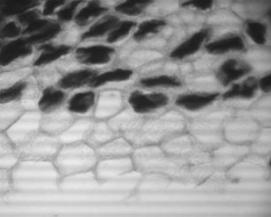
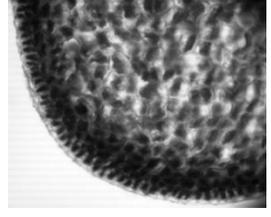
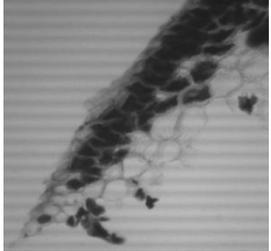
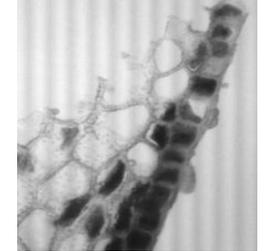
Морфологическое строение семян м. лугового и м. лесного

Вид	Масса 100 семян, г	Цвет	Длина, мм	Ширина, мм	Ариллус, мм	Отношение длины ариллуса к длине семени
М. луговой	0.51	Темно-бежевый	$4.14 \pm 0.09$	$1.35 \pm 0.05$	$0.97 \pm 0.02$	$0.25 \pm 0.01$
М. лесной	0.65	Коричневый	$5.09 \pm 0.10$	$2.15 \pm 0.04$	$1.11 \pm 0.06$	$0.23 \pm 0.01$

Рис. 22. Семена *M. sylvaticum*Рис. 23. Семена *M. pratense*

При исследовании анатомического строения семян изучали следующие признаки: особенности строения семенной кожуры, форма и строение зародыша, величина и форма питательной ткани (эндосперма) (табл. 10).

Таблица 10  
Анатомическое строение семян м. лесного и м. лугового

	М. лесной	М. луговой
Продольный срез семени		
Зародыш семени		
Питательная ткань (эндосперм)		
Спермодерма		

Семенная кожура образована толстостенными квадратными или прямоугольными клетками. Питательная ткань у исследуемых видов представлена эндоспермом мучнистой консистенции, состоящим из продолговатых многоугольных клеток с пористыми стенками. Клетки ариллуса паренхимные, продолговато-округлые, плотно расположенные с прозрачным содержимым. М. лесному и м. луговому присуще характерное строение зародыша: апикальный (расположен у верхушки семени), маленький (занимает в семени меньше половины пространства), прямой.

## Выводы

Таким образом, в результате проведенных исследований изучены основные анатомические характеристики м. лесного и проведен сравнительный анализ микродиагностических признаков м. лугового и м. лесного.

1. Анатомическое строение вегетативных органов м. лесного очень схоже с м. луговым. Общими признаками в анатомии листа будут считаться строение клеток эпидермы, наличие одноклеточных трихом и шаровидных железок, имеющих короткую ножку и четырехклеточную головку.

2. Стебель м. лесного и м. лугового имеет беспучковый тип проводящей системы с хорошо выраженной древесиной, представленной сосудами и древесинными волокнами, расположенными рядами по радиусу. Главный корень имеет вторичное строение, покрыт тонким слоем пробки, с хорошо развитой ксилемой, образованной большим количеством крупнопросветных сосудов.

3. Отличительными анатомодиагностическими признаками вегетативных органов м. лесного можно считать отсутствие многоклеточных волосков на листьях, хорошо выраженную экзодерму в первичной коре стебля, представленную рыхлой колленхимой.

4. Морфологическое строение семян является видоспецифичным для каждого марьятника, а в анатомическом строении, так же как и для вегетативных органов, не отмечено значительных различий.

## **ГЛАВА 5. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ, РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ ГРУПП БАВ И ОЦЕНКА КАЧЕСТВА СЫРЬЯ И ЭКСТРАКТОВ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И ЛУГОВОГО**

Терапевтические свойства лекарственных растений определяются содержанием биологически активных соединений. Химические соединения, находящиеся в растениях, в силу своего природного происхождения, обладают мягким и комплексным действием на организм.

Анализ литературных данных показал, что м. лесной является морфологически близким видом к м. луговому, при этом химический состав м. лесного изучен недостаточно.

С использованием хроматографических и спектральных методов нами был изучен качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ травы м. лесного, а также был проведен сравнительный анализ качественного и количественного состава экстрактов, полученных из травы м. лесного и м. лугового.

### **5.1. Качественный анализ на содержание основных групп БАВ**

Нами был изучен состав м. лесного на содержание флавоноидов, кумаринов, иридоидов, дубильных веществ, алкалоидов, аскорбиновой кислоты (табл. 11) при совместном присутствии [91].

Водное и водно-спиртовые извлечения, полученные из травы м. лесного имели окраску от светло-коричневого до темно-зеленого цвета. Поэтому все реакции проводили в сравнении с исходными извлечениями, видимый эффект реакции в ряде случаев отличался от стандартного.

Положительный эффект цианидиновой пробы (проба Синода) свидетельствует о присутствии окисленных флавоноидов. В контрольной пробирке без добавления металлического магния реакции с концентрированными минеральными кислотами положительны, что говорит о раскрытии пиронового кольца и (или) о наличии халконов и ауронов [94, 105].

## Фитохимическое исследование травы м. лесного на содержание основных групп БАВ

Извлечение из сырья	Фенольные соединения									Алкалоиды				Аскорбиновая кислота	Иридоиды		
	Флавоноиды					Кумарины		Дубильные		Реактив Бушарда	Реактив Шейблера	Реактив Драгендорфа	Реактив Майера	2,6-дихлорфенолиддофенолят натрия	Реактив Тримм - Хилла	Реактив Штала	Реактив Бекона - Эдельмана
	Проба Синода	Конц. HCl, конц. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1% раствор AlCl <sub>3</sub>	5% раствор FeCl <sub>3</sub>	5% раствор Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Лактонная проба - 10% раствор NaOH	Образование азокрасителя	ЖАК	1% раствор желатина								
Экстрагент: вода и водно-спиртовые растворы (концентрация этилового спирта)																	
Вода	Р	Св-к	Ж	К-ж	Я-ж	Ж	Св-к	Ж	Св-к	++	+	+	—	Ч	—	—	—
10%	Ж-з	Ор	Ж	Ж-з	Я-ж	Ж	Ж	Ж-з	Ор	—	—	—	—	С	+++	+++	++
20%	Ж-з	Ор	Ж	Т ж-з	Я-ж	Ж	Ж-ор	Ж-з	Ор	—	+	—	—	С-з	++	++	+
40%	Ж-з	Ор	Ж	Т ж-з	Я-ж	Ж	Я-ж	Т ж-з	Ор	+	+	—	—	С-з	++	++	++
50%	Ж-з	Ор	Ж	Т ж-з	Я-ж	Ж	Я-ж	З-к	Ор	+	+	—	—	З-с	+	+	++
70%	Т-з	К-ор	Ж	Т ж-з	Я-ж	Ж	Ж-ор	Т з-к	Ор	+	++	—	—	З-с*	++	++	++
Органы растения																	
Трава	Ж-з	Ор	Ж	Т ж-з	Я-ж	Ж	Я-ж	Т ж-з	Св-ор	+	+	—	—	З-с	++	++	++
Листья	Ж-з	К-ор	Ж	Ор	Я-ж	Ж	Ор	Т-ж	Ор	+	+	—	+	Т-с	++	++	+++
Стебли	Ж-з	Р	Ж	К-ж	Я-ж	Ж	Ж	Т-ж	Св-ор	—	+	—	—	С	+	+	++
Цветки	Ч	К-ор	Ж	Т-ор	Я-ж	Ж	Ор-к	Т-ж	Ор	+	+	—	—	К	+++	+++	+++
Корни	Ж-з	Ор	Ж	Ж-з	Я-ж	Ж	Ж	Ж	Ж	—	—	—	—	—	±	±	+

Примечание: ЖАК – 1%-ный раствор железосамониевых квасцов. Видимый эффект реакции: Р - розовый, Ж – желтый, К – красный, З – зеленый, Ч – черный, Ор – оранжевый, С – синий, Т – темный, Св – светлый, Я – яркий. З-с\* - зеленовато-синий; — - отрицательный, ± - очень слабо выраженный, + - слабо выраженный, ++ - выраженный, +++ - сильно выраженный

В водное извлечение извлекается хлорофилла меньше, чем в водно-спиртовые; видимый эффект реакции с водным извлечением – розовое окрашивание, в остальных извлечениях розово-красная окраска маскируется хлорофиллом. Реакция образования азокрасителя положительна. Отсутствие моментальной окраски с диазореактивом при наличии флавоноидов в извлечении из сырья указывает, что в структуре флавоноидов гидроксильная группа в положении С<sub>7</sub> гликозидирована [58].

Кумарины были доказаны положительной лактонной пробой. Образование азокрасителя после раскрытия лактонного кольца подтверждает их присутствие.

Отрицательный эффект реакции, характерный для извлечений из травы м. лесного, с раствором желатина говорит об отсутствии истинных дубильных веществ. В реакции с ЖАК ожидаемой черной окраски не наблюдали, но появившиеся в результате различные оттенки желтого и зеленого подтверждают наличие фенольных соединений, в том числе флавоноидов [102].

Положительный эффект реакции с общеалкалоидными осадительными реактивами (Бушарда, Шейблера, Драгендорфа, Майера) указывает на присутствие в сырье алкалоидов.

Аскорбиновую кислоту доказывали реакцией с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия по обесцвечиванию реактива. В отсутствии аскорбиновой кислоты извлечение с реактивом имеет сине-зеленое окрашивание. Изменение цвета раствора свидетельствует о наличии органических кислот, в том числе аскорбиновой кислоты.

Наличие иридоидов подтвердили реакциями с реактивом Тримм – Хилла, видимый эффект – различное по интенсивности синее окрашивание; с реактивом Шталя (ярко-голубое окрашивание); с реактивом Бекона – Эдельмана (темно-коричневое или черное окрашивание).

По органам растения вещества распределены неравномерно. Более широкое разнообразие биологически активных веществ наблюдается в цветках и листьях, наименьшее – в корнях.

При сравнительном анализе экстрактов двух исследуемых видов было установлено, что качественный состав отличается незначительно (табл. 12).

Таблица 12

Результаты фитохимического исследования экстрактов  
м. лесного и м. лугового на содержание основных групп БАВ

Группа БАВ	Реактив	Экстракт				
		М. луговой спиртовой	М. лесной спиртовой	М. луговой водный	М. лесной спиртовой	
Фенольные соединения	Флавоноиды	Проба Синода	Желто-зеленый			
		5% раствор NaOH	Желтый			
		1% раствор AlCl <sub>3</sub>	Желтый			
		5% раствор FeCl <sub>3</sub>	Темный желто-зеленый			
		5% раствор Pb(CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub>	Желтый осадок	Ярко-желтый осадок	Желтый осадок	Ярко-желтый осадок
	Кумарины	Лактонная проба	Помутнение раствора			
		10% раствор NaOH	Желтый			
		Образование азокрасителя	Коричнево-оранжевый		Желтый	
	Дубильные	ЖАК	Черно-синий	Темно-зеленый	Черно-синий	Темно-коричневый
		1% раствор желатина	Оранжевый	Коричневый	Оранжевый	Оранжево-коричневый
Алкалоиды	Реактив Бушарда	Бурый осадок				
	Реактив Шейблера	Белый аморфный осадок				
	Реактив Драгендорфа	Оранжевый	Бурый	Оранжевый	Красно-бурый	
	Реактив Вагнера	Бурый	Темно-бурый	Бурый	Темно-бурый	
	Пикриновая кислота	Желто-бурый осадок				
Иридоиды	Реактив Тримм – Хилла	Синий				
Аминокислоты	0.5% раствор нингидрина	Фиолетовый				

Положительные реакции с соответствующими реактивами свидетельствуют о наличии в исследуемых экстрактах окисленных

флавоноидов, халконов, ауранов, кумаринов, иридоидов, аминокислот, алкалоидов. В реакции с ЖАК в экстрактах м. лугового появляется черно-синее окрашивание, что говорит о присутствии гидролизуемых дубильных веществ; а экстрактах м. лесного обнаружить истинные дубильные вещества не удалось.

## 5.2. Анализ фенольных соединений

По результатам качественных реакций можно сказать, что все органы м. лесного и экстракты содержат фенольные соединения – это, прежде всего, флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты. Одним из классических методов для разделения и идентификации фенольных соединений является распределительная хроматография на бумаге и в тонком слое [104].

Двумерная хроматография выполнена для извлечения из травы м. лесного, экстрактов м. лесного и м. лугового.

Были использованы следующие системы растворителей [10]:

Первое направление: изопропанол - муравьиная кислота - вода (2:5:6)

Второе направление: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2).

Свидетели: цинарозид, гиперозид, изокверцитрин, хлорогеновая кислота.

Хроматограммы просматривали в УФ-свете, проявляли парами аммиака, 2% раствором алюминия хлорида, реактивом Гепфнера.

В УФ-свете флавоноиды флюоресцируют: гликозиды – темно-коричневым, антоцианы – темно-коричневым или черным, агликоны флавонолы – ярко-желтым светом, флавоны - коричневым, халконы и аураны – желтым или оранжевым; флаваноны и катехины не обнаруживаются; кумарины флюоресцируют желтым, желто-зеленым, ярко-голубым, синим и фиолетовым цветом, фенолкарбоновые кислоты имеют голубую флюоресценцию. После обработки парами аммиака, флюоресценция пятен в УФ-свете усиливается или изменяется: флавоны флюоресцируют ярко-

желтым, гликозиды флавонолов и флаванонов – бледно-желтым [46, 105]. При обработке 2% спиртовым раствором алюминия хлорида пятна флавонов в видимом свете окрашиваются в бледно-жёлтый цвет, в УФ – свете – в желто-коричневый; флавонолы – в видимом свете приобретают желтый, а в УФ – свете – желто-зеленый цвет [105]. Продукты реакции взаимодействия фенолкарбоновых кислот с реактивом Гепфнера проявляются пятнами красно-коричневого цвета.

В результате проведенных хроматографических исследований было подтверждено наличие фенольных соединений в траве и экстрактах м. лесного. В траве обнаружено не менее 17 веществ фенольной природы – 11 флавоноидов и 6 фенолкарбоновых кислот (рис. 24). Фенольные соединения неравномерно распределяются по органам растений (табл. 13). В листьях обнаружено максимальное количество фенольных веществ – 10 флавоноидов и 4 фенолкарбоновые кислоты. В цветках и стеблях фенольных соединений меньше – 6 флавоноидов и 2 фенолкарбоновые кислоты, 5 флавоноидов и 3 фенолкарбоновые кислоты соответственно. В корнях содержится минимальное количество флавоноидов – 3 вещества, и 4 фенолкарбоновые кислоты (табл. 13).

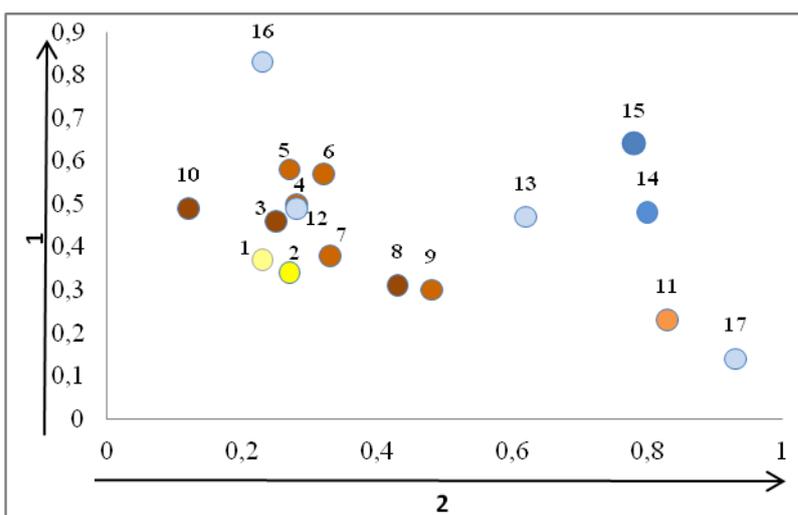


Рис. 24. Схема хроматограммы фенольных соединений травы м. лесного в УФ свете. Системы растворителей: 1-е направление: изопропанол - муравьиная кислота - вода (2:5:6); 2-е направление: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2).

Сравнительная люминисцентно-хроматографическая характеристика фенольных соединений травы м. лесного и стандартных образцов фенольных соединений

№	R <sub>f</sub> 1	R <sub>f</sub> 2	Окраска пятен				Цветки	Листья	Стебли	Корни
			УФ	NH <sub>3</sub>	2% раствор AlCl <sub>3</sub>	Реактив Гепфнера				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	0.37	0.23	Бледно-желтый	Бледно-желтый	Желтый	-		+	+	
2	0.34	0.27	Ярко-желтый	Ярко-желтый	Желтый	-	+	+	+	+
3	0.46	0.25	Темно-коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-	+	+		
4	0.50	0.28	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-		+		
5	0.58	0.27	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	+	+		+
6	0.57	0.32	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-		+		+
7	0.38	0.33	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-		+		
8	0.31	0.43	Темно-коричневый	Желтый	Желтый	-	+	+	+	
9	0.30	0.48	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	+	+	+	
10	0.49	0.12	Темно-коричневый	Темно-коричневый	Желтый	-			+	+
11	0.23	0.83	Светло-коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	+	+		
12	0.49	0.28	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый		+	+	+
13	0.47	0.62	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый		+		+
14	0.48	0.80	Голубой	Ярко-голубой	-	Оранжевый	+	+		+
15	0.64	0.78	Голубой	Голубой	-	Оранжевый				+
16	0.83	0.23	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый	+		+	
17	0.14	0.93	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый			+	
1		0.27	Ярко-желтый	Ярко-желтый	Желтый	-	Лютеолин			
2		0.42	Темно-коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-	Цинарозид			
3		0.48	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	Гиперозид			
4		0.83	Светло-коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	Изокверцитрин			
5		0.80	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый	Хлорогеновая кислота			

Примечание: системы: 1-е направление: изопропанол – муравьиная кислота – вода (2:5:6); 2-е направление: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2)

Сравнительный хроматографический анализ экстрактов исследуемых видов показал незначительные различия в компонентном составе фенольных соединений марьянников (табл. 14).

Сравнительная люминисцентно-хроматографическая характеристика фенольных соединений экстрактов м. лесного и м. лугового и стандартных образцов фенольных соединений

№	R <sub>f</sub> 1	R <sub>f</sub> 2	Окраска пятен				М.лесной	М.луговой
			УФ	NH <sub>3</sub>	2% раствор AlCl <sub>3</sub>	Реактив Гепфнера		
1	0.78	0.20	Коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-	+	+
2	0.65	0.38	Желтый	Желтый	Желтый	-		+
3	0.62	0.20	Желтый	Желтый	Желтый	-	+	+
4	0.59	0.35	Коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-		+
5	0.51	0.12	Желтый	Желтый	Желтый	-	+	
6	0.52	0.28	Желтый	Желтый	Желтый	-	+	+
7	0.46	0.42	Желто-коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-	+	+
8	0.46	0.29	Желтый	Желтый	Желтый	-	+	+
9	0.34	0.25	Желтый	Желтый	Желтый	-	+	
10	0.33	0.40	Ярко-желтый	Желтый	Желтый	-	+	+
11	0.31	0.35	Желтый	Желтый	Желтый		+	
12	0.48	0.76	Темно-голубой	Голубой	-	Оранжевый	+	+
13	0.59	0.80	Голубой	Ярко-голубой	-	Оранжевый	+	+
14	0.92	0.36	Бледно-голубой	Голубой	-	Оранжевый	+	+
15	0.13	0.15	Бледно-голубой	Голубой	-	Оранжевый		+
<hr/>								
1		0.27	Ярко-желтый	Ярко-желтый	Желтый	-	Лютеолин	
2		0.42	Темно-коричневый	Ярко-желтый	Желтый	-	Цинарозид	
3		0.48	Коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	Гиперозид	
4		0.83	Светло-коричневый	Бледно-желтый	Желтый	-	Изокверци трин	
5		0.80	Бледно-голубой	Бледно-голубой	-	Оранжевый	Хлорогено вая кислота	

Примечание: системы: 1-е направление: изопропанол – муравьиная кислота – вода (2:5:6);  
2-е направление: н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

В экстракте м. лесного было обнаружено 12 веществ флавоноидной природы, три из которых по хроматографическому поведению и окраске хромогенными реактивами были отнесены к фенолкарбоновым кислотам и 9 – к флавоноидам (рис. 25). В экстракте м. лугового также обнаружено 12 веществ флавоноидной природы, при этом 4 вещества (вещества № 12 – 15) относятся к фенолкарбоновым кислотам и 8 (№ 1 – 11) – к флавоноидам (рис. 26).

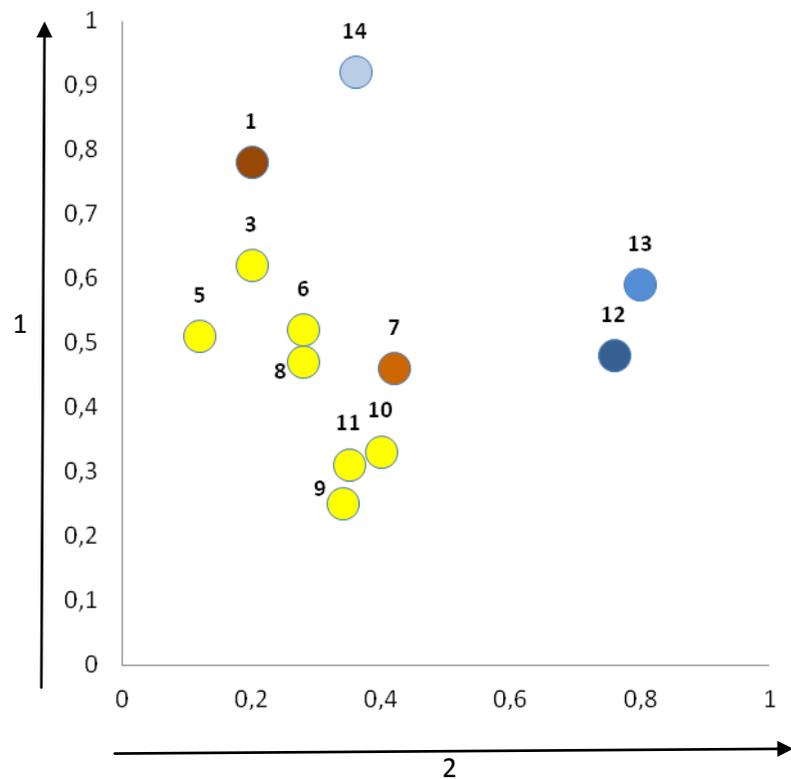


Рис. 25. Схема хроматограммы фенольных соединений спиртового экстракта м. лесного в УФ свете.  
Системы растворителей:  
1-е направление: изопропанол - муравьиная кислота - вода (2:5:6);  
2-е направление: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2).

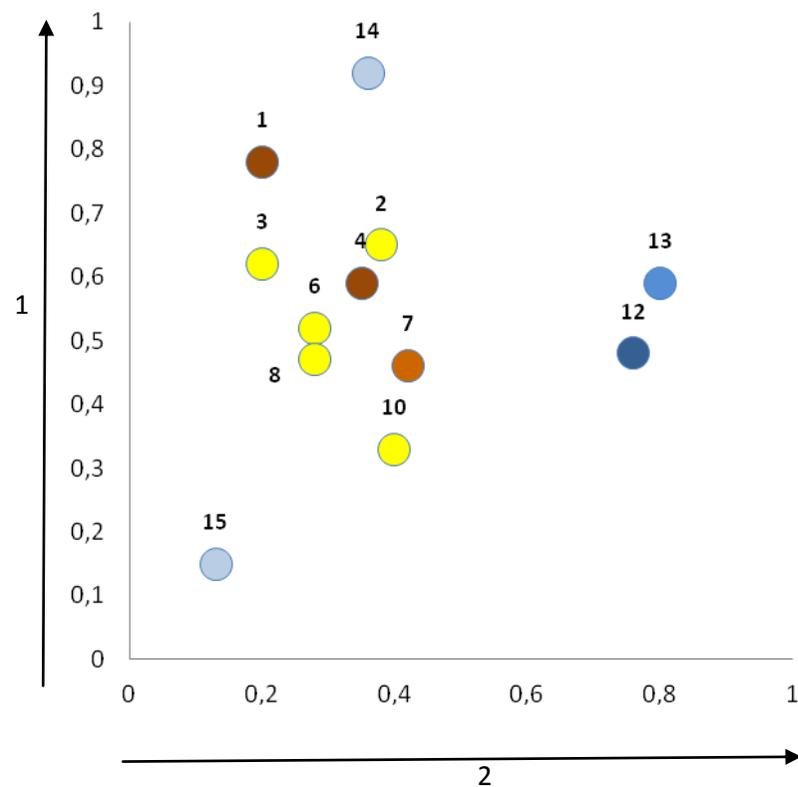


Рис. 26. Схема хроматограммы фенольных соединений спиртового экстракта м. лугового в УФ свете.  
Системы растворителей:  
1-е направление: изопропанол - муравьиная кислота - вода (2:5:6);  
2-е направление: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2)

В качестве экспресс-метода идентификации веществ фенольной природы была проведена круговая хроматография.

Извлечения из травы м. лесного и экстракты сравнивали с аналогичным извлечением из травы и экстрактами м. лугового, в аналогичных условиях определяли в качестве свидетеля цинарозид (рис. 27).



Рис. 27. Схема круговой хроматограммы извлечений из травы и экстрактов м. лесного и м. лугового в системе: уксусная кислота : вода (15:85). А - спиртовый экстракт, Б - водный экстракт, В - водно-спиртовое извлечение.

Флюоресценция в УФ-свете, изменения окраски полос при обработке раствором аммиака и 1% раствором алюминия хлорида свидетельствует о наличии флавоноидов в м. лесном и м. луговом. Близкие величины  $R_f$  со свидетелем цинарозидом (табл. 15) подтверждают наличие в сырье флавоно-7-гликозидов, что совпадает с результатами качественных реакций.

Таблица 15

Люминисцентно-хроматографическая характеристика фенольных соединений в траве и экстрактах м. лугового и м. лесного методом круговой хроматографии.

№	Величина $R_f$						Свидетель Цинарозид
	М. лесной			М. луговой			
	Водно-спиртовое извлечение	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водно-спиртовое извлечение	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	
1	0.14	0.15	0.15			0.15	
2	<b>0.32</b>	<b>0.28</b>	<b>0.28</b>	<b>0.28</b>	<b>0.28</b>	<b>0.30</b>	<b>0.3</b>
3		0.64	0.64	0.63	0.64	0.63	
4		0.81	0.82				
5					0.90	0.89	

Наиболее современным методом является ТСХ. Для исследования флавоноидов методом ТСХ использовали системы растворителей: 1. Этилацетат –

муравьиная кислота – вода (80:10:10); 2. Этилацетат – уксусная кислота – вода (10:4:1); 3. Уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат – пропанол (0.5:10:20:20); 4. Этилацетат – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота – вода (100:10:10:25). Оптимальной для хроматографического разделения была принята система: уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат – пропанол (0.5:10:20:20).

Было обнаружено от пяти до восьми веществ флавоноидной природы в составе экстрактов марьянников (табл. 16), что существенно меньше, чем при разделении веществ на бумаге. Вещество № 10 проявляется в спиртовом экстракте м. лесного и водном м. лугового, в других экстрактах это вещество отсутствует. Возможно, что это два вещества флавоноидной природы, имеющие в данной системе близкие величины  $R_f$ . Система не подходит для разделения фенолкарбоновых кислот в экстрактах марьянников.

Таблица 16

Сравнительная люминисцентно-хроматографическая характеристика фенольных соединений экстрактов м. лесного и м. лугового и стандартных образцов фенольных соединений

№	$R_f$	Окраска пятен		М.лесной		М.луговой	
		УФ	2% $AlCl_3$	Спиртовый	Водный	Спиртовый	Водный
1	2	3	4	5	6	7	8
1	0.88	Коричневый	Желтый	+	+	+	+
2	0.85	Коричневый	Желтый	+	+	+	+
3	0.80	Желтый	Желтый	+			
4	0.77	Желтый	Желтый			+	+
5	0.75	Желтый	Желтый		+		
6	0.73	Темно-коричневый	Желтый	+		+	+
7	0.65	Желтый	Желтый			+	
8	0.53	Светло-коричневый	Желтый	+	+		
9	0.43	Светло-желтый	Желтый			+	+
10	0.36	Желтый	Желтый	+			+
11	0.25	Желтый	Желтый			+	
12	0.15	Ярко-желтый	Желтый		+		+
13	0.10	Коричневый	Желтый	+			
14	0.07	Желтый	Желтый	+		+	
<hr/>							
1	0.31	Желтый	Желтый	Кверцетин			
2	0.34	Желтый	Желтый	Рутин			
3	0.85	Коричневый	Желтый	Гиперозид			

Продолжение таблицы				
1	2	3	4	5
4	0.88	Коричневый	Желтый	Цинарозид
5	0.95	Желтый	Желтый	Гесперидин
6	0.96	Ярко-желтый	Желтый	Лютеолин
7	0.97	Желтый	Желтый	Нарингенин
8	0.92	Голубой	-	Кофейная кислота
9	0.92	Голубой	-	Феруловая кислота
10	0.94	Голубой	-	Хлорогеновая кислота

\*Примечание: система уксусная кислота ледяная – вода – этилацетат – пропанол (0.5:10:20:20)

Для обнаружения кумаринов использовали систему растворителей гексан – ацетон (1:1). Реактив для обнаружения – 1% спиртовый раствор калия гидроксида (табл. 17).

Таблица 17

Сравнительная люминисцентно-хроматографическая характеристика кумаринов экстрактов м. лесного и м. лугового и стандартных образцов кумаринов

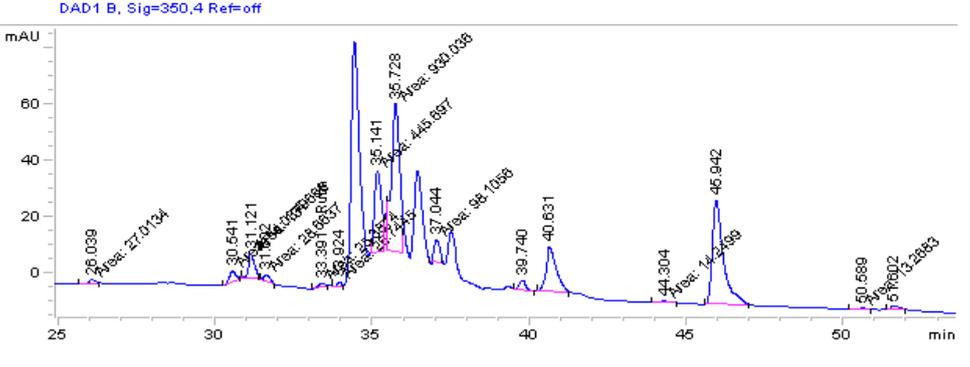
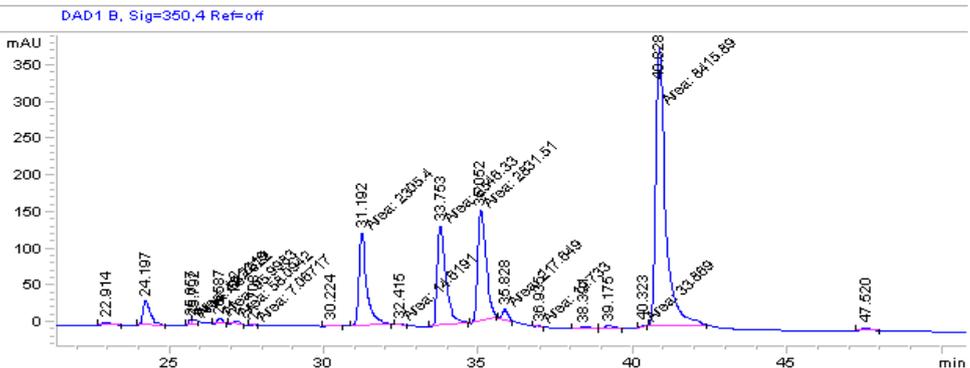
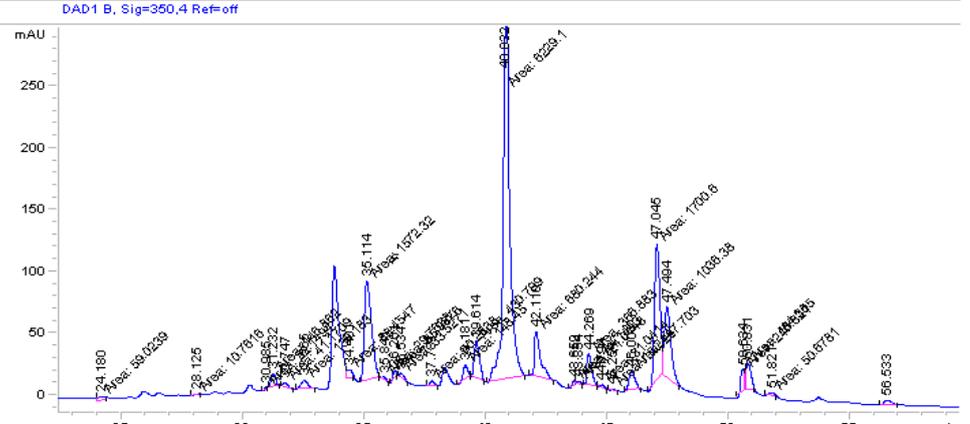
№	R <sub>f</sub>	Окраска пятен		М.лесной		М.луговой	
		УФ	1% раствор КОН	Спиртовый экстракт	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водный экстракт
1	0.20	Голубой	Желтый	+		+	
2	0.40	Желтый	Желтый		+		
3	0.46	Желтый	Желтый	+			
<hr/>							
1	0.20	Голубой	Оранжевый	Умбелиферон			
2	0.51	Коричневый	Коричневый	Кумарин			

В результате проведенного ТСХ-анализа в экстрактах обнаружено от одного до двух веществ группы кумаринов. Кумарины в экстрактах присутствуют в следовых количествах и, вероятно, не оказывают значительного влияния на фармакологическую активность марьянников.

Для более точной идентификации фенольных соединений нами была проведено исследование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) травы, спиртовых и водных экстрактов, а также фракции флавоноидов м. лесного и м. лугового (табл. 18).

## Хроматограммы травы, экстрактов и фракции флавоноидов марьянников

Объект	Хроматограмма	Кол-во веществ флавоноидной природы
1	2	3
Трава м. лесного		15
Трава м. лугового		16
Спиртовой экстракт м. лесного		11
Спиртовой экстракт м. лугового		17

1	2	3
Водный экстракт м. лесного	 <p>DAD1 B, Sig=350,4 Ref=off</p> <p>20.039 Area: 27.0134 30.641 Area: 1.067538 31.121 Area: 1.067538 33.301 Area: 1.067538 33.924 Area: 1.067538 35.141 Area: 1.067538 35.728 Area: 1.067538 36.145 Area: 445.8571 37.044 Area: 1.067538 38.740 Area: 98.10355 40.631 Area: 1.067538 44.304 Area: 1.067538 46.942 Area: 1.067538 50.589 Area: 1.067538 51.902 Area: 1.067538 53.2853 Area: 1.067538</p>	15
Водный экстракт м. лугового	 <p>DAD1 B, Sig=350,4 Ref=off</p> <p>22.814 Area: 1.067538 24.197 Area: 1.067538 25.957 Area: 1.067538 26.637 Area: 1.067538 27.121 Area: 1.067538 27.605 Area: 1.067538 28.089 Area: 1.067538 28.573 Area: 1.067538 29.057 Area: 1.067538 30.224 Area: 1.067538 31.192 Area: 1.067538 32.415 Area: 1.067538 33.763 Area: 1.067538 34.0191 Area: 1.067538 35.828 Area: 1.067538 36.052 Area: 1.067538 36.316.33 Area: 1.067538 36.94271 Area: 1.067538 38.36973 Area: 1.067538 39.17573 Area: 1.067538 40.323 Area: 1.067538 46.628 Area: 8415.59 46.942 Area: 1.067538 47.520 Area: 1.067538</p>	19
Фракция флавоноидов м. лесного	 <p>DAD1 B, Sig=350,4 Ref=off</p> <p>24.180 Area: 1.067538 25.125 Area: 1.067538 26.125 Area: 1.067538 27.121 Area: 1.067538 28.089 Area: 1.067538 29.057 Area: 1.067538 30.224 Area: 1.067538 31.192 Area: 1.067538 32.415 Area: 1.067538 33.763 Area: 1.067538 34.0191 Area: 1.067538 35.114 Area: 1.067538 35.828 Area: 1.067538 36.052 Area: 1.067538 36.316.33 Area: 1.067538 36.94271 Area: 1.067538 38.36973 Area: 1.067538 39.17573 Area: 1.067538 40.323 Area: 1.067538 46.628 Area: 8229.1 47.045 Area: 1.067538 47.994 Area: 1.067538 48.588 Area: 1.067538 49.045 Area: 1.067538 49.502 Area: 1.067538 49.959 Area: 1.067538 50.416 Area: 1.067538 50.873 Area: 1.067538 51.330 Area: 1.067538 51.787 Area: 1.067538 52.244 Area: 1.067538 52.701 Area: 1.067538 53.158 Area: 1.067538 53.615 Area: 1.067538 54.072 Area: 1.067538 54.529 Area: 1.067538 54.986 Area: 1.067538 55.443 Area: 1.067538 55.899 Area: 1.067538 56.356 Area: 1.067538 56.813 Area: 1.067538 57.270 Area: 1.067538 57.727 Area: 1.067538 58.184 Area: 1.067538 58.641 Area: 1.067538 59.098 Area: 1.067538 59.555 Area: 1.067538 60.012 Area: 1.067538 60.469 Area: 1.067538 60.926 Area: 1.067538 61.383 Area: 1.067538 61.840 Area: 1.067538 62.297 Area: 1.067538 62.754 Area: 1.067538 63.211 Area: 1.067538 63.668 Area: 1.067538 64.125 Area: 1.067538 64.582 Area: 1.067538 65.039 Area: 1.067538 65.496 Area: 1.067538 65.953 Area: 1.067538 66.410 Area: 1.067538 66.867 Area: 1.067538 67.324 Area: 1.067538 67.781 Area: 1.067538 68.238 Area: 1.067538 68.695 Area: 1.067538 69.152 Area: 1.067538 69.609 Area: 1.067538 70.066 Area: 1.067538 70.523 Area: 1.067538 70.980 Area: 1.067538 71.437 Area: 1.067538 71.894 Area: 1.067538 72.351 Area: 1.067538 72.808 Area: 1.067538 73.265 Area: 1.067538 73.722 Area: 1.067538 74.179 Area: 1.067538 74.636 Area: 1.067538 75.093 Area: 1.067538 75.550 Area: 1.067538 76.007 Area: 1.067538 76.464 Area: 1.067538 76.921 Area: 1.067538 77.378 Area: 1.067538 77.835 Area: 1.067538 78.292 Area: 1.067538 78.749 Area: 1.067538 79.206 Area: 1.067538 79.663 Area: 1.067538 80.120 Area: 1.067538 80.577 Area: 1.067538 81.034 Area: 1.067538 81.491 Area: 1.067538 81.948 Area: 1.067538 82.405 Area: 1.067538 82.862 Area: 1.067538 83.319 Area: 1.067538 83.776 Area: 1.067538 84.233 Area: 1.067538 84.690 Area: 1.067538 85.147 Area: 1.067538 85.604 Area: 1.067538 86.061 Area: 1.067538 86.518 Area: 1.067538 86.975 Area: 1.067538 87.432 Area: 1.067538 87.889 Area: 1.067538 88.346 Area: 1.067538 88.803 Area: 1.067538 89.260 Area: 1.067538 89.717 Area: 1.067538 90.174 Area: 1.067538 90.631 Area: 1.067538 91.088 Area: 1.067538 91.545 Area: 1.067538 92.002 Area: 1.067538 92.459 Area: 1.067538 92.916 Area: 1.067538 93.373 Area: 1.067538 93.830 Area: 1.067538 94.287 Area: 1.067538 94.744 Area: 1.067538 95.201 Area: 1.067538 95.658 Area: 1.067538 96.115 Area: 1.067538 96.572 Area: 1.067538 97.029 Area: 1.067538 97.486 Area: 1.067538 97.943 Area: 1.067538 98.400 Area: 1.067538 98.857 Area: 1.067538 99.314 Area: 1.067538 99.771 Area: 1.067538 100.228 Area: 1.067538 100.685 Area: 1.067538 101.142 Area: 1.067538 101.599 Area: 1.067538 102.056 Area: 1.067538 102.513 Area: 1.067538 102.970 Area: 1.067538 103.427 Area: 1.067538 103.884 Area: 1.067538 104.341 Area: 1.067538 104.798 Area: 1.067538 105.255 Area: 1.067538 105.712 Area: 1.067538 106.169 Area: 1.067538 106.626 Area: 1.067538 107.083 Area: 1.067538 107.540 Area: 1.067538 107.997 Area: 1.067538 108.454 Area: 1.067538 108.911 Area: 1.067538 109.368 Area: 1.067538 109.825 Area: 1.067538 110.282 Area: 1.067538 110.739 Area: 1.067538 111.196 Area: 1.067538 111.653 Area: 1.067538 112.110 Area: 1.067538 112.567 Area: 1.067538 113.024 Area: 1.067538 113.481 Area: 1.067538 113.938 Area: 1.067538 114.395 Area: 1.067538 114.852 Area: 1.067538 115.309 Area: 1.067538 115.766 Area: 1.067538 116.223 Area: 1.067538 116.680 Area: 1.067538 117.137 Area: 1.067538 117.594 Area: 1.067538 118.051 Area: 1.067538 118.508 Area: 1.067538 118.965 Area: 1.067538 119.422 Area: 1.067538 119.879 Area: 1.067538 120.336 Area: 1.067538 120.793 Area: 1.067538 121.250 Area: 1.067538 121.707 Area: 1.067538 122.164 Area: 1.067538 122.621 Area: 1.067538 123.078 Area: 1.067538 123.535 Area: 1.067538 123.992 Area: 1.067538 124.449 Area: 1.067538 124.906 Area: 1.067538 125.363 Area: 1.067538 125.820 Area: 1.067538 126.277 Area: 1.067538 126.734 Area: 1.067538 127.191 Area: 1.067538 127.648 Area: 1.067538 128.105 Area: 1.067538 128.562 Area: 1.067538 129.019 Area: 1.067538 129.476 Area: 1.067538 129.933 Area: 1.067538 130.390 Area: 1.067538 130.847 Area: 1.067538 131.304 Area: 1.067538 131.761 Area: 1.067538 132.218 Area: 1.067538 132.675 Area: 1.067538 133.132 Area: 1.067538 133.589 Area: 1.067538 134.046 Area: 1.067538 134.503 Area: 1.067538 134.960 Area: 1.067538 135.417 Area: 1.067538 135.874 Area: 1.067538 136.331 Area: 1.067538 136.788 Area: 1.067538 137.245 Area: 1.067538 137.702 Area: 1.067538 138.159 Area: 1.067538 138.616 Area: 1.067538 139.073 Area: 1.067538 139.530 Area: 1.067538 140.087 Area: 1.067538 140.544 Area: 1.067538 141.001 Area: 1.067538 141.458 Area: 1.067538 141.915 Area: 1.067538 142.372 Area: 1.067538 142.829 Area: 1.067538 143.286 Area: 1.067538 143.743 Area: 1.067538 144.200 Area: 1.067538 144.657 Area: 1.067538 145.114 Area: 1.067538 145.571 Area: 1.067538 146.028 Area: 1.067538 146.485 Area: 1.067538 146.942 Area: 1.067538 147.399 Area: 1.067538 147.856 Area: 1.067538 148.313 Area: 1.067538 148.770 Area: 1.067538 149.227 Area: 1.067538 149.684 Area: 1.067538 150.141 Area: 1.067538 150.598 Area: 1.067538 151.055 Area: 1.067538 151.512 Area: 1.067538 151.969 Area: 1.067538 152.426 Area: 1.067538 152.883 Area: 1.067538 153.340 Area: 1.067538 153.797 Area: 1.067538 154.254 Area: 1.067538 154.711 Area: 1.067538 155.168 Area: 1.067538 155.625 Area: 1.067538 156.082 Area: 1.067538 156.539 Area: 1.067538 156.996 Area: 1.067538 157.453 Area: 1.067538 157.910 Area: 1.067538 158.367 Area: 1.067538 158.824 Area: 1.067538 159.281 Area: 1.067538 159.738 Area: 1.067538 160.195 Area: 1.067538 160.652 Area: 1.067538 161.109 Area: 1.067538 161.566 Area: 1.067538 162.023 Area: 1.067538 162.480 Area: 1.067538 162.937 Area: 1.067538 163.394 Area: 1.067538 163.851 Area: 1.067538 164.308 Area: 1.067538 164.765 Area: 1.067538 165.222 Area: 1.067538 165.679 Area: 1.067538 166.136 Area: 1.067538 166.593 Area: 1.067538 167.050 Area: 1.067538 167.507 Area: 1.067538 167.964 Area: 1.067538 168.421 Area: 1.067538 168.878 Area: 1.067538 169.335 Area: 1.067538 169.792 Area: 1.067538 170.249 Area: 1.067538 170.706 Area: 1.067538 171.163 Area: 1.067538 171.620 Area: 1.067538 172.077 Area: 1.067538 172.534 Area: 1.067538 172.991 Area: 1.067538 173.448 Area: 1.067538 173.905 Area: 1.067538 174.362 Area: 1.067538 174.819 Area: 1.067538 175.276 Area: 1.067538 175.733 Area: 1.067538 176.190 Area: 1.067538 176.647 Area: 1.067538 177.104 Area: 1.067538 177.561 Area: 1.067538 178.018 Area: 1.067538 178.475 Area: 1.067538 178.932 Area: 1.067538 179.389 Area: 1.067538 179.846 Area: 1.067538 180.303 Area: 1.067538 180.760 Area: 1.067538 181.217 Area: 1.067538 181.674 Area: 1.067538 182.131 Area: 1.067538 182.588 Area: 1.067538 183.045 Area: 1.067538 183.502 Area: 1.067538 183.959 Area: 1.067538 184.416 Area: 1.067538 184.873 Area: 1.067538 185.330 Area: 1.067538 185.787 Area: 1.067538 186.244 Area: 1.067538 186.701 Area: 1.067538 187.158 Area: 1.067538 187.615 Area: 1.067538 188.072 Area: 1.067538 188.529 Area: 1.067538 188.986 Area: 1.067538 189.443 Area: 1.067538 189.900 Area: 1.067538 190.357 Area: 1.067538 190.814 Area: 1.067538 191.271 Area: 1.067538 191.728 Area: 1.067538 192.185 Area: 1.067538 192.642 Area: 1.067538 193.099 Area: 1.067538 193.556 Area: 1.067538 194.013 Area: 1.067538 194.470 Area: 1.067538 194.927 Area: 1.067538 195.384 Area: 1.067538 195.841 Area: 1.067538 196.298 Area: 1.067538 196.755 Area: 1.067538 197.212 Area: 1.067538 197.669 Area: 1.067538 198.126 Area: 1.067538 198.583 Area: 1.067538 199.040 Area: 1.067538 199.497 Area: 1.067538 199.954 Area: 1.067538 200.411 Area: 1.067538 200.868 Area: 1.067538 201.325 Area: 1.067538 201.782 Area: 1.067538 202.239 Area: 1.067538 202.696 Area: 1.067538 203.153 Area: 1.067538 203.610 Area: 1.067538 204.067 Area: 1.067538 204.524 Area: 1.067538 204.981 Area: 1.067538 205.438 Area: 1.067538 205.895 Area: 1.067538 206.352 Area: 1.067538 206.809 Area: 1.067538 207.266 Area: 1.067538 207.723 Area: 1.067538 208.180 Area: 1.067538 208.637 Area: 1.067538 209.094 Area: 1.067538 209.551 Area: 1.067538 210.008 Area: 1.067538 210.465 Area: 1.067538 210.922 Area: 1.067538 211.379 Area: 1.067538 211.836 Area: 1.067538 212.293 Area: 1.067538 212.750 Area: 1.067538 213.207 Area: 1.067538 213.664 Area: 1.067538 214.121 Area: 1.067538 214.578 Area: 1.067538 215.035 Area: 1.067538 215.492 Area: 1.067538 215.949 Area: 1.067538 216.406 Area: 1.067538 216.863 Area: 1.067538 217.320 Area: 1.067538 217.777 Area: 1.067538 218.234 Area: 1.067538 218.691 Area: 1.067538 219.148 Area: 1.067538 219.605 Area: 1.067538 220.062 Area: 1.067538 220.519 Area: 1.067538 220.976 Area: 1.067538 221.433 Area: 1.067538 221.890 Area: 1.067538 222.347 Area: 1.067538 222.804 Area: 1.067538 223.261 Area: 1.067538 223.718 Area: 1.067538 224.175 Area: 1.067538 224.632 Area: 1.067538 225.089 Area: 1.067538 225.546 Area: 1.067538 226.003 Area: 1.067538 226.460 Area: 1.067538 226.917 Area: 1.067538 227.374 Area: 1.067538 227.831 Area: 1.067538 228.288 Area: 1.067538 228.745 Area: 1.067538 229.202 Area: 1.067538 229.659 Area: 1.067538 230.116 Area: 1.067538 230.573 Area: 1.067538 231.030 Area: 1.067538 231.487 Area: 1.067538 231.944 Area: 1.067538 232.401 Area: 1.067538 232.858 Area: 1.067538 233.315 Area: 1.067538 233.772 Area: 1.067538 234.229 Area: 1.067538 234.686 Area: 1.067538 235.143 Area: 1.067538 235.600 Area: 1.067538 236.057 Area: 1.067538 236.514 Area: 1.067538 236.971 Area: 1.067538 237.428 Area: 1.067538 237.885 Area: 1.067538 238.342 Area: 1.067538 238.799 Area: 1.067538 239.256 Area: 1.067538 239.713 Area: 1.067538 240.170 Area: 1.067538 240.627 Area: 1.067538 241.084 Area: 1.067538 241.541 Area: 1.067538 241.998 Area: 1.067538 242.455 Area: 1.067538 242.912 Area: 1.067538 243.369 Area: 1.067538 243.826 Area: 1.067538 244.283 Area: 1.067538 244.740 Area: 1.067538 245.197 Area: 1.067538 245.654 Area: 1.067538 246.111 Area: 1.067538 246.568 Area: 1.067538 247.025 Area: 1.067538 247.482 Area: 1.067538 247.939 Area: 1.067538 248.396 Area: 1.067538 248.853 Area: 1.067538 249.310 Area: 1.067538 249.767 Area: 1.067538 250.224 Area: 1.067538 250.681 Area: 1.067538 251.138 Area: 1.067538 251.595 Area: 1.067538 252.052 Area: 1.067538 252.509 Area: 1.067538 252.966 Area: 1.067538 253.423 Area: 1.067538 253.880 Area: 1.067538 254.337 Area: 1.067538 254.794 Area: 1.067538 255.251 Area: 1.067538 255.708 Area: 1.067538 256.165 Area: 1.067538 256.622 Area: 1.067538 257.079 Area: 1.067538 257.536 Area: 1.067538 257.993 Area: 1.067538 258.450 Area: 1.067538 258.907 Area: 1.067538 259.364 Area: 1.067538 259.821 Area: 1.067538 260.278 Area: 1.067538 260.735 Area: 1.067538 261.192 Area: 1.067538 261.649 Area: 1.067538 262.106 Area: 1.067538 262.563 Area: 1.067538 263.020 Area: 1.067538 263.477 Area: 1.067538 263.934 Area: 1.067538 264.391 Area: 1.067538 264.848 Area: 1.067538 265.305 Area: 1.067538 265.762 Area: 1.067538 266.219 Area: 1.067538 266.676 Area: 1.067538 267.133 Area: 1.067538 267.590 Area: 1.067538 268.047 Area: 1.067538 268.504 Area: 1.067538 268.961 Area: 1.067538 269.418 Area: 1.067538 269.875 Area: 1.067538 270.332 Area: 1.067538 270.789 Area: 1.067538 271.246 Area: 1.067538 271.703 Area: 1.067538 272.160 Area: 1.067538 272.617 Area: 1.067538 273.074 Area: 1.067538 273.531 Area: 1.067538 273.988 Area: 1.067538 274.445 Area: 1.067538 274.902 Area: 1.067538 275.359 Area: 1.067538 275.816 Area: 1.067538 276.273 Area: 1.067538 276.730 Area: 1.067538 277.187 Area: 1.067538 277.644 Area: 1.067538 278.101 Area: 1.067538 278.558 Area: 1.067538 279.015 Area: 1.067538 279.472 Area: 1.067538 279.929 Area: 1.067538 280.386 Area: 1.067538 280.843 Area: 1.067538 281.300 Area: 1.067538 281.757 Area: 1.067538 282.214 Area: 1.067538 282.671 Area: 1.067538 283.128 Area: 1.067538 283.585 Area: 1.067538 284.042 Area: 1.067538 284.499 Area: 1.067538 284.956 Area: 1.067538 285.413 Area: 1.067538 285.870 Area: 1.067538 286.327 Area: 1.067538 286.784 Area: 1.067538 287.241 Area: 1.067538 287.698 Area: 1.067538 288.155 Area: 1.067538 288.612 Area: 1.067538 289.069 Area: 1.06753</p>	

флавоноидов в экстракт. Во фракции флавоноидов м. лесного наблюдается максимальное количество компонентов флавоноидной природы – 28. Максимальное количество флавоноидных веществ в м. луговом наблюдается в водном экстракте.

Флавоноиды марьянников – гиперозид и цинарозид – идентифицировали по спектрам поглощения и временам удерживания в сравнении со стандартными образцами (рис. 28).

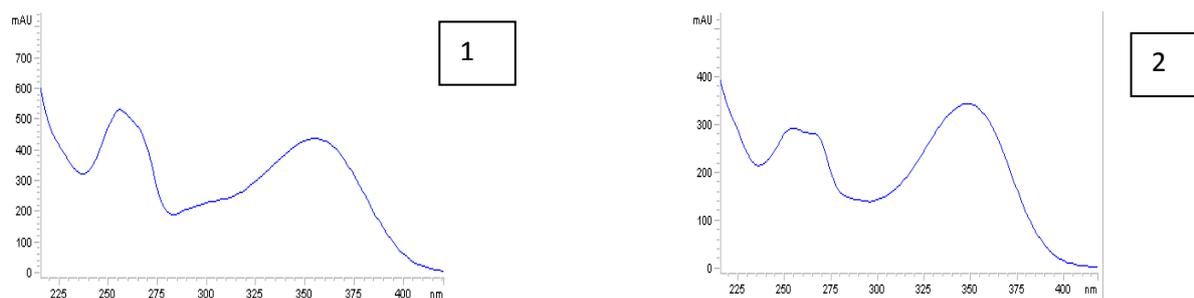


Рис. 28. УФ-спектры поглощения стандартных образцов:

1. Гиперозид, время удерживания – 35.156 мин
2. Цинарозид, время удерживания – 35.845 мин

Во всех исследуемых образцах было доказано наличие цинарозида и гиперозида. Результаты ВЭЖХ-анализа подтверждают результаты исследований БХ и ТСХ и доказывают большое разнообразие веществ фенольной природы в исследуемых видах. Значительный видовой состав фенольных соединений оказывает определенное влияние на разделение и выделение индивидуальных компонентов.

Определение количественного содержания флавоноидов в пересчете на цинарозид проводили методами спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Для спектрального анализа использовали метод дифференциальной спектрофотометрии. Дифференциальная спектрофотометрия, где в качестве раствора сравнения используется испытуемый раствор без добавления реактивов, позволяет исключить влияние окрашенных и побочных соединений, а также веществ, не вступающих в реакцию комплексообразования с реактивами [23, 25].

В связи с тем, что исследуемые виды являются близкими экологически и

морфологически, а также по компонентному составу флавоноидов, для м. лесного была использована методика, разработанная ранее для м. лугового [13]. Так как комплекс флавоноидов марьянников включает в себя достаточно большое количество веществ, для корректировки рабочей длины волны и расчета удельного показателя была изучена спектральная характеристика м. лесного и ГСО цинарозида.

При изучении УФ – спектра водно-спиртового извлечения (1:10) из травы м. лесного установлено наличие одного максимума поглощения при 335 нм [94]. При добавлении к извлечению раствора алюминия хлорида было обнаружено плечо при 275 нм и два максимума поглощения при 335 и 396 нм, причем интенсивность поглощения в максимуме при 335 нм незначительно снижается при добавлении алюминия хлорида (рис. 29).

Появление длинноволнового максимума при добавлении алюминия хлорида свидетельствует о том, что характер кривой поглощения определяется суммой веществ, преимущественно флавоноидами и фенолкарбоновыми кислотами, в связи с этим использование прямой спектрофотометрии для анализа травы м. лесного нерационально.

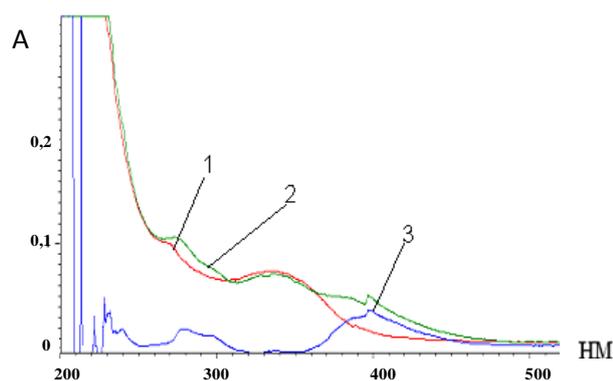


Рис. 29. УФ – спектры из травы м. лесного: 1 – извлечение из травы м. лесного, 2 – извлечение из травы м. лесного с добавлением 2% раствора алюминия хлорида, 3 – дифференциальный спектр.

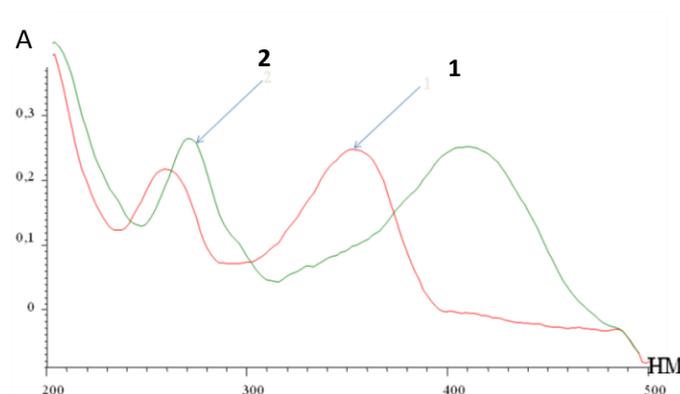


Рис. 30. Спектр раствора ГСО цинарозида: 1 – спиртовой раствор цинарозида, 2 – раствор цинарозида с добавлением 2% раствора алюминия хлорида.

Для исключения действия окрашенных и балластных соединений нефлавоноидного состава был изучен дифференциальный спектр водно-спиртового извлечения травы м. лесного и УФ-спектры ГСО цинарозида при добавлении алюминия хлорида (рис. 29, 30).

Установлено, что дифференциальная кривая перекрывается с одним из максимумов поглощения раствора ГСО цинарозида в присутствии алюминия хлорида. В качестве аналитической длины волны выбрана область УФ-спектра при 396 нм.

Для пересчета на цинарозид количественного содержания суммы флавоноидов в траве м. лесного получены комплексы раствора ГСО цинарозида с 2% раствором алюминия хлорида. В среднем удельный показатель поглощения полученных растворов составляет 387 при аналитической длине волны (396 нм) (табл. 19).

Таблица 19

Величина удельного показателя поглощения цинарозида  
при длине волны 396 нм

Концентрация раствора, %	Оптическая плотность, А	Удельный показатель поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$	Среднее значение удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$
0.00066	0.257	389.10	387.0
0.00099	0.382	385.42	
0.00132	0.511	386.96	
0.00165	0,638	386.87	
0.00196	0.772	390.02	
0.00231	0.877	379.65	
0.00264	1.020	386.40	
0.00297	1.140	383.82	

Растворы цинарозида готовили по следующей методике: точную навеску цинарозида помещали в мерную колбу на 100 мл, добавляли 3 мл 2% раствора алюминия хлорида, доводили объем спиртом этиловым 50% до метки.

На основании проведенных исследований в формуле расчета было использовано теоретическая величина удельного показателя  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 387 \pm 2.2$ , позволяющая не использовать в методике анализа ГСО цинарозида.

Количественный анализ показал, что содержание флавоноидов в траве м. лесного составляет в среднем 0.27%. Распределение флавоноидов по органам растения неравномерное: максимальное содержание – в листьях (0.4%), высокое – в цветках (0.18%), минимальное – в стеблях (0.06%) и корнях (0.01%) (рис. 31). Количественное содержание флавоноидов в органах м. лесного коррелирует с количеством флавоноидных веществ, отмеченных на двумерной хроматограмме: в листьях обнаружено 10 веществ флавоноидной природы, в корнях – 4 вещества.

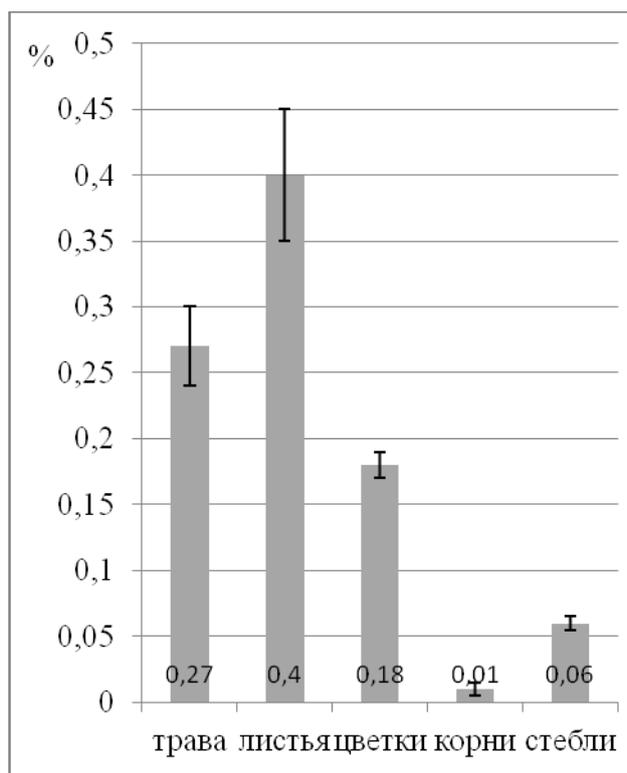


Рис. 31. Количественное содержание флавоноидов (%) в траве и органах м. лесного.

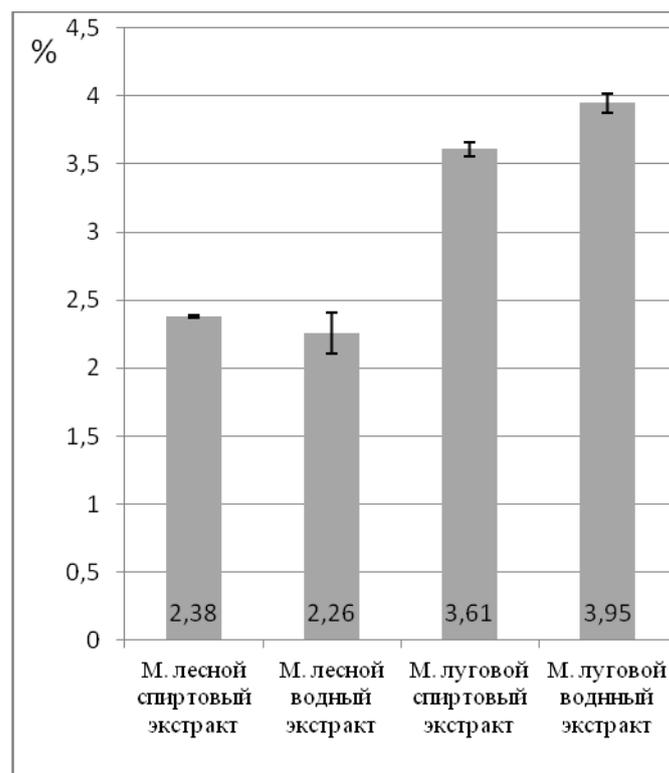


Рис. 32. Количественное содержание флавоноидов (%) в экстрактах.

В экстрактах м. лесного содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид составляет около 2% (рис. 32). В экстрактах м. лугового количественное содержание флавоноидов, определенное методом спектрофотометрии, составляет от 3.5% (в спиртовом экстракте) до 4% (в водном). Содержание флавоноидов примерно одинаково в спиртовых и водных экстрактах, что свидетельствует об их присутствии как в форме агликонов, так и в форме гликозидов.

Была проведена оценка количественного содержания флавоноидов методом ВЭЖХ. Результаты исследования представлены в таблице 20.

Таблица 20

Количественное содержание флавоноидов в траве, экстрактах и фракции флавоноидов в марьянниках, определенное методом ВЭЖХ

Объект	Содержание цинарозида, %	Сумма флавоноидов в пересчете на цинарозид, %
Спиртовый экстракт м. лугового	0.0369	5.2237
Спиртовый экстракт м. лесного	0.0201	1.9621
Флавоноиды м. лугового	0.0496	3.1455
Флавоноиды м. лесного	0.0118	5.6819
Водный экстракт м. лугового	0.0856	6.8875
Водный экстракт м. лесного	0.3420	1.1561
Трава м. лугового	0.0141	0.3493
Трава м. лесного	0.0622	0.3294

По результатам хроматографии установлено, что в траве исследуемых видов содержится около 0.3% флавоноидов в пересчете на цинарозид, полученные данные сопоставимы с результатами спектрофотометрического анализа. Количество флавоноидов в экстрактах значительно выше. В водном и спиртовом экстрактах м. лесного содержится от 1 до 2% соответственно, в м. луговом – от 5 до 7%. Содержание флавоноидов в высокоочищенных фракциях также велико и составляет около 3% в м. луговом и 5% в м. лесном.

### 5.3. Анализ иридоидов

В траве м. лесного методом нисходящей бумажной хроматографии было обнаружено не менее пяти соединений, относящихся к иридоидам (рис. 33, табл. 21), которые по качественным реакциям на хроматограммах можно объединить в две группы. Вещества под номерами 1, 2, 3, проявляемые только реактивом Бэкона-Эдельмана в виде хроматографических пятен желто-коричневого цвета с лимонно-желтой флюоресценцией в УФ-свете, при этом не обнаруживаются

реактивами Тримм-Хилла и Шталя. Полученные результаты указывают, что вещества принадлежат к иридоидам подгруппы каталпола и изокаталпола [8].

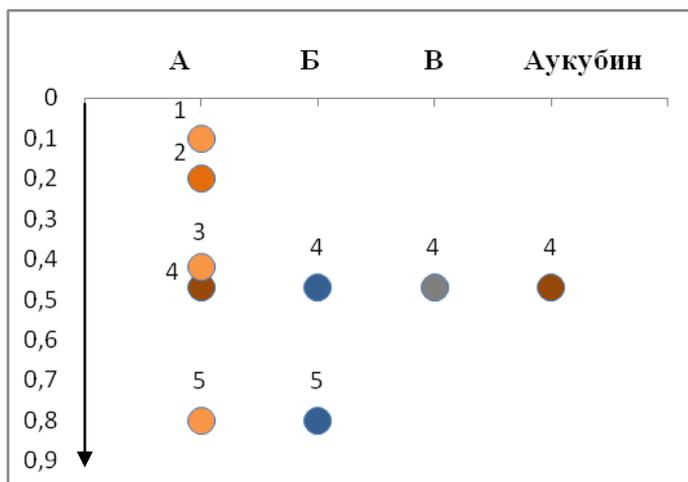


Рис. 33. Схема нисходящей хроматографии иридоидов травы м. лесного в системе: н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2): А: реактив Бэкона-Эдельмана; Б: реактив Шталя; В: реактив Тримм-Хилла

Таблица 21

Люминисцентно-хроматографическая характеристика иридоидных соединений травы м. лесного в системе н-бутанол - уксусная кислота - вода 4:1:2

№	R <sub>f</sub>	Окраска пятен						Цветки	Стебли	Листья	Корни
		Реактив Бэкона - Эдельмана		Реактив Шталя		Реактив Трим - Хилла					
		Видимый свет	УФ-область	Видимый свет	УФ-область	Видимый свет	УФ-область				
1	0.10	Ж-ор	Ор	–	–	–	–			+	
2	0.20	Ж-к	К	–	–	–	–	+	+	+	+
3	0.42	Св-к	К	–	–	–	–	+			
4	0.47	К	Т-к	С-г	Т-с	Сер	Ф	+	+	+	+
5	0.80	Св-к	Т-к	С-г	Т-с	–	–	+	+	+	+
1	0.47	К	Т-к	С-г	Т-с	Сер	Ф	Аукубин			

Примечание: Ж – желтый, Ор – оранжевый, К – коричневый, С – синий, Г – голубой, Сер – серый, Ф – фиолетовый, Св – светлый, Т – темный

Вещества под номерами 4 и 5, проявляемые реактивом Шталя в виде синезеленых хроматографических зон и реактивом Бэкона-Эдельмана – коричневыми зонами. Вещество с величиной R<sub>f</sub> 0.47 (№4) в сравнении со стандартным образцом предварительно идентифицировано как аукубин, вещество номер 5, возможно, также относится к производным аукубина [8].

В траве м. лесного вещества иридоидной природы распределяются по органам достаточно равномерно – в цветках и листьях содержится по 4 вещества, в стеблях и корнях – по 3 (табл. 21).

В спиртовом экстракте м. лесного было обнаружено четыре вещества, относящихся к иридоидам (рис. 34).

Вещества с величиной  $R_f$  0.1; 0.5 и 0.6 проявляются только реактивом Бэкона-Эдельмана в виде коричневых и темно-коричневых пятен, другими реактивами не обнаруживаются, что свидетельствует об их принадлежности к иридоидам подгруппы каталпола и изокаталпола [12]. Вещество с величиной  $R_f$  0.3 проявляется всеми реактивами и идентифицировано в сравнении с аутентичным образцом как аукубин.

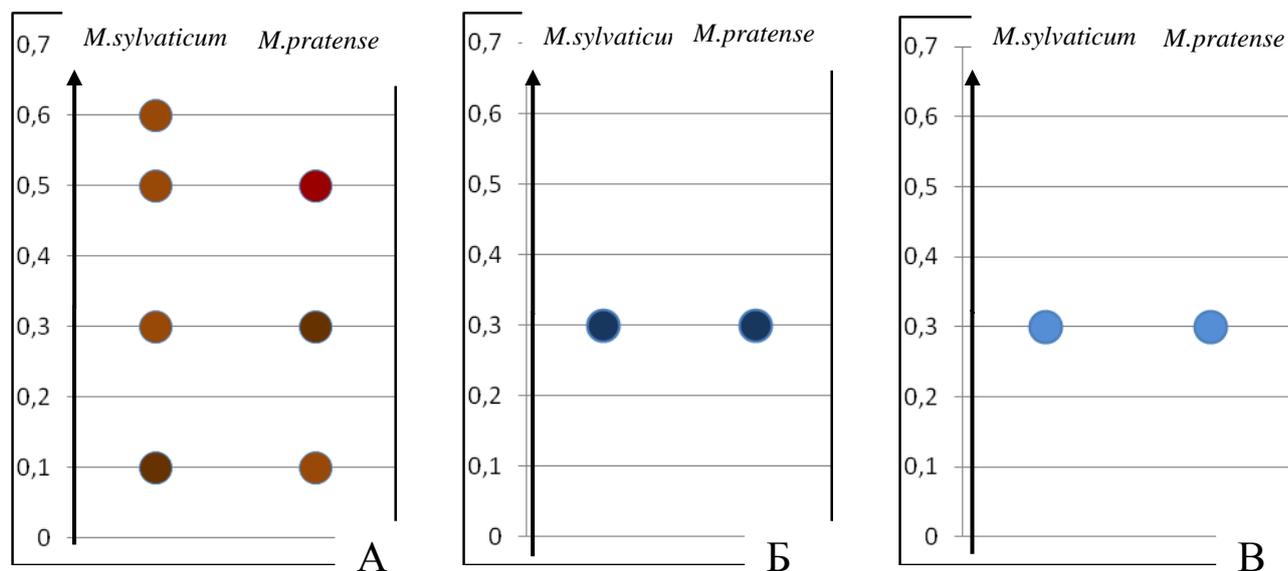


Рис. 34. Схема нисходящей хроматографии иридоидов в спиртовых экстрактах м. лесного и м. лугового в системе н-бутанол - уксусная кислота - вода (4:1:2). А: реактив Бэкона-Эдельмана, Б: реактив Шталя; В: реактив Тримм-Хилла.

В спиртовом экстракте м. лугового было обнаружено три вещества. Вещества с величиной  $R_f$  0.1 и 0.5 аналогичны веществам, обнаруженным в экстракте м. лесного. Вещество с  $R_f$  0.3 идентифицировано как аукубин. В целях анализа допустимо использование значения величины  $R_f$  аукубина как постоянного и преобладающего компонента иридоидов марьянника.

При проведении хроматографии в тонком слое сорбента наилучшее разделение наблюдалось в системе изопропанол - вода (4:1). Результаты ТСХ - анализа сопоставимы с результатами нисходящей хроматографии: в спиртовых экстрактах обнаружено 4 вещества иридоидной природы, в водных – от 2 до 3 (табл. 22). Три вещества не окрашиваются реактивом Шталя, поэтому их можно отнести к подгруппе каталпола. Вещество № 3 по хроматографическому поведению идентифицировано как аукубин.

Таблица 22

Люминисцентно-хроматографическая характеристика иридоидных соединений экстрактов марьянников в системе изопропанол-вода (4:1)

№	R <sub>f</sub>	Окраска пятен		М. Лесной		М. Луговой	
		Реактив Бекон - Эдельмана	Реактив Шталя	Спиртовый экстракт	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водный экстракт
1	0.51	Коричневый		+	+	+	+
2	0.82	Темно-коричневый	Голубой	+	+	+	+
3	0.87	Коричневый		+		+	+
4	0.90	Светло-коричневый		+		+	
Аукубин							
1	0.87	Темно-коричневый	Голубой				

По результатам хроматографического анализа установлено, что аукубин присутствует во всех образцах исследуемых видов. В связи с этим определение количественного содержания суммы иридоидов выполняли в пересчете на аукубин.

Определение количественного содержания иридоидов в траве и органах м. лесного, а также в экстрактах м. лесного и м. лугового проводили методом фотоэлектроколориметрии в пересчете на аукубин. Содержание иридоидов в траве м. лесного составляет в среднем 0.57%, наибольшее содержание наблюдается в цветках (1.04%), наименьшее – в корнях (0.18%), в листьях и стеблях – 0.52% и 0.42% соответственно (рис. 35).

Разница в количественном содержании иридоидов не связана с количеством индивидуальных иридоидов: в цветках и листьях – по 4 вещества, в стеблях и корнях – по 3.

Содержание иридоидов значительно превосходит в экстрактах *M. pratense* по сравнению с экстрактами *M. Sylvaticum* (рис. 36). В экстрактах м. лесного содержится около 4% иридоидов, м. лугового – от 6 до 11%.

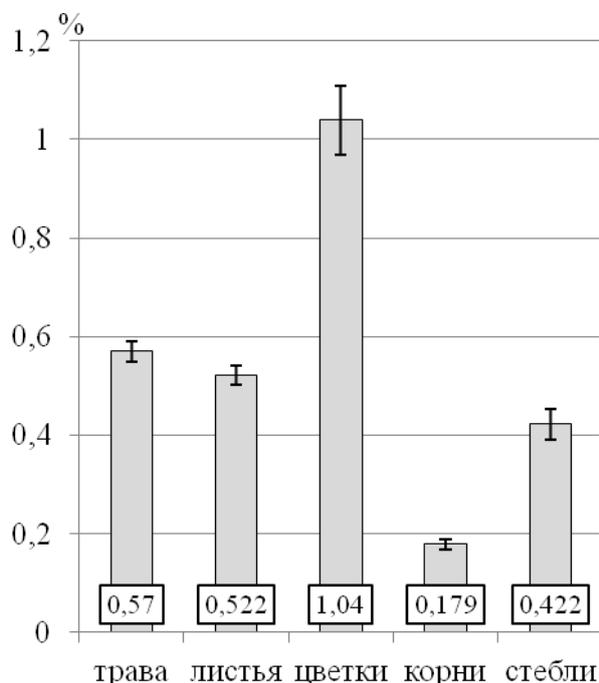


Рис. 35. Содержание иридоидов (%) в траве и органах м. лесного.

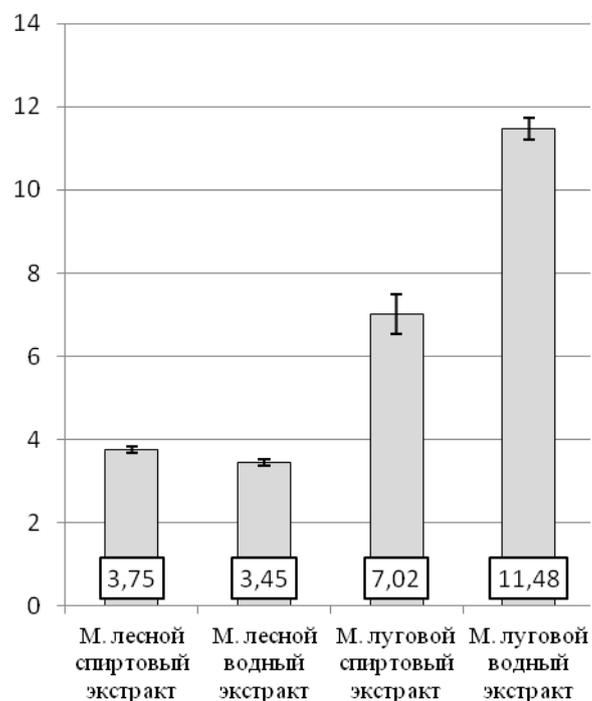


Рис. 36. Содержание иридоидов (%) в экстрактах марьянников.

#### 5.4. Аминокислотный состав

Методы современной фармакологии позволяют определить конкретное действие (зачастую достаточно сильное), которое свойственно многим вторичным метаболитам (алкалоидам, сердечным гликозидам, сапонинам, антраценпроизводным, дубильным веществам, флавоноидам и другим биологически активным веществам), тогда как вещества мягкого действия, к которым относятся и нутриенты растительной пищи, как правило, не привлекают внимания фармакологов. Тем не менее, растительные белки, цепочки аминокислот, а также небелковые аминокислоты всегда присутствуют в растительных продуктах и полученных из них галеновых препаратах – соках, сиропах, экстрактах, настоях, отварах. Несомненно, они участвуют в комплексном терапевтическом эффекте этих фитопрепаратов [45].

Аминокислоты как основные составные части белков участвуют во всех жизненных процессах наряду с нуклеиновыми кислотами, углеводами и липидами. Кроме аминокислот, входящих в состав белков, живые организмы обладают постоянным резервом «свободных» аминокислот, содержащихся в тканях и в клеточном соке. Они находятся в динамическом равновесии при многочисленных обменных реакциях. Аминокислоты используются в биосинтезе полипептидов и белков, а также в синтезе фосфатидов, порфиринов и нуклеотидов [113].

Глутаминовая кислота является основным возбуждающим нейромедиатором центральной нервной системы. Она участвует в регуляции высших интегративных функций мозга, эмоций, условно-рефлекторной деятельности, болевой чувствительности и пр. [95]. На сегодняшний день значительную роль в развитии ряда психических и неврологических заболеваний отводят деятельности глутаматергической системы. Повышенное и продолжительное высвобождение возбуждающих аминокислот является важным патогенетическим фактором в развитии ишемических поражений мозга, судорожных состояний, нейродегенеративных заболеваний. При этом гиподисфункция глутаматергической системы может привести к развитию шизофрении и когнитивных расстройств [76].

Качественное обнаружение аминокислот в экстрактах проводили с помощью нингидриновой реакции [90]. Аминокислоты идентифицировали по значению  $R_f$  и окраске пятен на хроматограмме после обработки спиртовым раствором нингидрина. Схема нисходящей хроматографии представлена на рисунке 37. В сравнении с достоверными образцами (по значениям  $R_f$  и методом добавки в извлечение) вещество № 3 определено как D-L- орнитин гидрохлорид, № 6 – L-глутаминовая кислота, № 7 - L- пролин, № 8 – тирозин, № 10 - D-L- валин (табл. 23).

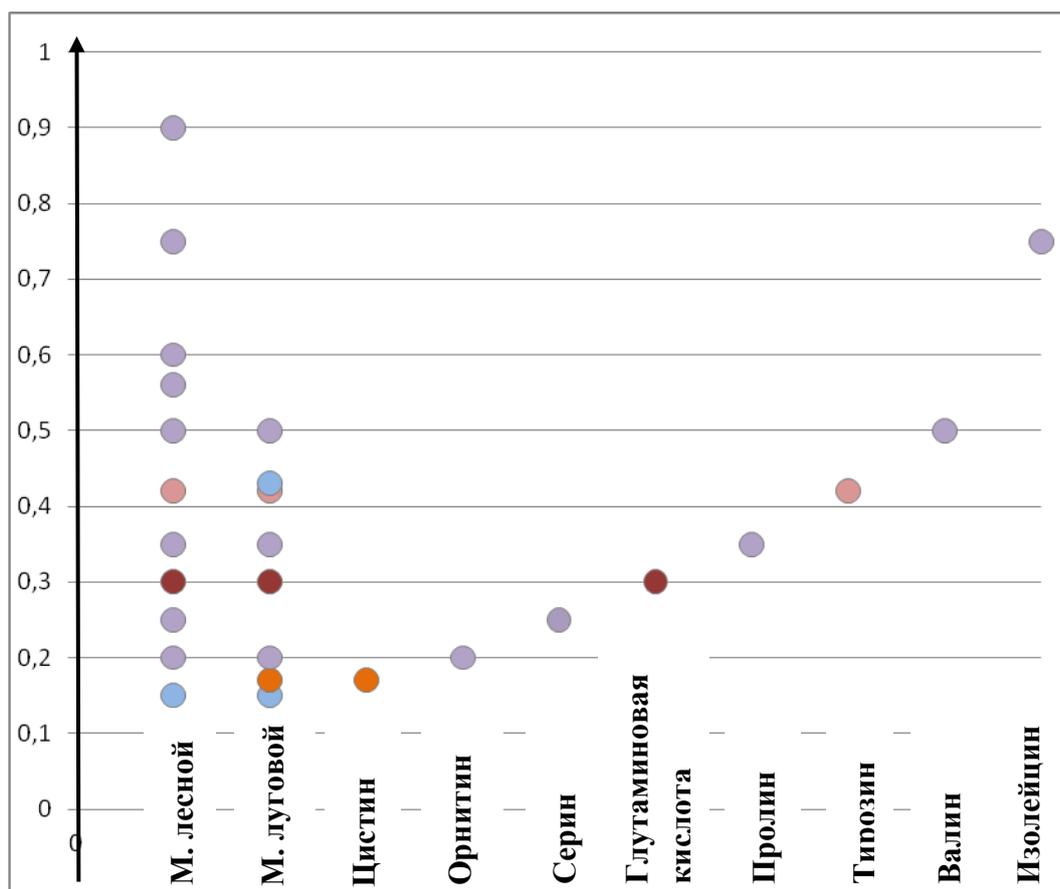


Рис. 37. Схема нисходящей хроматографии аминокислот в экстрактах *M. pratense*, *M. sylvaticum*, в системе н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2).

Таблица 23

Сравнительная хроматографическая характеристика аминокислот  
м. лесного и м. лугового и стандартных образцов аминокислот

№ п/п	R <sub>f</sub>	Окраска	М. лесной	М. луговой	Свидетель
1	0.15	Голубой	+	+	
2	0.17	Оранжевый		+	Цистин
3	0.20	Сиреневый	+	+	Орнитин
4	0.25	Сиреневый	+		Серин
5	0.30	Бордовый	+	+	Глутаминовая кислота
6	0.35	Сиреневый	+	+	Пролин
7	0.42	Розовый	+	+	Тирозин
8	0.43	Голубой		+	
9	0.50	Сиреневый	+	+	Валин
10	0.56	Сиреневый	+		
11	0.68	Сиреневый	+		
12	0.75	Сиреневый	+		Изолейцин
13	0.90	Сиреневый	+		

Перечисленные аминокислоты содержатся в экстрактах обоих исследуемых

видов и могут быть использованы в качестве хроматографических маркеров. Цистин (вещество № 2) обнаружено только в экстракте м. лугового; серин и изолейцин (вещества № 5 и 13 соответственно) – только в м. лесном. Полученные данные говорят о том, что в экстрактах из травы м. лесного содержится большее количество аминокислот (не менее 11), чем в экстрактах м. лугового (не менее 8). Обнаруженные аминокислоты, и особенно L- глутаминовая кислота, вероятно, вносят значительный вклад в нейрореплетическую активность растений рода *Melampyrum*.

Для тонкослойной хроматографии использовали системы подвижной фазы:

1. Бутанол – уксусная кислота ледяная – вода (4:1:1)
2. Пропанол – вода (1:1)
3. Изопропанол – вода (7:3)
4. Ацетон – вода – уксусная кислота ледяная – муравьиная кислота (50:15:12:3)

Оптимальными для хроматографического разделения аминокислот оказались системы № 2 и 4.

В системе пропанол-вода (1:1) было обнаружено от двух до трех аминокислот (табл. 24).

Таблица 24

Хроматографическая характеристика аминокислот методом ТСХ в системе пропанол – вода (1:1)

№	R <sub>f</sub>	М. лесной		М. луговой	
		Спиртовый экстракт	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водный экстракт
1	0.63	+			
2	0.67			+	
3	0.73	+			
4	0.75			+	
5	0.78		+		+
6	0.84	+			
7	0.87		+	+	+
<hr/>					
1	2	3			
1	0.68	Пролин			
2	0.69	Глицин			
3	0.73	Гамма-аминомасляная кислота			
4	0.75	Аспарагина моногидрат			

Продолжение таблицы		
1	2	3
5	0.80	Аланин
6	0.84	L – глутаминовая кислота
7	0.87	Изолейцин
8	0.89	Валин
9	0.90	Тирозин
10	0.90	Лейцин
11	0.94	Фенилаланин

В системе ацетон – вода – ледяная уксусная кислота – муравьиная кислота (50:15:12:3) обнаружено от двух до четырех аминокислот (табл. 25).

Таблица 25

Хроматографическая характеристика аминокислот методом ТСХ в системе «Ацетон – вода – ледяная уксусная кислота – муравьиная кислота 50:15:12:3»

№	R <sub>f</sub>	М. лесной		М. луговой	
		Спиртовый экстракт	Водный экстракт	Спиртовый экстракт	Водный экстракт
1	0.62	+		+	
2	0.69	+	+	+	+
3	0.77	+		+	
4	0.82	+			
5	0.85		+	+	+
<hr/>					
1	0.63	Пролин			
2	0.67	Глицин			
3	0.71	Аспарагина моногидрат			
4	0.74	Аланин			
5	0.77	Гамма-аминомасляная кислота			
6	0.80	L – глутаминовая кислота			
7	0.82	Валин			
8	0.86	Изолейцин			
9	0.89	Лейцин			
10	0.88	Тирозин			
11	0.88	Фенилаланин			

Поскольку в исследуемых экстрактах содержится большое количество компонентов аминокислотной природы, и аминокислоты имеют близкую величину R<sub>f</sub>, методы БХ и ТСХ могут быть использованы для предварительной оценки качественного состава аминокислот в экспресс-анализе.

Хроматографический анализ м. лесного и м. лугового на бумаге и в тонком слое позволили обозначить группу аминокислотных соединений для более

подробного изучения методом ВЭЖХ. В результате проведенных хроматографических исследований в траве м. лесного было обнаружено 8 аминокислот, среди которых больший удельный вес имеют фенилаланин, глицин, глутаминовая кислота (рис. 38, табл. 26). В наименьших количествах содержатся аланин, изолейцин, пролин. Среди содержащихся в м. лесном аминокислот три являются незаменимыми (фенилаланин, лизин, изолейцин).

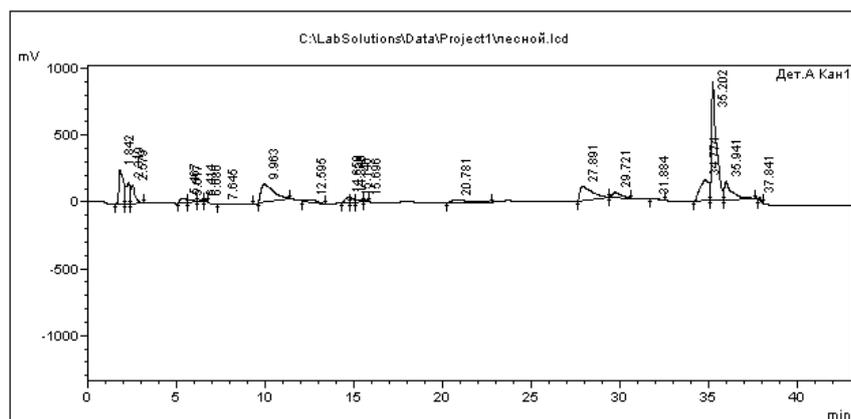


Рис. 38. Хроматограмма аминокислот м. лесного

Таблица 26

Хроматографическая характеристика аминокислот м. лесного

№ п/п	Время удерживания	Концентрация, мг%	Название аминокислоты
1	5.467	0.202	Аспарагиновая кислота
2	5.617	0.248	Глутаминовая кислота
3	9.963	0.963	Глицин
4	14.659	0.024	Аланин
5	15.696	0.016	Пролин
6	20.781	0.018	Изолейцин
7	27.891	0.309	Фенилаланин
8	29.721	0.120	Лизин
	<b>Сумма</b>	<b>1.9</b>	

В м. луговом обнаружено 5 аминокислот, преобладают среди них фенилаланин, лизин, валин, являющиеся незаменимыми аминокислотами (рис. 39, табл. 27).

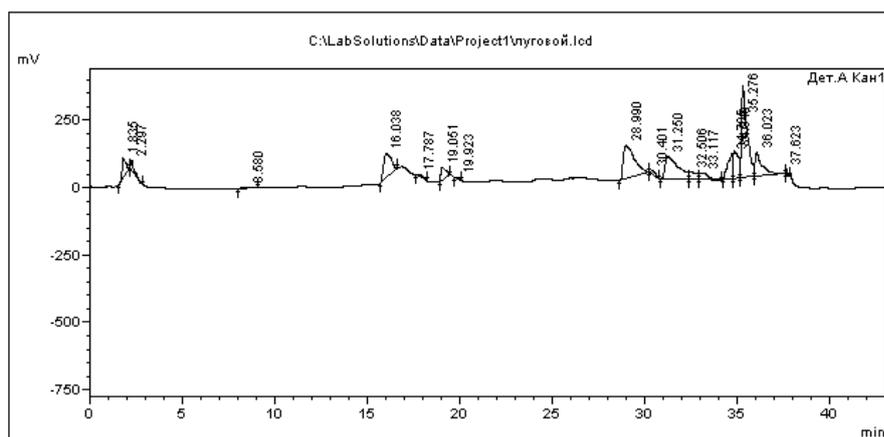


Рис. 39. Хроматограмма аминокислот м. лугового

Таблица 27

Хроматографическая характеристика аминокислот м. лугового

№ п/п	Время удерживания	Концентрация, мг%	Название аминокислоты
1	16.038	0.430	Пролин
2	17.787	0.002	Тирозин
3	19.051	0.566	Валин
4	28.990	1.412	Фенилаланин
5	31.250	1.268	Лизин
	<b>Сумма</b>	<b>3.678</b>	

ВЭЖХ-анализ показал существенные различия как в качественном, так и в количественном содержании аминокислот в марьянниках. Общими аминокислотами для двух марьянников являются фенилаланин, лизин, пролин. Фенилаланин и лизин содержатся в исследуемых видах в значительных количествах в сравнении с остальными аминокислотами. Сумма аминокислот в водном извлечении из травы м. лесного составила 1.9 мг%, при этом обнаружено достаточно большое разнообразие содержащихся аминокислот. В водном извлечении из травы м. лугового количественное содержание аминокислот превосходит м. лесной и составляет 3.8 мг%. Содержание таких аминокислот как глицин, глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, фенилаланин, вероятно, оказывают влияние на биологическую активность марьянников.

Определение количественного содержания суммы свободных аминокислот в экстрактах м. лесного проводили методом прямой спектрофотометрии в

пересчете на глутаминовую кислоту на основе реакции с нингидрином при длине волны 568 нм.

Сумма свободных аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в спиртовом экстракте м. лесного составила  $5.27 \pm 0.05\%$ , в водном экстракте –  $4.32 \pm 0.12\%$ . Значительное повышение процентного содержания аминокислот в экстрактах свидетельствует, что технология экстрактов способствует увеличению выхода аминокислот.

### 5.5. Изучение жирных кислот в семенах м. лесного и м. лугового

Запасные питательные вещества, которые локализуются в генеративных органах растения, также вносят свой вклад в биологическую активность марьянников. Жирные кислоты участвуют в биосинтезе свободных аминокислот и, кроме того, определяют особенности биологии, типы покоя, влияют на энергию прорастания семян [46, 75].

Название *Melampyrum* образовано от двух греческих слов: «*melas*» – черный и «*pyros*» – пшеница, так как семена марьянников схожи с зернами пшеницы, за исключением того, что они чаще всего черного цвета [127]. Семена марьянников гладкие, овальной формы с поедаемым муравьями крупным присемянником (ариллусом), состоящим из паренхимных клеток богатых маслами. Семена по внешнему виду похожи на куколок муравьев, что также привлекает этот вид насекомых и обеспечивает мирмекохорный способ распространения [28].

Масло исследуемых марьянников жидкой консистенции желтого цвета. Количественное содержание жирного масла в пересчете на абсолютно сухое сырье в семенах м. лесного составило 13.3%, м. лугового – 26.6% [92].

Не смотря на более мелкие размеры семян и присемянника, содержание жирного масла в семенах м. лугового значительно выше, чем в семенах м. лесного.

В результате проведенных исследований в масле изученных видов *Melampyrum* идентифицировано 9 жирных кислот (табл. 28).

Суммарное содержание предельных жирных кислот для м. лугового составляет 15.10%, для м. лесного – 30.96%. Среди них преобладающей является пальмитиновая кислота, содержание которой в *M. sylvaticum* в два раза превышает ее содержание в масле *M. pratense*. Миристиновая и эйкозановая кислоты обнаружены в следовых количествах.

Значительную часть жирного масла составляют непредельные кислоты. Суммарное содержание их для *M. sylvaticum* составляет 69.04% и для *M. pratense* – 84.9%. Среди непредельных кислот преобладают кислоты с 18 углеродными атомами (C<sub>18</sub>) – олеиновая, линолевая и линоленовая.

Таблица 28

Жирнокислотный состав семян растений рода *Melampyrum* L.

Кислота	Индекс	Содержание, %	
		<i>M. pratense</i>	<i>M. sylvaticum</i>
Миристиновая	14:0	0.70	–
Пальмитиновая	16:0	13.00	26.93
Пальмитолеиновая	16:1	2.80	7.84
9,12-октадекадиеновая	16:2	–	0.20
Стеариновая	18:0	0.83	4.03
Олеиновая	18:1	23.40	43.47
Линолевая	18:2	28.20	5.45
Линоленовая	18:3	30.50	11.67
Эйкозановая	20:0	0.57	–
<b>Сумма предельных кислот</b>		<b>15.10</b>	<b>30.96</b>
<b>Сумма непредельных кислот</b>		<b>84.90</b>	<b>69.04</b>

С помощью достоверных образцов установлено, что времена удерживания олеиновой и линолевой кислот совпадают, на хроматограммах они проявляются общим пиком. Для идентификации и количественного определения этих кислот использовали селективное детектирование [36] по молекулярным ионам  $m/z$  292 (метилвый эфир линоленовой кислоты) и 296 (метилвый эфир олеиновой кислоты). По площадям пиков и молекулярных ионов находили массовое соотношение указанных кислот, которое использовали для расчета их содержания по суммарной концентрации.

Содержание олеиновой кислоты в семенах м. лесного приблизительно в два раза превышает ее содержание в семенах м. лугового, при этом содержание линолевой и линоленовой кислот значительно больше в масле семян м. лугового. В жирном масле семян *M. pratense* наблюдается более равномерное соотношение непредельных жирных кислот в отличие от *M. sylvaticum*.

Таким образом, определено, что доминирующими кислотами жирного масла семян исследуемых видов являются непредельные. Согласно литературным данным, в семенах, где преобладают запасные питательные вещества углеводного типа и жирные масла непредельного характера, нет периода покоя или он не глубокий [73]. Это характерно для растений рода *Melampyrum* и подтверждается нашими, а также ранее проведенными исследованиями [62].

Непредельные жирные кислоты, содержащие две и более двойных связей, получили специальное наименование – полиненасыщенные жирные кислоты (ПНЖК). К незаменимым ПНЖК, необходимым человеку, но не синтезируемых в его организме, относятся 18-атомные кислоты омега-6 (линолевая кислота) и омега-3 ( $\alpha$ -линоленовая кислота).

Основная роль этих кислот в организме человека состоит в том, что они могут являться биохимическими предшественниками значимых ПНЖК с 20 – 22 атомами углерода, таких как арахидоновая, эйкозапентаеновая, докозагексаеновая кислоты, которые в свою очередь участвуют в важных физиолого-биохимических процессах нашего организма [19]. Доказано, что повышенное потребление омега-3 ПНЖК достоверно снижает риск сердечно-сосудистых заболеваний, способствует выздоровлению и снижает смертность среди людей, перенесших эти заболевания [133].

## 5.6. Изучение элементного состава

Свойства лекарственных растений оказывать терапевтический эффект обусловлены их способностью синтезировать и накапливать многочисленные природные соединения, обладающие физиологической активностью, а также их

способностью концентрировать отдельные элементы или группы элементов, накапливая их в количестве, значительно превышающем (по содержанию) средние величины [64]. Поэтому, чтобы гарантировать отсутствие токсического эффекта растительных препаратов, важно знать уровни концентрации элементов в сравнении с допустимыми нормами [110].

В настоящее время в растительных организмах обнаружено более 80 химических элементов. Установлена взаимосвязь между накоплением в растениях биологически активных веществ определенного типа и концентрированием микроэлементов [64].

Информация о содержании как эссенциальных, так и условно токсичных элементов в растениях является необходимой для обоснованного использования в медицинской практике. В связи с этим большое значение имеет изучение элементного состава м. лесного.

Для анализа использовали образцы *M. sylvaticum*, собранные в окрестностях п. Маяк Костромской области.

Результаты количественного анализа исследуемых образцов приведены в таблице 29. В траве м. лесного обнаружено 19 химических элементов. Элементный состав подземных и надземных органов м. лесного имеет близкое значение, при этом их количественное распределение между органами существенно отличается.

Таблица 29

Содержание химических элементов в *Melampyrum sylvaticum*,  
(мг/кг сухого сырья)

№	Элемент	Корни	Стебли	Листья	Цветки
1	2	3	4	5	6
1	Ca	13 944.8	21 357.0	1 617.5	91 533.7
2	Si	241.2	303.5	31.2	706.2
3	Ti	23.8	307.0	49.5	173.1
4	Cu	12.8	184.7	19.8	18.6
5	Ni	27.8	364.3	59.7	388.8
6	Ag	6.6	8.6	14.2	9.1
7	Co	18.0	24.2	54.3	25.1
8	Sn	26.8	38.4	62.6	40.5
9	P	295.0	701.2	435.2	1 305.1

Продолжение таблицы					
1	2	3	4	5	6
10	Ba	44.1	58.7	75.6	61.6
11	Cd	35.8	49.8	75.8	47.8
12	Be	67.8	87.9	140.1	92.7
13	V	25.8	33.4	53.9	37.0
14	Sr	18.9	25.2	48.2	27.5
15	Fe	24.9	32.4	47.6	33.4
16	Mn	99.2	288.8	24.8	199.2
17	Mg	171.4	265.4	81.3	90.5
18	Cr	27.3	35.6	58.4	37.8
19	Zn	59.3	81.1	106.1	206.1

В корнях установлена следующая закономерность увеличения содержания химических элементов: Ca (13 944.8) > P (295.0) > Si (241.2) > Mg (171.4) > Mn (99.2) > Be (67.8) > Zn (59.3) > Ba (44.1) > Cd (35.8) > Ni (27.8) > Cr (27.3) > Sn (26.8) > V (25.8) > Fe (24.9) > Ti (23.8) > Sr (18.9) > Co (18.0) > Cu (12.8) > Ag (6.6). В подземной части в больших количествах содержатся кальций, фосфор и кремний, в надземной – кальций, кремний, никель, фосфор, марганец и магний. В минимальных количествах были обнаружены такие элементы, как серебро, кобальт, олово, барий, кадмий, ванадий, стронций, железо и хром, их содержание как в подземных, так и надземных частях не превышает 100 мг/кг.

Функции макро и микроэлементов в организме растений, животных и человека разнообразны. Роль многих из них доказана. В организме человека соли кальция – основной материал для построения скелета и зубов. Кальций оказывает влияние на проницаемость биологических мембран, регулирует активность внутриклеточных ферментов различных классов, является одним из ключевых факторов в реакции тромбообразования, а также необходим для сокращения мышечных волокон, влияет на возбудимость периферической нервной системы [60, 61]. Суточная потребность в солях кальция для взрослого человека – 0.8 г. [61].

Никель оказывает неспецифическое действие на целый ряд металлоферментов, участвуя тем самым во многих биохимических реакциях. Никель активирует аргиназу, оксалоацетатдекарбоксилазу, трансаминазу, ускоряет окисление сульфгидрильных групп в дисульфидные, ингибирует

фосфотазу, стимулирует синтез антоцианов. Суточная потребность человека в никеле в зависимости от возраста, пола и веса составляет 100 – 300 мкг. Дефицит никеля в питании приводит к замедлению роста, нарушению остеогенеза, снижению концентрации глюкозы в крови, нарушению обмена кальция, железа и витамина В<sub>12</sub> [60].

Марганец принимает активное участие в процессе остеогенеза, реакциях иммунитета, процессах кроветворения и тканевого дыхания, а также в реакциях общего обмена. Суточная потребность человека в марганце составляет 5 – 10мг [60].

Цинк участвует в реакциях общего обмена, остеогенезе, синтезе белков и нуклеиновых кислот, необходимых для нормального функционирования половой системы. Суточная потребность в цинке составляет около 10 -25 мг [60].

Магний является активатором более 300 ферментов, участвующих в процессах метаболизма. В организме человека обладает общеукрепляющим действием, влияет на работу сердечно-сосудистой системы, способствует передаче нервных импульсов, оказывает спазматическое и сосудорасширяющее действие. Суточная потребность магния составляет около 400 мг [60, 85].

Организм человека постоянно нуждается в кремнии, так как при его дефиците могут возникнуть различные болезни (атеросклероз, остеохондроз, полиартрит, болезни желудочно-кишечного тракта, эндокринной системы и некоторые другие). Кремний относится к элементам, определяющим свойства гибких структур, соединительной ткани, сухожилий, стенки сосудов, хрящей и суставов. Часто при недостатке кремния возникают сердечно-сосудистые заболевания [61].

Разнообразный элементный состав и высокое содержание необходимых для человека макро- и микроэлементов в м. лесном оказывает влияние на биологическую активность марьянника.

## Выводы

1. Установлено наличие в траве и экстрактах м. лесного флавоноидов, кумаринов, алкалоидов, иридоидов, аминокислот.
2. В траве и экстрактах м. лесного и м. лугового идентифицированы флавоноиды цинарозид и гиперозид. Установлено, что максимальное количественное содержание флавоноидов в пересчете на цинарозид наблюдается в листьях (0.4%), минимальное – в корнях (0.01%). В экстрактах м. лесного содержится около 2% веществ флавоноидной природы, в экстрактах м. лугового – около 4%.
3. С помощью аутентичного образца в м. лесном идентифицирован аукубин. Максимальное количество иридоидов в пересчете на аукубин в м. лесном обнаружено в цветках (около 1%), среднее содержание иридоидов в траве находится в пределах 0.5%, в экстрактах м. лесного количество иридоидной природы не превышает 4%, м. лугового – варьирует от 7 до 11%.
4. Определен аминокислотный состав м. лесного и м. лугового. Преобладают в составе такие аминокислоты, как глицин, фенилаланин, лизин, глутаминовая кислота. Концентрация аминокислот в траве м. лесного находится в пределах 2 мг%, м. лугового – в пределах 4 мг%. Количественное содержание аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту в экстрактах м. лесного составило 4 - 5%.
5. Определен компонентный состав и количественное содержание жирных кислот в масле семян м. лесного, доминирующими являются непредельные жирные кислоты с 18 углеродными атомами.
6. Определен микроэлементный состав м. лесного (19 элементов).

## ГЛАВА 6. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ТРАВЫ МАРЬЯННИКА ЛЕСНОГО И ЛУГОВОГО

Лекарственные растения наряду с синтетическими препаратами занимают видное место среди лекарственных средств, они сочетают в себе широту и мягкость терапевтического действия с отсутствием значительного числа побочных эффектов в случае рационального применения. Поэтому целесообразным считается применение фитопрепаратов при лечении хронических заболеваний.

Растения рода Марьянник широко применяются в народной медицине при лечении сердечно-сосудистых патологий и заболеваний нервной системы. Нами были проведены исследование острой токсичности и фармакологической активности экстрактов м. лесного в сравнении с экстрактами м. лугового на кафедре физиологии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России под руководством д.м.н., профессора Сыропятова Б.Я.

### 6.1. Изучение антикоагулянтной активности

Гиперкоагуляция — частое осложнение самых распространенных заболеваний. Она опасна тромбообразованием и развитием тромбоэмболии, которые лежат в основе тяжелейших заболеваний, таких как инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбофлебит, сахарный диабет, гипертоническая болезнь. Лечение этих осложнений представляет большую проблему из-за недостатка антикоагулянтов прямого действия. Существует только один антикоагулянт прямого действия — гепарин, который имеет массу недостатков: разрушается в желудочно-кишечном тракте, так как является липополисахаридом; при внутривенном введении разрушается гепариназой, поэтому необходимо введение каждые 4 часа; при внутримышечном введении может вызвать гематомы. Данные о влиянии различных представителей сем. *Scrophulariaceae* на систему гемостаза свидетельствуют о разнонаправленном характере фармакологической активности

[111]. Известно, что вероника лекарственная и марьянник дубравный ускоряют процесс свертывания крови [43], при этом очанка коротковолосистая замедляет данный процесс [2], трава льнянки обыкновенной проявляет не однозначное действие [111], иридоиды коровяка черного оказывают влияние на плазменные факторы свертывания крови, подобное действию гепарина [33], комплекс флавоноидов м. лугового обладает антиагрегационным действием [12].

В связи с тем, что м. лесной является близким морфолого-анатомическим видом к м. луговому, нами была изучена антикоагулянтная активность экстрактов м. лесного в сравнении с аналогичными экстрактами м. лугового [6, 70, 74]. Результаты полученного исследования представлены в таблице 30.

Таблица 30

Влияние спиртовых и водных экстрактов м. лесного и м. лугового на свертываемость крови

Исследуемый объект	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Спиртовый экстракт м. лугового	34.5±2.84	35.7±2.08	- 3.5	>0.05
Водный экстракт м. лугового	21.5±0.87	24.6±1.01	- 14.4	<0.05
Спиртовый экстракт м. лесного	45.2±5.10	36.9±3.43	+ 18.4	>0.05
Водный экстракт м. лесного	20.4±0.59	22.6±0.66	- 10.8	<0.05
Гепарин	29.9±0.48	36.6±1.82	- 22.4	<0.01

Примечание: Р – в сравнении с контролем.

По результатам, представленным в таблице 30, видно, что спиртовый экстракт м. лугового активности не проявил, в отличие от аналогичного экстракта м. лесного, который укорачивал время свертывания крови на 18.4%.

Водные экстракты оказали прямое антикоагулянтное действие, под влиянием которых свертываемость крови снижалась на 10.8% и 14.2% соответственно, в то время как под влиянием гепарина - на 22.4%.

Для выявления группы биологически активных веществ, определяющих антикоагулянтное действие, было исследовано влияние на гемостаз флавоноидов и иридоидов исследуемых видов (табл. 31).

Таблица 31

Исследование влияния суммы флавоноидов и суммы иридоидов м. лугового и м. лесного на свертываемость крови

Соединение	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Флавоноиды м. лесного	21.9±0.75	25.9±1.40	- 22.8	<0.01
Иридоиды м. лесного	29.2±3.32	30.9±1.84	- 5.6	>0.05
Флавоноиды м. лугового	20.6±0.35	23.9±0.86	- 16.0	<0.01
Иридоиды м. лугового	26.9±0.82	26.2±1.24	+ 1.1	>0.05
Гепарин	29.9±0.48	36.6±1.82	- 22.4	<0.01

Примечание: Р – в сравнении с контролем.

Из данных таблицы 31 следует, что флавоноиды м. лесного и м. лугового проявляют прямую антикоагулянтную активность, уменьшая скорость свертывания на 22.8% и 16.0%, соответственно, иридоиды активности не проявили.

Торможение свертываемости крови может происходить за счет влияния на различные механизмы гемостаза – тромбоциты, плазменные факторы свертывания, эритроциты и т. д. Поэтому с целью изучения механизмов угнетения свертывания под влиянием суммы флавоноидов м. лесного были проведены исследования действия на цельную кровь, тромбоциты и факторы свертывания плазмы.

Из результатов таблицы 32 следует, что флавоноиды м. лесного уменьшают скорость свертывания цельной крови, плазмы, обогащенной тромбоцитами, и плазмы без тромбоцитов на 22.8%, 20.9% и 23.8%, соответственно. Из этого следует, что флавоноиды оказывают влияние на плазменные факторы свертывания.

Исследование влияния суммы флавоноидов м. лесного на факторы свертывания крови

Субстрат	Время свертывания, сек		% изменения свертываемости	Р достоверность
	Контроль	Опыт		
Цельная кровь	20.5±1.08	28.9±1.87	- 22.8	<0.01
Плазма, обогащенная тромбоцитами	33.5±1.41	40.5±1.01	- 20.9	<0.01
Плазма без тромбоцитов	39.1±2.52	48.4±2.32	- 23.8	<0.01

Таким образом, проведенные исследования показали, что спиртовые экстракты марьянников активности не проявили, водные экстракты оказали прямое антикоагулянтное действие. Суммы флавоноидов проявляют прямую антикоагулянтную активность, а сумма иридоидов не активна. Флавоноиды оказывают влияние на плазменные факторы свертывания.

### 6.2. Изучение противосудорожной активности

В последние годы отмечается значительный интерес исследователей к противосудорожным средствам, получаемым из растительного сырья. Установлено, что противосудорожной активностью обладают растения: пион уклоняющийся [79], лабазник вязолистный, валериана лекарственная [16], шлемник байкальский [100], водяника лесная и чертополох курчавый [79]. По литературным данным известно, что м. луговой применялся при лечении эпилепсии, что говорит о возможной противосудорожной активности.

Ранее было доказано наличие противосудорожного действия у экстрактов м. лугового в опыте «Коразоловые судороги» [12]. Коразол влияет преимущественно на различные отделы головного мозга и в значительно меньшей степени на спинной мозг. Стимулирующее и судорожное действие коразола многие авторы расценивают как следствие возбуждения среднего и промежуточного мозга, не отрицая потенциальной инициативы коры головного мозга в

возникновении судорог. Таким образом, изучение противосудорожной активности по коразоловому тесту позволяет установить воздействие исследуемых соединений на средний и межучочный мозг [44].

Нами была исследована противосудорожная активность экстрактов м. лесного. Полученные результаты были сопоставлены с результатами исследований по м. луговому Галишевской Е.Е. о наличии противосудорожной активности судили по предупреждению тонической фазы судорог (табл. 33).

Таблица 33

Противосудорожная активность экстрактов *Melampyrum sylvaticum* L.

Образец	Доза, мг/кг	Латентный период судорог, сек	Продолжительность жизни, сек	Выживаемость, %
Коразол	120	48.4 ± 1.29	209.8 ± 8.92	0
Водный экстракт	100	53.80 ± 1.85*	873.2 ± 13.22*	20
	200	241.5 ± 7.50*	755.5 ± 42.74*	20
Спиртовый экстракт	100	45.3 ± 2.91	450.7 ± 49.87*	0
	200	187.5 ± 7.50*	637.7 ± 14.68*	20

Примечание: \* - достоверность  $P < 0.05$

Установлено, что водный и спиртовый экстракты м. лесного в дозе 100 мг/кг не влияют на латентный период судорог, но достоверно увеличивают продолжительность жизни. Экстракты в дозе 200 мг/кг увеличивают латентный период и продолжительность жизни (рис. 40). Выживаемость животных под влиянием водного экстракта в обеих дозах и спиртового в дозе 200 мг/кг составила 20% (рис. 40).

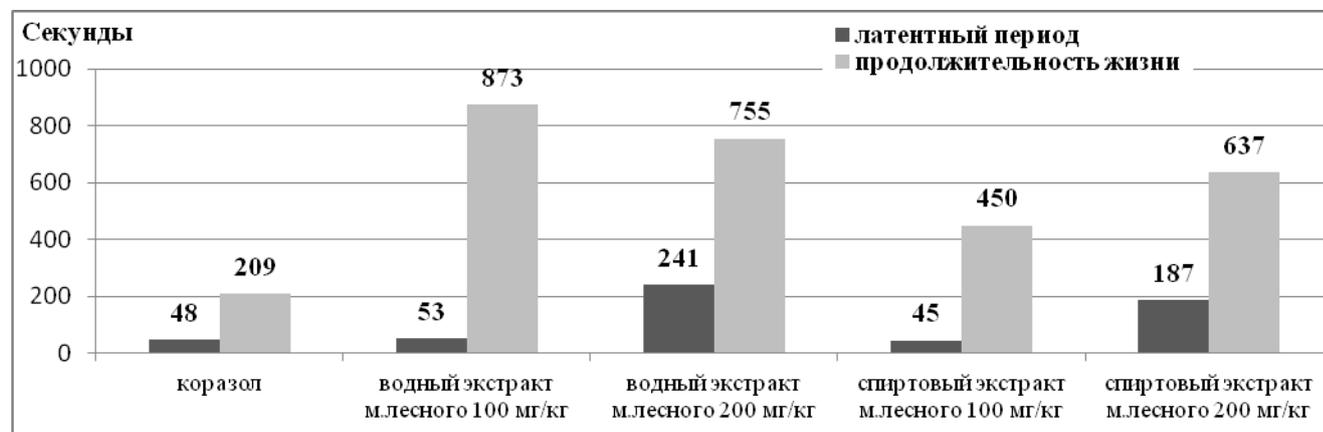


Рис. 40. Латентный период судорог и продолжительность жизни животных под действием коразола и экстрактов м. лесного.

По результатам ранее проведенных исследований установлено [12], что сухие экстракты м. лугового не оказывают влияние на латентный период, водный экстракт в дозах 100 и 200 мг/кг достоверно увеличивает продолжительность жизни подопытных животных (рис. 41). Выживаемость животных под влиянием коразола на фоне действия водного экстракта м. лугового составила от 50% до 100% в зависимости от дозы (рис. 42).

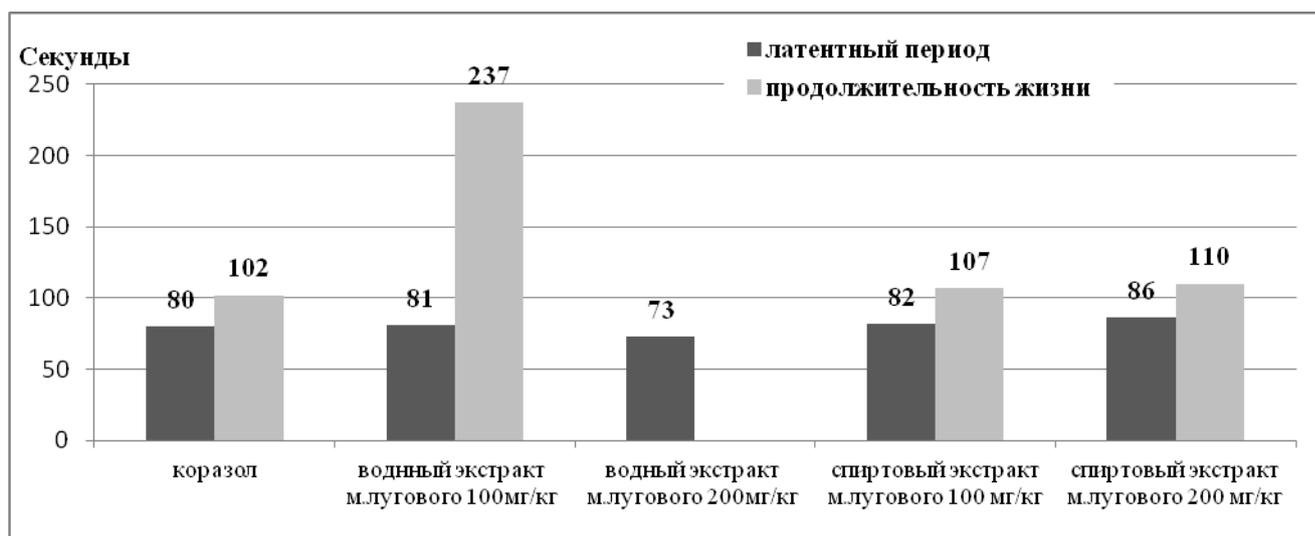


Рис. 41. Латентный период судорог и продолжительность жизни животных под действием коразола и экстрактов м. лугового [13].

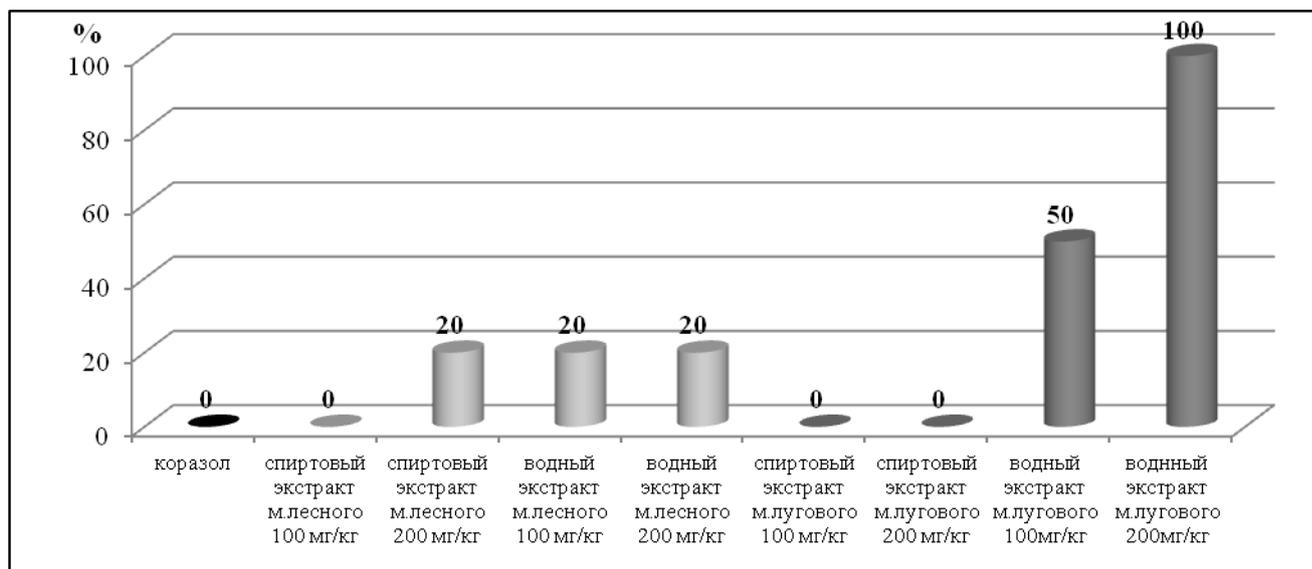


Рис. 42. Выживаемость животных под действием коразола и экстрактов м. лугового и м. лесного.

Полученные результаты свидетельствуют, что исследуемые виды марьянников обладают противосудорожной активностью на фоне действия

коразола и воздействуют на средний и межзатылочный мозг, при этом влияют на разные исследуемые параметры.

### **6.3. Изучение седативной активности**

В настоящее время во всем мире повышается потребность населения в седативных средствах. Эти препараты используют как в лечении пациентов с различными заболеваниями, так и у здоровых людей при стрессовых ситуациях. В нашей стране традиционно популярными являются фитотерапевтические средства, в том числе препараты валерианы лекарственной, пустырника пятилопастного, мяты перечной, пиона уклоняющегося и другие.

Системная реакция на стресс, направленная на устранение или ослабление стресса, сопровождается изменениями поведенческих, вегетативных, двигательных, сенсорных, когнитивных и других функций организма [98]. Поведение при стрессе является неотъемлемой частью общего поведения, при этом сдвиг поведенческого реагирования происходит в сторону крайних состояний возбуждения – торможения центральной нервной системы и укладывается в единую шкалу этологической активности стресс – страх – тревожность – депрессия [34]. Для изучения качественных и количественных показателей поведения применяются общие и специальные поведенческие тесты [4, 34, 128]. Одним из таких является тест «открытое поле» [87, 69]. «Открытое поле», применяемое в соответствии с протоколом для скрининга фармпрепаратов и фенотипирования животных, позволяет выявлять значительные нарушения в нервномышечной, сенсорной и вегетативной системах организма и оценивать более тонкие функциональные изменения, связанные с индивидуальным и социальным поведением животных [1, 122, 126].

В народной медицине м. луговой часто применялся при испуге у детей, что говорит о седативном действии данной травы, также известно о наличии успокаивающего эффекта настоя м. лугового. Нами была изучена седативная активность экстрактов м. лесного и м. лугового при курсовом применении.

Седативную активность проверяли с помощью методики «Открытое поле». Фиксировали следующие параметры: горизонтальная двигательная активность, вертикальная двигательная активность и косметическая активность. Под горизонтальной активностью подразумевается характер и интенсивность передвижения животного в манеже. Измеряли два типа горизонтальной активности – по числу перемещений по периферии арены и по числу выходов животного в центр площадки. Вертикальную активность – вставание животного на задние лапки, «вертикальные стойки» – также разделили на два подтипа: «вертикальные стойки» с упором на стенку площадки и «вертикальные стойки» без упора на стенку. Косметическую активность, включающую в себя груминг – уход за кожей и шерстью, как и другие виды активности, оценивали в двух направлениях (короткий груминг включает в себя умывание глаз, носа; длительный груминг – умывание головы и туловища).

Анализ полученных данных показал [11, 89], что при длительном применении экстрактов марьянников происходит достоверное снижение вертикальной активности (табл. 34). Количество «вертикальных стоек» уменьшается на фоне приема экстрактов марьянников на треть (водный экстракт м. лесного) и до половины (экстракты м. лугового). Угнетение вертикальной активности под влиянием экстракта валерианы не происходит, как и в случае контроля. Уменьшение числа «вертикальных стоек» у животных под влиянием экстрактов свидетельствует о наличии у них седативной активности.

Достоверного снижения горизонтальной активности по периферии у подопытных животных не наблюдалось, хотя, выход животных в центр площадки снизился до одного раза в среднем уже после десяти дней приема исследуемых экстрактов и экстракта валерианы (табл. 35). Уменьшение числа выходов в центр площадки говорит об угнетении ориентировочно-исследовательского поведения животных.

После тридцатидневного приема экстрактов марьянников и валерианы наблюдается общее снижение двигательной активности (рис. 43). При приеме экстрактов марьянников наблюдается постепенное снижение общей активности,

как и в случае приема экстракта валерианы. На фоне приема экстрактов м. лесного наблюдается максимальное снижение общей двигательной активности и составляет 50 – 60% от исходного уровня.

Груминг (косметическая активность) – специфическая поведенческая реакция грызунов на стрессовые условия. При этом изменения основных параметров груминга при помещении животного в экстремальные условия интерпретируют по-разному. Некоторые ученые считают, что при стрессовом состоянии происходит усиление косметической активности. Другие ученые утверждают, повышение груминга является критерием успешной адаптации животного к незнакомым условиям. Усиление частоты и продолжительности груминга наблюдается в комфортных для животного условиях [3]. Однако действие марьянников, также как и экстракта валерианы на показатели косметической активности статистически не достоверно (табл. 36). Сделать заключение, как влияют исследуемые виды и валериана на показатели груминга, не представляется возможным.

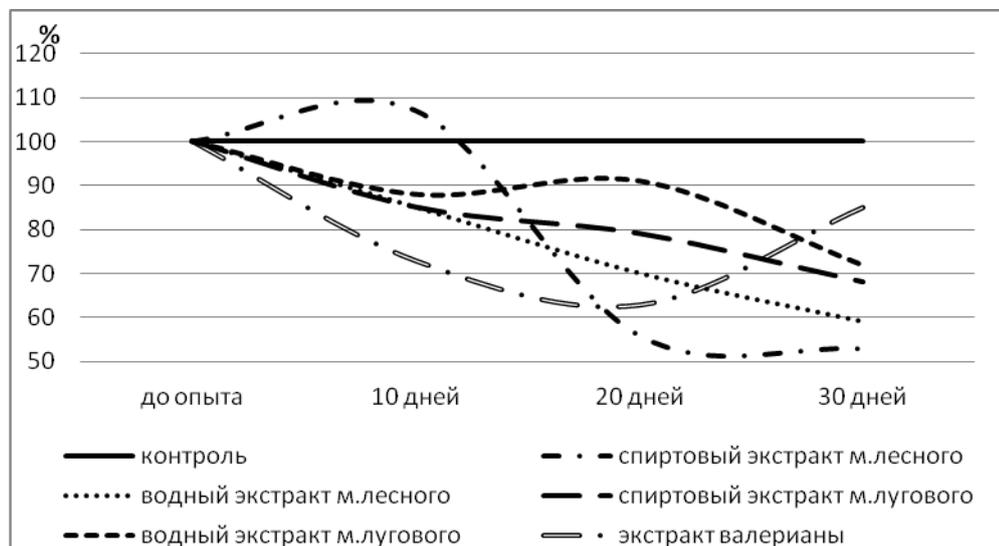


Рис. 43. Двигательная активность на фоне влияния экстрактов м. лесного, м. лугового, валерианы, в %.

Таким образом, из полученных данных можно сделать выводы, что м. лесной и м. луговой обладают седативной активностью, действие их сопоставимо с действием экстракта валерианы.

Таблица 34

Вертикальная активность животных на фоне влияния экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

До опыта		№ п/п	Опыт	10 дней		20 дней		30 дней	
С упором на стенку	На весу			С упором на стенку	На весу	С упором на стенку	На весу	С упором на стенку	На весу
15.3±1.46	6.7±1.57	1	контроль	15.1±1.73	6.4±1.73	16.0±1.15	6.7±1.54	15.1±1.87	6.3±1.70
		2	спиртовый экстракт м. лесного	12.0±1.27	1.0* <sup>#</sup> ±0.44	5.6* <sup>#</sup> ±1.46	1.1* <sup>#</sup> ±0.63	7.6* <sup>#</sup> ±1.78	0.3* <sup>#</sup> ±0.18
		3	водный экстракт м. лесного	10.6* <sup>#</sup> ±0.97	1.9* <sup>#</sup> ±0.55	6.6* <sup>#</sup> ±0.90	2.6* <sup>#</sup> ±1.00	7.4* <sup>#</sup> ±1.48	1.4* <sup>#</sup> ±0.61
		4	спиртовый экстракт м. лугового	13.3±1.08	3.6±0.57	12.1±1.70	3.7±1.28	6.3* <sup>#</sup> ±1.08	2.0* <sup>#</sup> ±0.79
		5	водный экстракт м. лугового	20.3±2.00	5.1±0.74	13.1±1.30	4.0±0.58	8.4* <sup>#</sup> ±0.61	2.7 <sup>#</sup> ±0.68
		6	экстракт валерианы	9.7* <sup>#</sup> ±1.46	1.4* <sup>#</sup> ±0.30	7.6* <sup>#</sup> ±0.84	0.6* <sup>#</sup> ±0.30	11.3 <sup>#</sup> ±0.81	2.6 <sup>#</sup> ±0.69

Примечание: \* - различия со значением исследуемого показателя в контроле (изотонический раствор натрия хлорида) достоверны (P&lt;0.05)

# - различия со значением исследуемого показателя до начала опыта достоверны (P&lt;0.05)

Таблица 35

Горизонтальная активность животных на фоне влияния экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

До опыта		№ п/п	Опыт	10 дней		20 дней		30 дней	
Сектор	Центр			Сектор	Центр	Сектор	Центр	Сектор	Центр
61.2±5.24	3.5±0.59	1	контроль	64.0±6.68	3.6±0.46	60.4±6.45	3.5±0.68	62.7±6.89	3.6±0.61
		2	спиртовый экстракт м. лесного	78.6±6.36	1.6* <sup>#</sup> ±0.48	40.4* <sup>#</sup> ±6.40	1.3* <sup>#</sup> ±0.71	37.4* <sup>#</sup> ±5.82	0.4* <sup>#</sup> ±0.30
		3	водный экстракт м. лесного	60.9±4.17	0.4* <sup>#</sup> ±0.20	50.4±4.10	1.1* <sup>#</sup> ±0.46	40.9* <sup>#</sup> ±3.65	1.3* <sup>#</sup> ±0.29
		4	спиртовый экстракт м. лугового	55.3±2.44	1.3* <sup>#</sup> ±0.18	51.9±3.19	0.9* <sup>#</sup> ±0.34	49.3±5.54	1.6* <sup>#</sup> ±0.37
		5	водный экстракт м. лугового	49.4±4.03	1.9* <sup>#</sup> ±0.40	60.4±4.91	1.3* <sup>#</sup> ±0.29	51.0±3.09	0.4* <sup>#</sup> ±0.20
		6	экстракт валерианы	51.7±2.65	0.1* <sup>#</sup> ±0.14	45.4* <sup>#</sup> ±1.67	0.7* <sup>#</sup> ±0.36	58.9±3.49	0.7* <sup>#</sup> ±0.18

Примечание: \* - различия со значением исследуемого показателя в контроле (изотонический раствор натрия хлорида) достоверны (P<0.05)  
<sup>#</sup> - различия со значением исследуемого показателя до начала опыта достоверны (P<0.05)

Таблица 36

## Косметическая активность на фоне влияния экстрактов м. лесного и м. лугового и экстракта валерианы

До опыта		№ п/п	Опыт	10 дней		20 дней		30 дней	
Короткая	Длительная			Короткая	Длительная	Короткая	Длительная	Короткая	Длительная
1.0±0.30	0.4±0.22	1	контроль	1.0±0.37	0.5±0.20	1.0±0.28	0.4±0.28	1.1±0.34	0.4±0.30
		2	спиртовый экстракт м. лесного	2.0 <sup>#</sup> ±0.31	0.3±0.18	2.3±0.89	1.1±0.40	1.6±0.72	0.7±0.18
		3	водный экстракт м. лесного	1.9±0.34	0.6±0.20	1.1±0.40	1.0±0.38	0.6±0.30	1.0±0.31
		4	спиртовый экстракт м. лугового	3.3 <sup>*#</sup> ±0.36	1.1±0.26	1.1±0.40	0.7±0.29	1.9±0.42	1.0±0.22
		5	водный экстракт м. лугового	2.0±0.38	1.3 <sup>*#</sup> ±0.29	3.6 <sup>*#</sup> ±0.81	0.9±0.14	2.1±0.51	0.9±0.26
		6	экстракт валерианы	1.1±0.26	0.9±0.18	1.7±0.47	1.0±0.22	1.4±0.43	1.3 <sup>*#</sup> ±0.18

Примечание: \* - различия со значением исследуемого показателя в контроле (изотонический раствор натрия хлорида) достоверны (P<0.05)

# - различия со значением исследуемого показателя до начала опыта достоверны (P<0.05)

#### **6.4. Изучение нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активности**

В настоящее время актуальной проблемой является изыскание новых препаратов для лечения патологий нервной системы, обладающих нейропротекторными свойствами. Под фармакологической нейропротекцией понимают комплекс фармакокинетических и фармакодинамических влияний, направленных на улучшение питания нервных клеток, защиту их от повреждающих факторов, повышение выживаемости нейронов, стимуляцию нейропластичности и нейрогенеза [114].

В результате изучения аминокислотного состава м. лесного и м. лугового было доказано наличие глутаминовой кислоты в траве и экстрактах обоих исследуемых видов. Глутаминовая кислота является нейромедиаторной возбуждающей аминокислотой, имеет общие фенильные и метилбензимидазольные заместители с гамма-аминомасляной кислотой (ГАМК) и способна взаимно превращаться в процессе метаболизма в гамма-аминомасляную кислоту. По мнению многих авторов, ГАМК-система относится к основным центральным стресс-лимитирующим системам [80, 97]. При эмоционально-болевым стрессе в головном мозге животных наблюдается активизация ГАМК-системы, что способствует ограничению стресс-синдрома и является естественным механизмом предупреждения стрессорных повреждений [55, 80, 83]. Также экспериментально доказана эффективность использования производных возбуждающих медиаторных аминокислот для коррекции расстройств высшей нервной деятельности у животных при эмоциональном стрессе [77]. В связи с этим, представляет интерес изучить нейропротекторную активность марьянников.

Нейропротекторную активность изучали при помощи установки «крестообразный лабиринт» [86]. Оценивали следующие виды поведения:

1. Общее время нахождения животного в крестообразном лабиринте, затраченное на тринадцать заходов в его тупики, что свидетельствует об уровне исследовательской активности.

2. Латентный период начала исследования, то есть время между помещением животного в центральную камеру лабиринта и его первым заходом в тупик. Этот показатель позволяет дифференцировать анксиолитические свойства изучаемых веществ.

3. Время полного обхода лабиринта, то есть посещение всех отсеков, отражает способность к пространственной ориентации и рассматривается как одна из форм рассудочной деятельности у животного.

4. Количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите, рассматривается как показатель ошибок краткосрочной памяти.

5. Поочередное посещение двух из четырех тупиков, которое интерпретируется как поведенческая стереотипия.

6. Количество правых и левых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта отражает степень асимметрии локомоции.

Результаты исследования представлены в таблице 37.

Полученные данные свидетельствуют о том, что статистически достоверных изменений в латентном периоде времени не наблюдалось. Общее время нахождения в лабиринте на фоне действия спирта значительно сокращалось в сравнении с контролем, что свидетельствует о понижении исследовательской активности. Под действием экстрактов м. лесного общее время несколько выше, чем в контрольной группе, что говорит об увеличении исследовательской активности животных (рис. 44). Под действием спирта этилового на фоне экстрактов общее время значительно увеличивалось в случае спиртовых экстрактов или было неизменным в сравнении с общим временем на фоне водных экстрактов.

Таблица 37

Нейропротекторная активность экстрактов *Melampyrum sylvaticum* L.

Опыт	Общее время, с	Латентный период, с	Полный обход, с	Возврат в тупик	Поочередное посещение 2-х из 4-х	Соотношение поворотов в %	
Контроль	141.8±33.55	0.8±0.68	65.8±17.50	0.4±0.19	0.8±0.49	59 / 41	
Спирт этиловый	91.1±28.52 P <sup>#</sup> >0.05	0 P <sup>#</sup> >0.05	26.3±6.93 P <sup>#</sup> >0.05	0 P <sup>#</sup> >0.05	3.6±1.06 P <sup>#</sup> >0.05	91 / 9 P <sup>#</sup> <0.001	
Спиртовой экстракт	200мг/кг контроль	205.0±20.82	2.3±0.61	56.6±7.67	0.7±0.28	0.3±0.16	56 / 44
	100мг/кг	600.5±0.98 P <sup>#</sup> <0.001 P* <sup>*</sup> <0.001	0 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	45.5±4.90 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.05	0 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	0.75±0.49 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.05	68 / 32 P <sup>#</sup> <0.05 P* <sup>*</sup> <0.001
	200 мг/кг	291.4±56.18 P <sup>#</sup> <0.05 P* <sup>*</sup> <0.01	1.9±0.42 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.001	73.1±18.51 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.05	0.4±0.15 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.05	4.8±0.63 P <sup>#</sup> <0.001 P* <sup>*</sup> >0.05	78 / 22 P <sup>#</sup> <0.05 P* <sup>*</sup> >0.05
Водный экстракт	200 мг/кг контроль	215.5±89.34	2.8±0.99	52.5±17.59	0.8±0.44	4.0±1.10	81 / 19
	100 мг/кг	69.0±27.21 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	1.7±1.73 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	32.3±12.72 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	0 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	3.0±1.13 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	73 / 27 P <sup>#</sup> <0.05 P* <sup>*</sup> >0.05
	200 мг/кг	214.0±45.83 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.05	0 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	57.2±6.22 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> <0.01	0 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	2.2±0.58 P <sup>#</sup> >0.05 P* <sup>*</sup> >0.05	70 / 30 P <sup>#</sup> <0.05 P* <sup>*</sup> >0.05

Примечание: P<sup>#</sup> - различия со значением исследуемого показателя в контролеP\*<sup>\*</sup> - различия со значением исследуемого показателя со спиртом этиловым

Водный экстракт м. лесного в дозе 100 мг/кг действия не оказывал (рис. 44).

Достоверных изменений во времени полного обхода не наблюдалось. Но можно отметить, что под влиянием спирта этилового время полного обхода сокращалось, что свидетельствует об ухудшении пространственной организации [86]. Экстракты марьянника в большей или меньшей степени восстанавливали время полного обхода до исходных значений. Водный экстракт в дозе 100 мг/кг активности не проявил.

Достоверных изменений в количестве возвратов в тупик не наблюдалось (рис. 45).

Под влиянием спирта этилового, а также спиртового экстракта в дозе 200 мг/кг и водных экстрактов наблюдалось увеличение поочередных посещений двух тупиков из четырех, что говорит о поведенческой стереотипии (рис. 45). Возможно, что под влиянием спирта этилового на фоне действия экстрактов м. лесного усиливается седативный эффект обоих, что и объясняет увеличение показателей стереотипности поведения.

На рисунке 46 видно, что под действием спирта этилового происходит резкое смещение количества поворотов в одну сторону, что говорит о высокой степени асимметрии локомоции. На фоне действия экстрактов м. лесного влияние спирта этилового на локомоцию снижается или восстанавливается до контрольных значений.

Из полученных данных можно сделать вывод, что экстракты м. лесного обладают позитивной противопоалкогольной активностью.

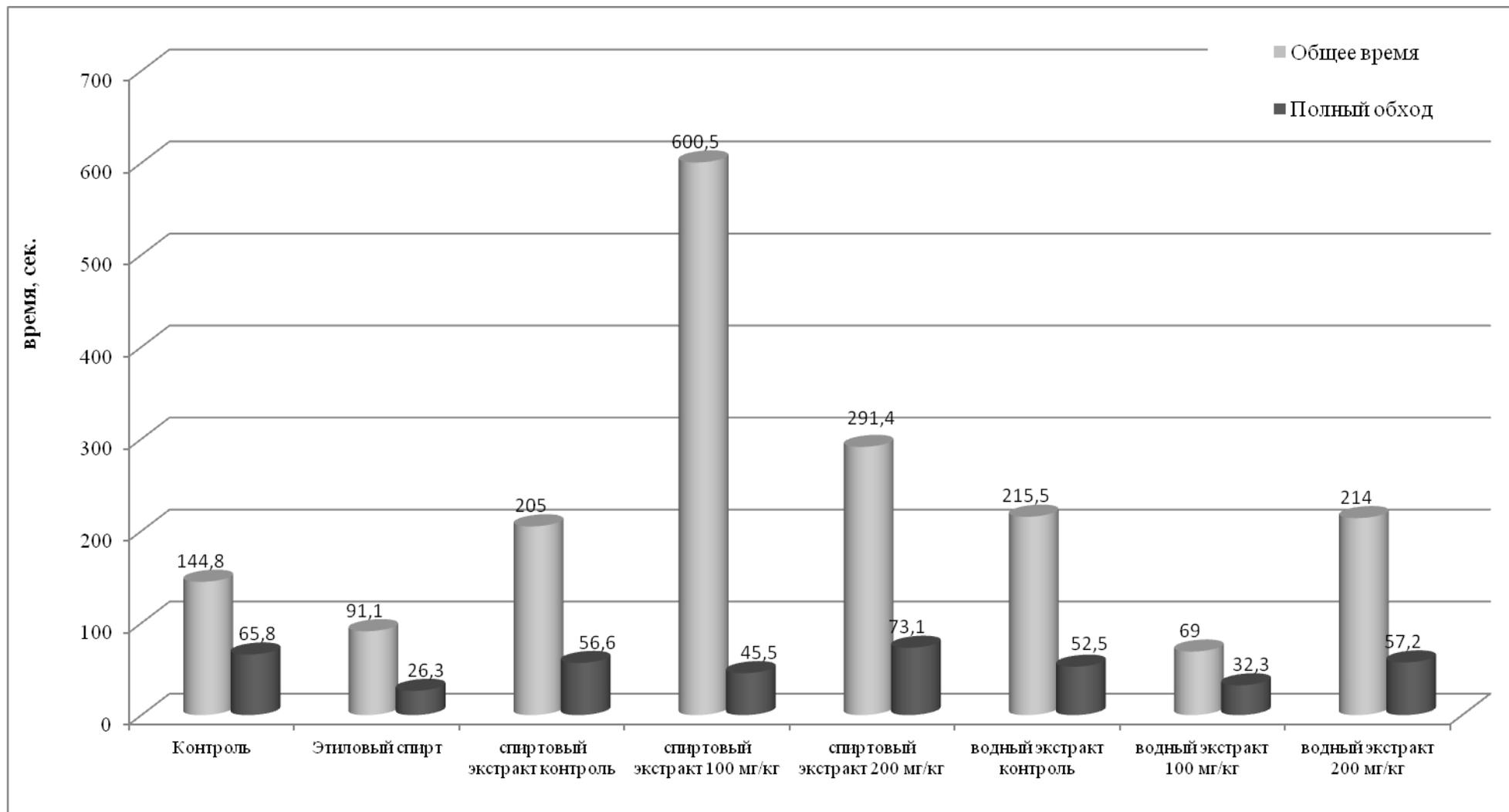


Рис. 44. Временные показатели нахождения животных в крестообразном лабиринте под влиянием этилового спирта и экстрактов м. лесного

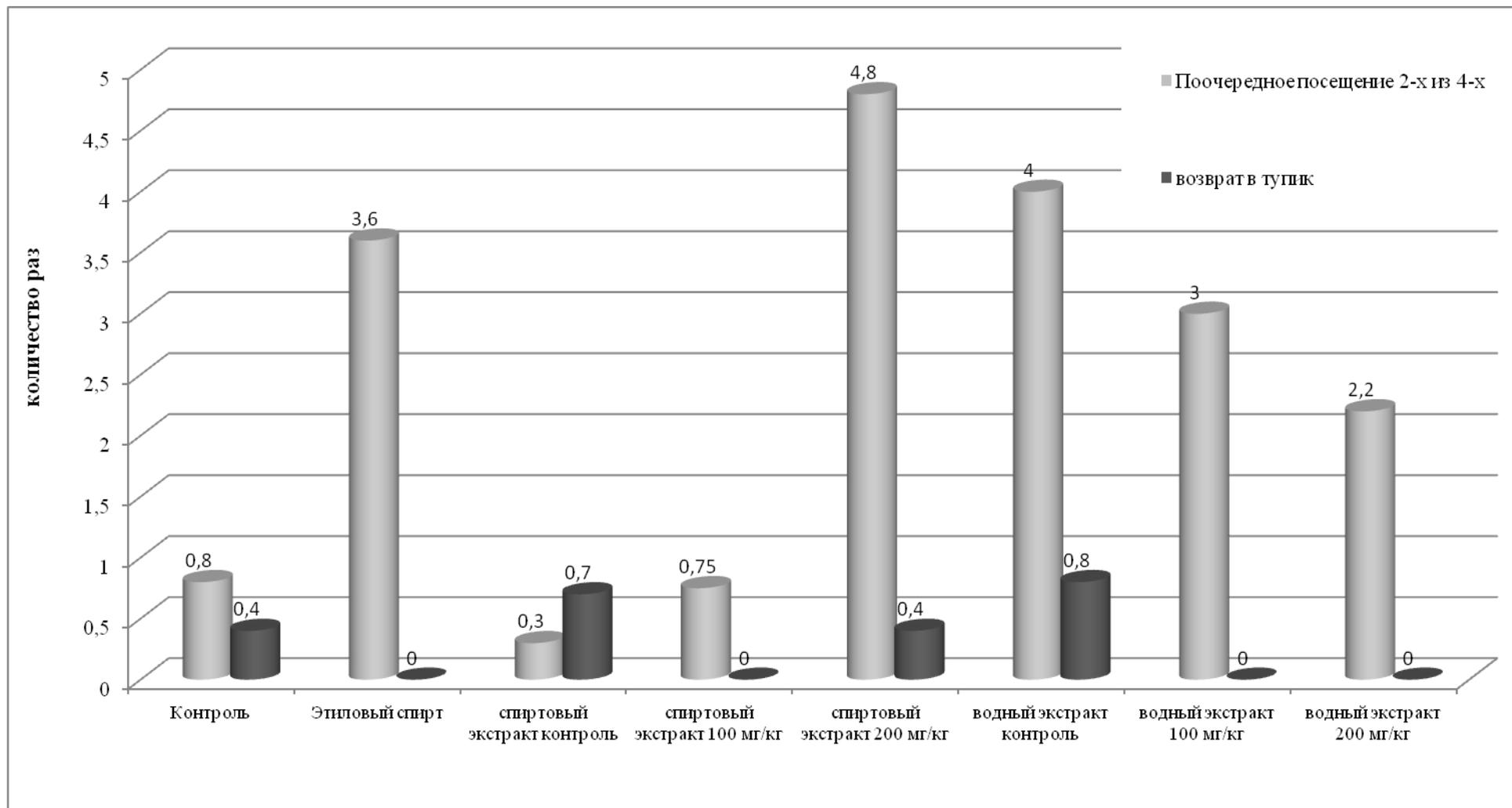


Рис. 45. Показатели стереотипности поведения животных под влиянием этилового спирта и экстрактов м. лесного

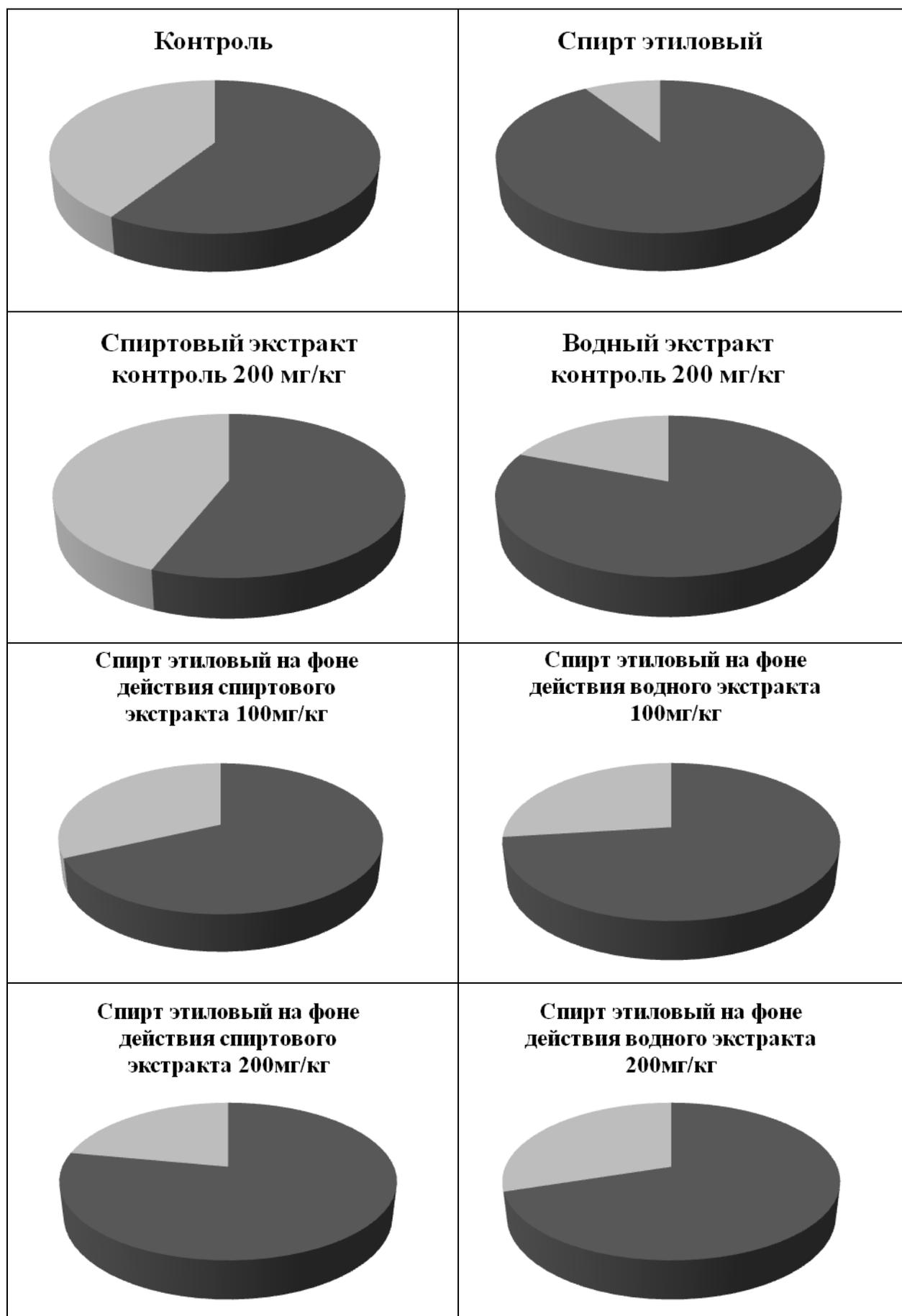


Рис. 46. Показатель асимметрии локомоции (соотношение поворотов) под влиянием спирта этилового и экстрактов м. лесного

### 6.5. Испытания на острую токсичность

Острую токсичность определяли на беспородных белых мышах массой 17-25 г. Экстракты вводили перорально в виде суспензии или водного раствора из расчета 500 мкл на 10 г массы.

В результате проведенных исследований установлено, что при введении мышам водных растворов экстрактов *Melampyrum sylvaticum* L. перорально в дозе 5000 мг/кг веса животного видимых изменений в поведении лабораторных животных не наблюдалось, летальность в экспериментальной группе отсутствовала. ЛД<sub>50</sub> определить не удалось. Дальнейшее увеличение дозы экстрактов нерационально в связи с отсутствием токсичного действия в дозе 5000 мг/кг и со сложностью введения большего количества экстракта. Основываясь на полученных результатах, можно сделать вывод, экстракты м. лесного практически безвредны и могут быть отнесены к 4 классу опасности (вещества малоопасные) по ГОСТ 12.1.007-76 [20], т.к. средняя смертельная доза при введении в желудок более 5000 мг/кг.

## Выводы

1. М. лесной и м. луговой обладают прямым антикоагулянтным действием, при этом действие оказывают только водные экстракты. Сумма флавоноидов проявляет прямую антикоагулянтную активность, оказывая влияние на плазменные факторы свертывания.
2. М. лесной и м. луговой обладают седативной активностью на уровне экстракта валерианы.
3. Экстракты м. лесного проявляют противосудорожную активность, продлевая латентный период и продолжительность жизни животных в тесте «Коразоловые судороги».
4. Экстракты м. лесного обладают положительной нейропротекторной (нейромодуляторной антиалкогольной) активностью.
5. Экстракты м. лесного относятся к 4 классу опасности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать общие выводы:

1. Проведена оценка запасов сырья м. лесного в центральной части ареала распространения на территории России: Костромской области. Биологический и эксплуатационный запасы могут обеспечить промышленную заготовку сырья.
2. В результате анатомического изучения выявлены диагностические признаки вегетативных и генеративных органов м. лесного, установлено анатомическое сходство с м. луговым.
3. Установлено, что основными группами БАВ м. лесного являются флавоноиды и иридоиды. С помощью аутентичных образцов, хроматографическими и спектральными методами идентифицированы флавоноиды цинарозид и гиперозид, умбелиферон, хлорогеновая кислота, аукубин. Определено количественное содержание иридоидов и флавоноидов в траве и органах м. лесного. Изучен состав аминокислот м. лесного и м. лугового. Определен качественный состав и количественное содержание жирных кислот в семенах м. лесного и м. лугового. Доминирующими являются непредельные жирные кислоты (линоленовая, линолевая, олеиновая). Определен микроэлементный состав м. лесного.
4. Изучена биологическая активность экстрактов м. лесного и м. лугового. Установлено антикоагулянтное, противосудорожное, седативное, нейромодуляторное антиалкогольное действие. Приоритет исследований подтвержден патентом РФ на изобретение способа получения средства, обладающего седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью. Определена низкая токсичность экстрактов м. лесного.
5. Разработан проект ФС «Марьянника лесного трава».

**Рекомендации.** Результаты диссертационного исследования могут служить основой для поиска новых источников лекарственного растительного сырья среди представителей рода Марьянник, расширения ресурсной базы растений, обладающих антикоагулянтным, седативным, противосудорожным, нейропротекторным действием. Сопоставление морфологически и экологически близких видов позволяет более подробно изучить отличия в их химическом составе и биологической активности и определить направление для дальнейших исследований и практического применения.

**Перспективы дальнейшей разработки темы** заключаются в дальнейшем исследовании химического состава и биологической активности представителей рода Марьянник, разработке современных методик анализа и стандартизации растительного сырья, расширения номенклатуры лекарственных растительных объектов и получения препаратов на их основе.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Амикшеева, А. В. Поведенческое фенотипирование: современные методы и оборудование / А. В. Амикшеева // Вестн. ВОГиС. - 2009. - Т. 13, № 3. - С. 529 - 542.
2. Антикоагулянтная активность растений семейства Норичниковые / Т. В. Сухина, В. М. Петриченко, Б. Я. Сыропятов, Т. С. Шестакова // Сб. материалов XIV Рос. нац. конгр. «Человек и лекарство». – Москва, 2007. – С. 882.
3. Ахмадеева, А. В. Половые различия груминга и уровней тревожности у предпочитающих алкоголь крыс [Электронный ресурс] / А. В. Ахмадеева, Л. Ф. Галиева, Н. Ф. Леушкина // Современные проблемы науки и образования. – 2015. - № 5. – Режим доступа : <http://science-education.ru/ru/article/view?id=21495> (дата обращения: 07.06.2016).
4. Буреш, Я. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Д. П. Хьюстон. – Москва : Высш. шк., 1991. - С. 119 - 122.
5. Векторная карта Российской Федерации [электронный ресурс]. – Режим доступа : <http://www.sklyarovstudio.ru/works/graphdesign/russia/> (дата обращения: Октябрь 14, 2014).
6. Влияние водных и спиртовых экстрактов различных видов марьянника на свертываемость крови / Е.В. Отинова, В.М. Петриченко, Б.Я. Сыропятов [и др.] // Український науково-медичний молодіжний журнал. Київ. – 2011, №1. - С. 29 – 31.
7. Вопросы рационального использования и сырьевая база лекарственных растений России: учеб. пособие по фармакогнозии / В. Ф. Левинова, Г. А. Иванова, А. В. Хлебников [и др.]. – Пермь, 2004. – 172 с.

8. Галишевская, Е. Е. Иридоиные соединения растений рода марьянник / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко // Вестн. Перм. гос. фарм. акад.: науч.-практ. журн. - 2007. - № 2. – С. 223 – 229.
9. Галишевская, Е. Е. Ресурсоведческая характеристика двух видов растений рода Марьянник (*Melampyrum* L.) / Е.Е. Галишевская, Е. Н. Скрыбина, В. Ф. Левинова // *Materialy VII Międzynarodowej naukowo-praktycznej konferencji «Perspektywiczne opracowania są nauką i technikami - 2011»*. – 2011, Volume 42: *Nauk biologicznych.: Przemysł. Nauka i studia.* – Str. 14 – 18.
10. Галишевская, Е. Е. Ресурсоведческая характеристика марьянника лугового, произрастающего на Урале / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко, В. Ф. Левинова // *Достижения и перспективы в области создания новых лекарственных средств: Материалы Российской научно-практической конференции, посвященной 70-летию ПГФА.* – Пермь, 2007. – С. 426 - 431.
11. Галишевская, Е. Е. Седативная активность водных экстрактов некоторых представителей рода *Melampyrum* L. / Е. Е. Галишевская, Е. Н. Скрыбина, В. Д. Белоногова // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* – 2016, Т. 18, №2(3). - С. 658 – 652 [Электронный ресурс]. URL: [http://www.ssc.smr.ru/media/journals/izvestia/2016/2016\\_2\\_658\\_662.pdf](http://www.ssc.smr.ru/media/journals/izvestia/2016/2016_2_658_662.pdf).
12. Галишевская, Е. Е. Фармакогностическое изучение марьянника лугового : автореф. дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Галишевская Елена Евгеньевна. – Пермь, 2004. – 21 с.
13. Галишевская, Е. Е. Фармакогностическое изучение марьянника лугового : дис. ... канд. фарм. наук: 15.00.02 / Галишевская Елена Евгеньевна. – Пермь, 2004. – 171 с.
14. Галишевская, Е. Е. Фенольные соединения марьянника лугового, произрастающего на Урале / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко // *Современные вопросы фармакогнозии: Межвузов. сб. науч. трудов с международным участием, посвящ. 20-летию кафедры фармакогнозии Ярослав. гос. мед. акад.* – Ярославль, 2004. – С. 73 - 84.

15. Галишевская, Е. Е. Фенольные соединения растений рода Марьянник / Е. Е. Галишевская, В. М. Петриченко, Е. Н. Скрыбина // Фармация. - 2011. - № 2. - С. 25 - 29.
16. Гаммерман, А. Ф. Лекарственные растения: Растения-целители / А. Ф. Гаммерман. - Москва, 1976. - 389 с.
17. Гипотензивное и седативное действие марьянника гребенчатого (клинико – экспериментальное исследование) / М. Х. Рахматуллина, Л. М. Вареник, Г. Л. Гнедкова [и др.] // Материалы Всесоюзной научной конференции по фармакологии и клиническому изучению лекарственных препаратов из растений. - Москва, 1972. - С. 112 – 119.
18. Гитун, Т. В. Лечение стрессов и нервных заболеваний / Т. В. Гитун. - Москва : РИПОЛ классик, 2009. - С. 61.
19. Гладышев М. И. Незаменимые полиненасыщенные жирные кислоты и их пищевые источники для человека / М. И. Гладышев // Journal of Siberian Federal University. Biology 4(2012 5). - С. 352 – 386.
20. ГОСТ 12.1.007 – 76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. - Москва : Изд-во стандартов, 1999. - 6 с.
21. ГОСТ 26929-94. Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения содержания токсичных элементов. - Москва: Изд-во стандартов, 2010. - 9 с.
22. ГОСТ 30418 – 96. Масла растительные. Метод определения жирнокислотного состава. - Минск: Межгосударственный совет по стандартизации, метрологии и сертификации. - 7 с.
23. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. В. 3 т. Т. 1 / М-во здравоохранения Рос. Федер. - 13-е изд. Режим доступа : [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_1/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_1/HTML/) . (Дата обращения 20.11.2015).
24. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс]. В. 3 т. Т. 2 / М-во здравоохранения Рос. Федер. - 13-е изд. - Режим доступа

- : [http://193.232.7.120/feml/clinical\\_ref/pharmacopoeia\\_2/HTML/](http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/). (Дата обращения 20.11.2015).
25. Государственная фармакопея СССР : Вып. 1. Общие методы анализа / МЗ СССР. – 11-е изд., доп. – Москва : Медицина, 1987. – 336 с., ил.
26. Деготь, А. В. Иридоиды семейства Норичниковых / А. В. Деготь, В. И. Литвиненко // Современные проблемы фармацевтической науки и практики – Киев, 1972. - С. 716 - 719.
27. Европейская Конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (Страсбург, 18 марта 1986 г.).
28. Жизнь растений том пятый часть вторая / под ред. А. Л. Тахтаджяна. – Москва: Просвещение, 1981. - С. 426.
29. Заявка 2009111168 Российская Федерация, МПК **G 01 N**. Унифицированный способ количественного определения суммы свободных аминокислот в лекарственном растительном сырье и экстракционных препаратах / Г. И. Олешко, Т. И. Ярыгина, Е. В. Зорина, М. Д. Решетникова; заявитель Перм. гос. фармац. акад. № 2009111168/15; опубл. 10.10.2010. - 2 с.
30. Идентификация лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов методом круговой хроматографии на бумаге: Методическое пособие для слушателей факультета дополнительного профессионального образования / Л. Г. Печерская, И. В. Штраубе, О. Л. Блинова, А. Б. Яковлев. – Пермь, 2002. - 24 с.
31. Иллюстрированный определитель растений Пермского края / С. А. Овеснов, Е. Г. Ефимин, Т. В. Козьминых [и др.]; под ред. д-ра биол. наук С. А. Овеснова. – Пермь: Книжный мир, 2007. – 743 с.: ил.
32. Иллюстрированный определитель растений средней России. Том 3: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И. А. Губанов, К. В. Киселева, В. С. Новиков, В. Н. Тихомиров. – Москва : Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2004. – 520 с. : ил.

33. Калинина, С. А. Фитохимическое изучение экстрактов коровяка черного и возможности их использования в медицине : дис. ... канд. фарм. наук 14.0402 // Калинина Светлана Александровна. – Пермь, 2013. – С. 17.
34. Калуев, А. В. Изучение тревожности у животных – вчера, сегодня, завтра / А. В. Калуев // Стресс и поведение: материалы 7-й междисциплинарной конф. по биологической психиатрии. - Москва, 2003. - С. 145 - 148.
35. Каминский, Л. С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных / Л. С. Каминский // Применение статистики в научной и практической работе врача. – Ленинград, 1964. – С. 156.
36. Карасек, Ф. Введение в хромато-масс-спектрометрию / Ф. Карасек, Р. Клемент. - Москва: Мир, 1993. – 237 с.: ил.
37. Каримова, С. Г. Биологические и биохимические особенности некоторых представителей семейства норичниковых (*Scrofulariaceae*) / С. Г. Каримова // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. - Уфа, 1974. – Вып. 4. – С. 89 – 105.
38. Каримова, С. Г. Биохимические особенности *M. гребенчатого* / С. Г. Каримова // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. – Казань, 1968. - Вып.2. - С. 111 – 125.
39. Каримова, С. Г. Гликозидная фракция марьянника гребенчатого и ее фармакологические свойства / С. Г. Каримова, Д. Н. Лазарева // Материалы совещ. по растительным ресурсам Южного Урала. – Уфа, 1963. - С. 11 - 13.
40. Каримова, С. Г. Действующие вещества марьянника лугового (*Melampyrum pratense*) и марьянника гребенчатого (*Melampyrum cristatum*) / С. Г. Каримова // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. - Уфа, 1961. - Вып. 1. - С. 137 – 142.
41. Каримова, С. Г. Интродукция некоторых норичниковых в Ботаническом саду Института биологии в Башкирии / С. Г. Каримова // Ресурсы и интродукция растений в Башкирии. – Уфа, 1983. - С. 63 – 70.
42. Киселева, О. А. Гемипаразитические растения семейства *Scrophulariaceae* Juss. : специализация вегетативных органов в связи с паразитизмом : автореф.

- дис. ... канд. биол. наук. 03.02.01 // Киселева Ольга Анатольевна. – Екатеринбург, 2013. – 22 с.
43. Кит, С. М. Влияние вытяжек некоторых растений Прикарпатья на процесс свертывания крови / С. М. Кит, Г. П. Кравчук // Фармац. журн. – 1979. - № 4. – С. 55 – 58.
44. Колла, В. Э. Поиск новых противосудорожных веществ: монография / В. Э. Колла, С. А. Шеленкова. – Пермь: Изд-во ГОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2006. – 192 с.
45. Кочикян, А. Т. Аминокислотный состав некоторых пищевых и лекарственных растений флоры Армении / А. Т. Кочикян, В. Т. Кочикян, А. В. Топчян // Медицинская наука Армении НАН РА. - 2011. - № 3. – С. 119 - 131.
46. Куркин, В. А. Фармакогнозия : учебник для студентов фарм. вузов (фак.) / В. А. Куркин ; Самарский гос. мед. ун-т; [ред. Т.И. Заболоцкая]. – 2-е изд., перераб. и доп. – Самара: Офорт, 2007. – 1239 с.: ил.
47. Лавренов, В. К. Современная энциклопедия лекарственных растений / В. К. Лавренов, Г. В. Лавренова. – Санкт-Петербург, Москва: Нева, 2006. - 272 с.
48. Лазарева, Д. Н. К фармакологии марьянника / Д. Н. Лазарева, Ф. С. Зарудий // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. – Уфа : Изд-во БФАН СССР, 1961. - Вып.1. - С. 28 – 33.
49. Лекарственные растения России: иллюстрированная энциклопедия. - Москва: Эксмо, 2006. – С. 77.
50. Мазнев, Н. И. Высокоэффективные лекарственные растения. Большая энциклопедия / Н. И. Мазнев. – Москва: Эксмо, 2012. – С. 319.
51. Мальцев, Г. И. Народная медицина коми-пермяков конца XIX- начала XX века: istoriko-ètnograficheskiĭ aspect / Г. И. Мальцев. – Кудымкар: Кудымкарская типография, 2004. – С. 234.
52. Марьянник – новое лекарственное растение / Е. В. Кучеров, С. Г. Каримова, Д. Н. Лазарева [и др.] // Вопросы рационального использования растительных ресурсов южного Урала. – Уфа, 1963. - С. 24 – 27.

53. Махлаюк, В. П. Лекарственные растения в народной медицине. Изд. 2-е / В. П. Махлаюк. – Саратов, Приволж. кн. изд., 1967. – 560 с.
54. Машкова, А. А. Биоморфологические особенности марьянника полевого (*Melampyrum arvense* L.) Оренбургского предуралья / А. А. Машков, Ю. А. Докучаева // Наука Красноярья. - 2012. - № 5 (05). - С. 32.
55. Меерсон, Ф. З. Защитные эффекты адаптации и некоторые перспективы развития адаптационной медицины / Ф. З. Меерсон // Успехи физиол. наук. - 1991. – Т. 22, № 2. – С. 52 – 89.
56. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических средств. Одобрены Фармакологическим государственным комитетом Минздрава России 25 декабря 1997 г. и утверждены Управлением государственного контроля лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России 29 декабря 1997 г.
57. Мнацаканян, В. А. Иридоидные гликозиды / В. А. Мнацаканян. – Ереван, 1986. – 187с.
58. Мягчилов, А. В. Флавоноиды растений *Fagopyrum sagittatum* Gillib. (гречихи посевной) и серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) (методы выделения, идентификация веществ, перспективы использования) [Текст]: дис... канд. биол. наук: 03.02.14 / Мягчилов Алексей Викторович. – Владивосток, 2014. – 153 с.
59. Насыров, Х. М. О нейротропном действии растений семейства Норичниковых / Х. М. Насыров, Ф. А. Зарудий // Современные проблемы фармакологии. – Киев, 1971. - С. 85 – 93.
60. Немершина, О. Н. Содержание микроэлементов и низкомолекулярных антиоксидантов в чае / О. Н. Немершина, Н. Ф. Гусев, А. В. Филиппова // Химия растительного сырья. - 2014. - № 2. - С. 155 – 168.
61. Немершина, О. Н. Химические элементы в растениях: Методическое пособие для студентов биологических и сельскохозяйственных специальностей / О. Н. Немершина, Н. Ф. Гусев. - Оренбург: Издательский центр ОГАУ, 2002. - 36 с.

62. Николаева, М. Г. Справочник по проращиванию покоящихся семян / М. Г. Николаева, М. В. Разумова, В. Н. Гладкова. – Ленинград, 1985. – 506 с.
63. Никонов, Г. К. Основы современной фитотерапии / Г. К. Никонов, Б. М. Майнулов. – Москва: Медицина, 2005. - 520 с.: ил.
64. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний / М. Я. Ловкова, Г. Н. Бузук, С. М. Соколова, Л. Н. Деревяго // Микроэлементы в медицине. - 2005. – № 6 (4). – С. 3 – 10.
65. О нейроплетическом действии марьянника / Д. Н. Лазарева, Г. Г. Максимов, Ф. С. Зарудий, Н. З. Изгина // Вопросы рационального использования растительных ресурсов Южного Урала. – Уфа, 1963. - С.29–31.
66. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ.
67. Об утверждении правил лабораторной практики: Приказ МЗСР Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н.
68. Овеснов, С. А. Конспект флоры Пермской области / С. А. Овеснов. – Пермь: Изд-во Перм. гос. ун-та, 1997. – 252 с.
69. Определение уровня тревожности у крыс в тестах «открытое поле», «крестообразный приподнятый лабиринт» и тесте Фогеля / С. К. Судаков, Г. А. Назарова, Е. В. Алексеева [и др.] // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. - 2013. - Т. 155, № 3. - С. 268 - 270.
70. Отинова, Е. В. Влияние экстрактов и флавоноидов марьянника лесного и марьянника лугового на свертывание крови / Е. В. Отинова, Е. Н. Скрыбина // Материалы 76-й Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием: молодежная наука и современность (19 – 20 апреля). Курск. - 2011. - С. 266.
71. Отчет по оценке корня валерианы лекарственной *Valeriana Officinalis* L. / докладчик К. Вернер; ЕМЕА/КПЛР/167391/2006. - Лондон, 2007. - 48 с.
72. Пат. 2222339 Российская Федерация, МПК А 61 К 35/00. А 61 Р 7/00, А 61 Р 9/00. Способ получения средства, обладающего гипотензивной и

- антикоагулянтной активностью / В. М. Петриченко, Е. Е. Галишевская, Б. Я. Сыропятов, О. В. Трошкова; заявитель и патентообладатель Перм. гос. фарм. акад. - № 2002108102/15; Заявл. 29.03.2002; Оpubл. 27.01.2004; Приор. 29.03.2002 (Россия), Бюлл. № 3. – 8 с.
- 73.Петриченко, В. М. Анатомо-морфологическое строение *Melampyrum pratense* L., произрастающего в Пермской области / В. М. Петриченко, В. Б. Марценюк, Е. Е. Галишевская. - Пермь: Перм. гос. фарм. акад., 2003. - 21 с.: ил. Деп. В ВИНТИ 15.05.2003, № 958.
- 74.Петриченко, В. М. Гипотензивная и антикоагулянтная активность растений семейства Норичниковые/ В. М. Петриченко, Б. Я. Сыропятов, Е. Н. Скрыбина // Научно-методическая конференция «Гаммермановские чтения – 2011»: сборник научных трудов. СПб.: Издательство СПХФА. - 2011. - С. 57 – 59.
- 75.Петриченко, В. М. Состав высших жирных кислот масла семян некоторых видов сем. Scrophulariaceae / В. М. Петриченко, Т. А. Разумовская // Растительные ресурсы. – 2004. - Т 40, вып. 3. – С. 49 - 55.
- 76.Петров, В. И. Современные направления исследований и клинического применения глутаматергических средств / В. И. Петров, Н. В. Онищенко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2002. – Т. 65, № 4. – С. 66 - 70.
- 77.Петров, В. И. Фармакологическая коррекция эмоционального стресса / В. И. Петров // Эмоциональный стресс: теоретические и клинические аспекты/ Под ред. К. В. Судакова, В. И. Петрова. – Волгоград: Волгоградская мед. академия, 1997. - 167 с. : ил.
- 78.Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных: Приказ МЗ СССР от 12 августа 1977 г. № 775.
- 79.Противосудорожное действие комплексного растительного средства «Нейрофит» / С. В. Цыремпилов, Ж. Б. Дашинамжилов, Я. Г. Разуваева, А. А. Гулевич // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. - № 3 (49). – С. 127 – 129.

80. Пшенникова, М. Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии / М. Г. Пшенникова // Пат. физиол. и экспериментальная терапия. - 2000. - № 2. - С. 24 – 31.
81. Рабинович, М. И. Влияние марьянника лугового на сердечно-сосудистую деятельность / М. И. Рабинович // 3-я Уральская конференция физиологов, биохимиков и фармакологов, посвящённая 40-летию Удмуртской АССР. - Ижевск, 1960. - С. 192 – 193.
82. Рабинович, М. И. К фармакологической характеристике некоторых лекарственных растений из семейства Норичниковых / М. И. Рабинович // Материалы IX Всесоюзной фармакологической конференции. - Свердловск, 1961. - С. 211 – 212.
83. Раевский, К. С. Медиаторные аминокислоты: нейрофармакологические и нейрхимические аспекты. Совместное издание СССР – НРБ / К. С. Раевский, В. П. Георгиев. - Москва: Медицина, 1986. - 239 с.
84. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование, сем-во *Caprifoliaceae – Plantaginaceae*. - Москва: Наука, 1990, - 328 с.
85. Родионова, Л. В. Физиологическая роль макро- и микроэлементов / Л. В. Родионова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2015. - № 6 (44). - С. 195 – 199.
86. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - Москва : Гриф и К, 2012. - С. 314 – 315.
87. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. члена-корреспондента РАМН, профессора Р. У. Хабриева. - 2-изд., перераб. и доп. - Москва: Медицина, 2005. - 832 с. : ил.
88. Самылина, И. А. Фармакогнозия. Атлас: учеб. пособие: в 2-х томах / И. А. Самылина, О. Г. Аносова. - Москва : ГЭОТАР-Медиа, 2007. - Т. 1. - 192 с.
89. Седативная активность экстрактов *Melampyrum sylvaticum* L. и *Melampyrum pratense* L. / А. В. Гребенкина, П. А. Левина, М. А. Федорова [и др.] //

- Современные научные исследования и инновации. – 2015, № 1 [Электронный ресурс]. URL: <http://web.snauka.ru/issues/2015/01/43029>.
- 90.Скрябина, Е. Н. Аминокислоты растений рода *Melampyrum* L. / Е. Н. Скрябина, Е. Е. Галишевская, В. Д. Белоногова // Медицинский альманах. – 2012, №5 (24). - С. 206 – 208.
- 91.Скрябина, Е. Н. Исследование химического состава марьянника лесного / Е. Н. Скрябина, Е. Е. Галишевская, В. Ф. Левинова // Вестник ПГФА: научно-практический журнал. Пермь. – 2010, №6. - С. 226 – 229.
- 92.Скрябина, Е. Н. Некоторые морфолого-анатомические особенности и состав жирных кислот масла семян четырех видов растений рода Марьянник (*Melampyrum* L.) / Е. Н. Скрябина, Е. Е. Галишевская, А. В. Агафонцева // Современные проблемы науки и образования. – 2012, 5; URL: [www.science-education.ru/105-7042](http://www.science-education.ru/105-7042).
- 93.Скрябина, Е. Н. Ресурсоведческая характеристика марьянника лесного в Вохомском районе Костромской области / Е. Н. Скрябина, Е. Е. Галишевская, В. Ф. Левинова // Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию Пермской государственной фармацевтической академии (7 – 9 декабря 2011 года, г. Пермь). Пермь. - 2011. - С. 242 – 245.
- 94.Скрябина, Е. Н. УФ-спектральная характеристика извлечений из травы марьянника лесного / Е. Н. Скрябина, Н. С. Тяпугина; руководители: проф. В. М. Петриченко, доц. Е. Е. Галишевская // Вестн. Перм. гос. фарм. акад.: науч.-практ. журн. – 2009. - № 5. – С. 193 – 195.
- 95.Сравнение психотропных свойств глутаминовой кислоты и ее нового производного – гидрохлорида бета-фенилглутаминовой кислоты (глутарона) / И. Н. Тюркенов, В. В. Багметов, Ю. В. Чернышева [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2013. - № 3. – С. 167 - 172.
- 96.Стрижов, А. Н. Русское разнотравье / А. Н. Стрижов. – Москва: О-во сохранения лит.наследия, 2007. – Т. 2. – С. 240 - 242.

- 97.Судаков, К. В. Новые акценты классической концепции стресса / К. В. Судаков // Бюл. эксперимент. биол. и медицины. – 1997. - № 2. – С. 124 – 130.
- 98.Судаков, К. В. Системные основы эмоционального стресса / К. В. Судаков, П. Е. Умрюхин. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. - 112 с.
- 99.Судачкова, Н. Е. Распределение аминокислот по структурным элементам дерева лиственницы Гмелина на криогенных почвах Средней Сибири / Н. Е. Судачкова, И. Л. Милютина, Г. П. Семенова // Лесоведение. - 2005. - № 5. – С. 32 - 40.
100. Усов, Л. А. Влияние шлемника байкальского на вегетативные ганглии / Л. А. Усов // Сборник научных работ молодых ученых ТМИ. – Томск, 1958. – С. 12 - 15.
101. Фармакологические свойства, химический состав и распространение некоторых растений из семейства Норичниковых произрастающих в Башкирии / С. Г. Каримова, Е. В. Кучеров, Х. М. Насыров [и др.] // Дикорастущие и интродуцируемые полезные растения в Башкирии. – Уфа, 1971. - Вып. 3. - С. 117 – 129.
102. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды / Г. М. Федосеева, В. М. Миревич, Е. Г. Горячкина [и др.] // Учебное пособие. – Иркутск, ИГМУ, 2009. – 67 с.
103. Флора СССР // Ред. тома Б. К. Шишкина, Е. Г. Бобров. – Москва; Ленинград: Академия наук СССР, 1955. - Т. XXII. – 540 с.
104. Хефтман, Э. Хроматография, практическое приложение метода, часть 2. / Э. Хефтман. – Москва: Мир, 1986. – 422 с.
105. Химический анализ биологически активных веществ лекарственного растительного сырья и продуктов животного происхождения: учебное пособие / М. Д. Решетникова, В. Ф. Левинова, А. В. Хлебников [и др.]; под ред. Г. И. Олешко. – 2-ое изд. (стереотипное). – Пермь, 2006. - 335 с.
106. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е. Я. Ладыгина, Л. Н. Сафронич, В. Э.

- Отряшенкова [и др.]; под ред. Н. И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. – Москва: Высшая школа, 1983. - 176 с.
107. Цвелев, Н. Н. Род Марьянник — *Melampyrum* L. / Н. Н. Цвелев // Флора европейской части СССР. - Ленинград: Наука, 1981. - С. 258 - 267.
108. Цимбалюк, З. М. Палиноморфологія видів роду *Melampyrum* L. (Orobanchaceae) флори України / З. М. Цимбалюк, С. Л. Мосякін // Український ботанічний журнал. – 2012. - Vol. 69, № 6. – С. 818.
109. Черепанов, С. К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР). Русское издание / С. К. Черепанов. – Санкт-Петербург: Мир и семья, 1995. – 992 с.
110. Чупарина, Е. В. Рентгенофлуоресцентный анализ лекарственных растений Восточной Сибири / Е. В. Чупарина, А. М. Мартынов, О. И. Жапова // Современные проблемы геохимии: материалы Всерос. совещ. (с участием иностр. ученых), посвящ. 95-летию со дня рождения акад. Л. В. Таусона (Иркутск, 22-26 окт. 2012 г.). - Иркутск, 2012. - Т. 1. - С. 282 - 283.
111. Щербакова, О. В. Влияние сухих экстрактов льнянки обыкновенной (*Linaria vulgaris* Mill.) на гемостаз / О. В. Щербакова, В. М. Петриченко, Б. Я. Сыропятов // Вестник ВГУ, серия: химия, биология, фармация. - 2011. - № 2. – С. 240 - 242.
112. Ядовитые растения лугов и пастбищ / Отв. ред. Б. К. Шишкин. – Москва; Ленинград, 1950. – 526 с.
113. Якубе, Х.-Д. Аминокислоты Пептиды Белки / Х.-Д. Якубе, Х. Ешкайт. – Москва : Мир, 1985. – 82 с.
114. Aharoni, R. Linkage between immunomodulation, neurogenesis / R. Aharoni, R. Arnon // Drug news Perspect. – 2009. - № 22. – P. 301-312.
115. Antimicrobial activity of *Melampyrum cristatum*, *Melampyrum bihariense* and *Melampyrum arvense* tincture / Melania F. Munteanu, Ramona Gligor, Ioan Crisnic [etc] // African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol. 6(40), 29 October, 2012. - P. 2808-2812.

116. Assessment report on *Valeriana officinalis* L., radix and *Valeriana officinalis* L., aetheroleum / EMA/HMPC/150846/2015.- London, 2016. – 67 p.
117. BioLib alphabetic index of Latin plant species names. [Online database]. - URL: <http://www.biolib.de/> (Accessed: September 20, 2014).
118. Bridel, M. Sur la presence d'un glucoside dedoublable par l'emulsine dans deux especes du genre *Melampyrum* / M. Bridel, M. Braecke // C. r. Acad. sci. - 1921. - Vol. 173. - P. 414 – 416.
119. Broome, A. The Search for Small Cow-wheat / A. Broome // Biotype. The Biodiversity & Conservation Newsletter of Woodland Ecology Branch. – 2003. - Number 24.
120. Cheffings, C. M. The Vascular Plant Red Data List for Great Britain / C. Cheffings, L. Farrell (Eds) // Species Status 7: 1-116. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough. - 2005.
121. Chih-Hsiung, Chen *Melampyrum roseum* Maxim. (Scrophulariaceae), a Newly Recorded Genus and Species in Taiwan / Chih-Hsiung Chen, Chiu-Mei Wang // Taiwania. - 2009. - № 54(2). – P. 183.
122. Crawley, J. N. Behavioral phenotyping strategies for mutant mice / J. N. Crawley // Neuron. - 2008. - Vol. 57. - P. 809 - 818.
123. Flora Europaea / edited by T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges [et al]. - Cambridge at the university press, 1972. - Vol. 3. - P. 256.
124. Floristic company "Flora Italiana". Famiglia: OROBANCHACEAE. [Online database]. - URL: <http://luirig.altervista.org/> (Accessed: September 20, 2014).
125. Gröger, G. Zur Kennins iridoider Plaflanzensteff / G. Gröger, P. Simchen // Die Pharmazie. – 1967. – Vol. 22, № 6. - P. 315.
126. Implementation of the modified-SHIRPA protocol for screening of dominant phenotypes in a large-scale ENU mutagenesis program / H. Masuya, M. Inoue, Yu. Wada [et al] // Mammalian Genome. - 2005. - Vol. 16. - P. 829 - 837.
127. Investigation of the use of *Melampyrum* Sp. Extract samples to assess metals contamination / M. Munteanu, C.A. Dehelean, D. Ionescu [et al] // Journal of agroalimentary Processes and technologies. – 2010. - 16(3), Romania.

128. Kaluyev, A. V. Stress and grooming / A. V. Kaluev. - Moscow: Aviks, 2002. 146 p.
129. Murganathan, G. Antimicrobial constituent from plants / G. Murganathan, Sathya Chethan Pabbithi // International research journal of pharmacy. - 2012. - # 3(1). - P. 5 - 7.
130. Sarah, E. Dalrymple Biological flora of the British Isles: *Melampyrum sylvaticum* L. / E. Sarah // Journal of Ecology. - 2007. - Vol. 95, Issue 3. - P. 583 - 597.
131. Tennant, D. J. Small Cow-wheat *Melampyrum sylvaticum* L.; Scrophulariaceae in England / D. J. Tennant // Watsonia. - 2008. - Vol. 27. - P. 23 - 26.
132. The herbal drug *Melampyrum pratense* L. (Koch): isolation and identification of its bioactive compounds targeting mediators of inflammation / S. Vogl, A.G. Atanasov, M. Bulusu [etc] // Evidence-Based Complementary and alternative medicine volume 2013 (2013), article ID 395316, 10 pages. [Online database]. - URL: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/395316/> (Accessed: May 20, 2014)/
133. Towards establishing dietary reference intakes for eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids / W. S. Harris, D. Mozaffarian, M. Lefevre [et al] // Journal of Nutrition. - 2009. - Vol. 139. P. 804 - 819.

# *Приложения*

## МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

\_\_\_\_\_  
" " \_\_\_\_\_ г.  
Ф.И.О.Марьянника лесного трава  
Melampyri silvatici herba

ФС 2.5.0000.00

Настоящая фармакопейная статья предприятия распространяется на марьянника траву «ангро» цельную и измельченную для приготовления лекарственных средств. Собранная в фазу цветения и начала плодоношения трава с корнями дикорастущего, однолетнего, травянистого растения марьянника лесного – *Melampyrum sylvaticum* L., сем. Норичниковые – *Scrophulariaceae*.

**Внешние признаки** (по методике ГФ XIII). *Цельное сырье*. Цельные или частично измельченные олиственные стебли, прямые или ветвистые, голые или в верхней части опушенные, корни тонкие, слабо ветвистые. Листья супротивные, сидячие или на коротких черешках, простые, без прилистников, нижние – яйцевидно-ланцетные, верхние – линейно-ланцетные, цельнокрайние, иногда в основании редко зубчатые, суженные в черешки, голые или рассеянно-волосистые. Соцветие редкая кисть, прицветники сходные по форме с листьями, цветки неправильные, на голых или опушенных цветоножках. Чашечка с трубкой длиной 3 мм и линейно-шиловидными или яйцевидно-ланцетными зубцами, венчик двугубый. Плод – одногнездная яйцевидная коробочка, раскрывающаяся двумя створками.

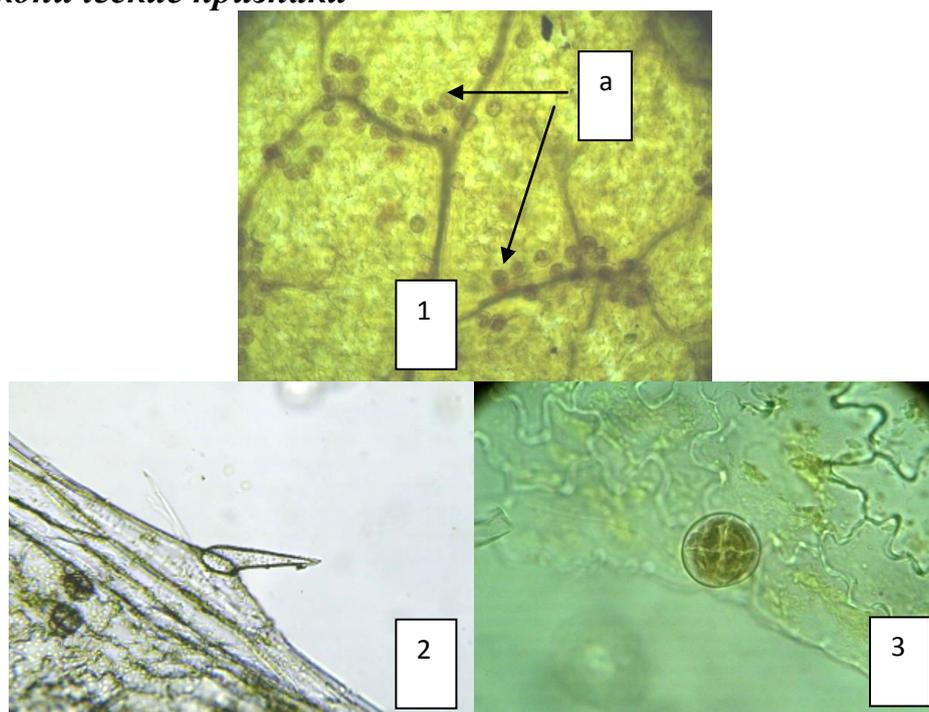
*Марьянник лесной* имеет прицветники цельнокрайние или с 1-2 короткими яйцевидно-ланцетными зубцами; цветоножка опушенная; доли чашечки слегка оттопырены, прямые, резко заостренные, равные по форме и размеру, заостренные, равны или превышают зрелую коробочку, чашечка опушенная;

венчик до 10 мм длиной с ярко-выраженным шлемом и широким зевом, нижняя губа сильно отклонена. Цвет венчика – желтый или золотисто-желтый. Плод – яйцевидная коробочка, резко заостренная. Семена темно-коричневые. Цвет стеблей, листьев и плодов – темно-зеленый или черный; венчик – белый с желтоватым оттенком или желтый.

Запах слабый, вкус водного извлечения горьковатый.

*Измельченное сырье.* Кусочки стеблей, листьев, корней, цветков, плодов, семян различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7мм. Цвет стеблей от коричневого-зеленого до черно-зеленый, листьев – от зеленого до черно-зеленого, цветков – от желтовато-белого до желтого, семян – от светлого-коричневого до темно-коричневого.

### ***Микроскопические признаки***



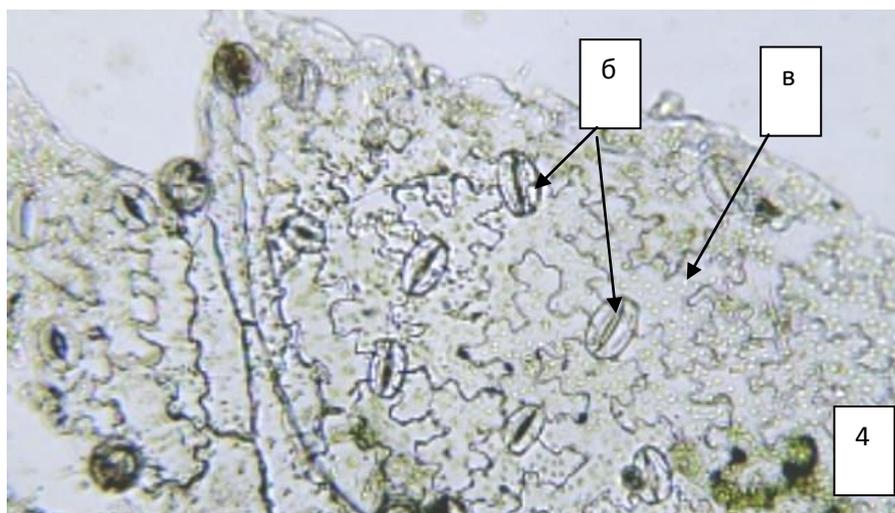


Рисунок – Марьянника трава (400х).

1 – верхняя сторона листа марьянника лесного: а – группы эфиромасличных железок; 2 – простой одноклеточный волосок; 3 – шаровидная железка из четырех клеток; 4 – нижняя эпидерма листа: б – устьица, в – извилистые стенки эпидермиса

## Определение основных групп биологически активных веществ

### *Тонкослойная хроматография*

#### *Приготовление растворов.*

*Раствор стандартного образца (СО) цинарозида.* Около 0.1 г цинарозида (лютеолин-7-гликозида) растворяют помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 85 мл спирта 70% и нагревают на водяной бане до полного растворения. Затем охлаждают и доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес

*Алюминия хлорида раствора 2% в спирте 96%.* 2.0 г алюминия хлорида растворяют в 100 мл спирта 96%. Срок годности раствора 3 мес.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с лиминисцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 x 15 см наносят 20 мкл испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение» приготовление раствора А испытуемого раствора) и 10 мкл раствора СО цинарозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение 2 часов смесью растворителей этилацетат – уксусная кислота – вода (10:4:1), и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет

около 80 – 90% длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей в вытяжном шкафу. Пластинку обрабатывают алюминия хлорида раствором 2% в спирте 96%, выдерживают в сушильном шкафу 4 – мин при 100 – 105 °С и просматривают в УФ-свете при длине волны 396 нм. На хроматограмме раствора СО цинарозида должна обнаруживаться зона желтого цвета. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона желтошо цвета на уровне зоны цинарозида; допускается обнаружение дополнительных зон.

### ИСПЫТАНИЯ

**Влажность.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 8%.

**Зола общая.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14%.

**Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3%.

**Измельченность сырья.** *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 1.5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0.2 мм не более 7%.

### Посторонние примеси.

**Стебли, в том числе отделенные при анализе.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13%.

**Органическая примесь.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 2%.

**Минеральная примесь.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0.5%.

**Тяжелые металлы.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Остаточные количества пестицидов.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

«УТВЕРЖДАЮ»

Ректор федерального государственного  
бюджетного образовательного учреждения  
высшего образования «Пермская  
государственная фармацевтическая  
академия», кандидат фармацевтических  
наук, доцент



Турышев Алексей Юрьевич

«15» января 2018г.

## АКТ ВНЕДРЕНИЯ

**Наименование разработки:** трава марьянника лесного и марьянника лугового, содержащие комплекс флавоноидов и обладающие седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью и низкой токсичностью.

**Место разработки:** государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники.

**Авторы разработки:** доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники, к.фарм.н. Галишевская Е.Е., ассистент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники Скрябина Е.Н.

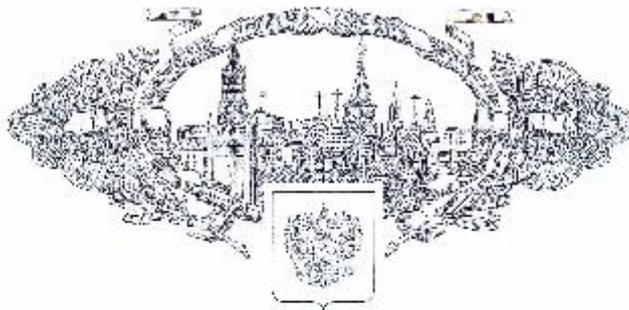
**Место внедрения:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия».

**Форма и эффективность внедрения:** в учебный процесс по дисциплине «Ботаника» (I, II курсы) внедрено морфолого-анатомическое исследование марьянника лесного, по дисциплине «Фармакогнозия» (III курсе) внедрены идентификация и диагностика морфологически близких видов марьянника лесного и марьянника лугового, содержащих комплекс флавоноидов и обладающие антикоагулянтной, седативной, противосудорожной и нейромодуляторной антиалкогольной активностью и низкой токсичностью, с использованием микроскопии и хроматографического анализа (круговая, бумажная, тонкослойная хроматография).

Заведующий кафедрой фармакогнозии  
с курсом ботаники,  
доктор фармацевтических наук,  
профессор

В.Д. Белоногова

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2613312

**СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ СРЕДСТВА, ОБЛАДАЮЩЕГО  
СЕДАТИВНОЙ, ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ И  
НЕЙРОМОДУЛЯТОРНОЙ АНТИАЛКОГОЛЬНОЙ  
АКТИВНОСТЬЮ**

Патент выдан в пользу: *Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Черемская государственная фармацевтическая академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ГБОУ ВПО ПФФА Минздрава России) (RU)*

Автор(s): *см. на обороте*

Заявка № 2014135591

Приоритет изобретения: **01 сентября 2014 г.**

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации: **15 марта 2017 г.**

Срок действия изобретения частного права

на изобретение истекает: **01 сентября 2034 г.**

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

*В.П. Филиппов* / В.П. Филиппов

