

## ИЗУЧЕНИЕ КОРЫ ЛИПЫ СЕРДЦЕЛИСТНОЙ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Орловская Т. В., Гюльбякова Х. Н., Гужва Н. Н., Огурцов Ю. А.

*Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: xristnik@yandex.ru*

Кора липы сердцелистной – перспективное сырье в качестве лекарственного средства. Целью данной работы является изучение морфолого-анатомических признаков и изучение биологически активных соединений коры липы сердцелистной. В результате исследования морфолого-анатомического строения коры липы сердцелистной выявлены основные диагностические признаки сырья. Установлены товароведческие показатели сырья. Наибольшее количество экстрактивных веществ извлекалось водой очищенной. В водном извлечении коры липы сердцелистной обнаружены: полисахариды, дубильные вещества конденсированной структуры, тритерпеновые сапонины, 35 биоэлементов, органические кислоты (аскорбиновая, яблочная, щавелевая, янтарная). В спиртоводных извлечениях (40 % и 70 %) обнаружены флавоноиды и фенолкарбоновые кислоты. Количественное содержание отдельных БАС в коре липы сердцелистной составило: полисахаридов – 2,17 % (в том числе: ВРПС – 9,25±0,07 %; ПВ – 10,00±0,04 %; ГЦА – 3,25±0,12 %; ГЦБ – 3,60±0,25 %); дубильных веществ в пересчете на танин – 7,42±0,81 %; флавоноидов в пересчете на рутин – 0,89±0,06 %; фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – 2,03±0,04 %; кислоты аскорбиновой – 0,18±0,03 %; органических кислот в пересчете на кислоту яблочную – 2,56±0,07 %. Исследовано влияние водного извлечения из коры липы сердцелистной на тонус гладкой мускулатуры интактной кишки и при моделировании ацетилхолинового спазма.

Ключевые слова: липа сердцелистная, кора, дубильные вещества, полисахариды, органические кислоты, сапонины, флавоноиды, микроэлементы, спазмолитическая активность.

## STUDYING THE TILIA CORDATA L. BARK WITH THE PURPOSE OF CREATION THE NEW MEDICINES

Orlovskaya T. V., Gulbjakova C. N., Gujva N. N., Ogurtcov Y. A.

*Pyatigorsk branch GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina, 11), e-mail: xristnik@yandex.ru*

*Tilia cordata cortex promising raw material as a drug funds. The aim of this work is to study the morphological and anatomical characteristics and study of biologically active compounds Tilia cordata cortex. A study of the morphological and anatomical structure identified key diagnostic features of raw materials. Indicators established merchandising materials. The greatest number of extractives were extracted with water purified. In aqueous extract lime bark serdtselystnoy found: polysaccharides, tannins, condensed structure, triterpene saponins, 35 bioelements, organic acids (ascorbic acid, malic acid, oxalic acid, succinic acid). In spirtovodnyh extracts (40 % and 70 %) were found flavonoids and phenol carbonic acid. The quantitative content of individual BAS linden bark serdtselystnoy was: polysaccharides – 2.17 % (including VRPS – 9,25 ± 0,07 %; PV – 10,00 ± 0,04 %; GTSA – 3,25 ± 0, 12 % GS – 3,60 ± 0,25 %); tannins in terms of tannin – 7,42 ± 0,81 %; flavonoids in terms of routine – 0,89 ± 0,06 %; phenol carbonic acids terms of chlorogenic acid – 2,03 ± 0,04 %; ascorbic acid – 0,18 ± 0,03 %; organic acids in terms of malic acid – 2,56 ± 0,07 %. The effect of the aqueous extract from the bark of Tilia cordata the tone of smooth muscles of the intestine intact and modeling acetylcholine spasm.*

Key words: *Tilia cordata L.*, cortex, tannins, polysaccharides, organic acids, saponins, flavonoids, minerals, spasmolytic activity.

### Введение

В последние годы в медицинскую практику все чаще стали внедряться лекарственные средства природного происхождения. Это связано с тем, что они по своим структурным особенностям близки к естественным метаболитам организма, нетоксичны и могут

применяться в течение длительного времени, не вызывая побочных явлений [3]. В работе отражены результаты некоторых исследований по изучению коры липы сердцелистной (*Tilia cordata* L.) семейства липовых (Tiliaceae), которая широко распространена на территории Европейской части России. В качестве лекарственного растительного сырья липы в Европейскую фармакопею включена кора [10], в отечественную фармакопею – цветки [1]. Однако отвар из коры липы сердцелистной широко применяется в народной медицине наружно: при ожогах, подагре, ревматизме, рожистых воспалениях, внутрь: при вздутии живота и диарее [5].

Необходимость изучения продиктована внедрением на российский фармацевтический рынок препаратов отечественного производства. Поэтому фитохимическое исследование, выделение групп биологически активных соединений (БАС) и стандартизация сырья являются актуальными.

**Цель работы:** выявить диагностические признаки коры липы сердцелистной; изучить кору липы сердцелистной на присутствие БАС; провести их количественный анализ; исследовать спазмолитическую активность извлечений из сырья.

**Материал и методика.** Материалом для исследований служила кора липы сердцелистной, собранная в пойме реки Лаба в Краснодарском крае в разное время вегетации. На предварительном этапе выявляли основные диагностические признаки сырья. Сырье предварительно замачивали в смеси 95 % спирта, глицерина и воды (1:1:1), готовили срезы, исследовали их с помощью микроскопа по общепринятым методикам [7].

Для предварительной идентификации БАС сырья были получены водные и спиртоводные извлечения (40 %, 70 %, 96 % растворы этанола).

Для получения извлечений 5,0 г (точная навеска) измельченной коры заливали экстрагентом и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Вытяжки сливали, фильтровали, операцию повторяли дважды. Извлечения, полученные после трехкратной экстракции, объединяли, упаривали до 25 мл, использовали для проведения качественных реакций по методикам ГФ XI и ГФ XII и расчета содержания экстрактивных веществ. Водные вытяжки использовали для определения углеводов соединений, дубильных веществ, сапонинов, органических кислот, спиртоводные – флавоноидов.

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

для ТСХ. Зоны адсорбции обнаруживали следующими способами: просматривали в УФ-свете и отмечали собственную флуоресценцию веществ; обрабатывали парами аммиака и просматривали в УФ-свете; просматривали в видимом и УФ-свете после обработки 5 % спиртовым раствором алюминия хлорида; обрабатывали 5 % спиртовым раствором натрия гидроксида и отмечали зоны адсорбции в видимом свете; обрабатывали 0,1 % водно-спиртовым раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия. Для обнаружения свободных органических кислот использовали метод ТСХ. Анализ проводили на пластинках «Силуфол УФ-366» в системе растворителей 95 % этанол: раствор аммиака (16:4,5). В качестве проявителя использовали раствор бромкрезолового синего. Содержание макро- и микроэлементов в коре липы сердцелистной определяли спектральным методом на базе испытательной лаборатории при ФГУП «Кавказгеолсъемка» (г. Ессентуки) по методике предприятия [8]. Пробу измельченного сырья массой 10,0 г (точная навеска) минерализовали методом сухого разложения в фарфоровых тиглях при температуре 450 °С до получения белой золы. Зольный остаток обрабатывали 5 мл смеси, состоящей из концентрированных азотной и серной кислот и воды (1:1:1) и выпаривали досуха. Остаток растворяли в 15 мл 1 % раствора азотной кислоты, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Атомно-адсорбционное определение проводили на спектрофотометре ДФС-8-1 при определенных аналитических параметрах. По методикам ГФ XI и ГФ XII определяли основные товароведческие показатели сырья. После качественного анализа сырья был проведен количественный анализ полисахаридов, дубильных веществ, флавоноидов, фенолкарбоновых и органических кислот. Выделение полисахаридов для количественного анализа проводили по методике Н. К. Кочеткова [4]. Очистку сырья от липофильных соединений осуществляли в аппарате Сокслета последовательно при помощи хлороформа и 95 % спирта. Трехкратную экстракцию полисахаридов проводили, используя соотношение сырья и экстрагента 1:20, на водяной бане с обратным холодильником по 30 мин. Полученные водные извлечения объединяли, сгущали под вакуумом, осаждали объемом 95 % спирта (1:2). Осадок отделяли центрифугированием, высушивали при 400 °С и взвешивали – получали водорастворимый полисахаридный комплекс (ВРПС). Шрот, полученный после ВРПС, заливали водой, прибавляли концентрированную хлористоводородную кислоту и экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтровали и осаждали 95 % спиртом в соотношении 1:2. Осадок отделяли центрифугированием, высушивали и взвешивали – получали пектиновые вещества (ПВ). Шрот после выделения ПВ экстрагировали 10 % раствором натрия гидроксида при

комнатной температуре в течение 12 часов. Извлечение фильтровали и осаждали 50 % раствором уксусной кислоты – отделяли осадок гемицеллюлозы А. В фильтрате, после отделения гемицеллюлозы А осаждали гемицеллюлозу Б 2-х кратным объемом 96 % спирта. Все полученные фракции высушивали и взвешивали. Для количественного определения дубильных веществ в водном извлечении из коры липы сердцелистной использовали метод перманганатометрии с индикатором индигосульфокислотой [1]. Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на кислоту хлорогеновую определяли спектрофотометрически при длине волны 325 нм. Наличие флавоноидов в сырье также подтверждали по УФ-спектрам спиртоводного извлечения из коры липы сердцелистной с 2 % раствором алюминия хлорида. При этом отмечен максимум поглощения при длине волны 420 нм, характерный для рутина. Для количественного определения суммы флавоноидов использовали метод дифференциальной спектрофотометрии [9].

Спазмолитическую активность водного извлечения из коры липы сердцелистной изучали на изолированном участке тонкого кишечника крысы [6]. Фрагмент кишечника помещали в камеру с физиологическим раствором Рингер – Локка и инкубировали в течение 10 минут. Сокращение кишки регистрировали с помощью фотоэлектрического датчика и отображали на ленте механографа. Для выявления эффекта извлечение вводили в физиологический раствор в концентрациях 0,1 %, 0,2 %, 0,3 %, 0,4 % и 0,5 %. Наиболее ярко выраженные изменения тонуса мускулатуры кишечника наступали при достижении концентрации 0,3 %, которая и была использована в дальнейших исследованиях. В первой серии исследовали влияние извлечения на тонус гладкой мускулатуры интактной кишки, во второй серии – на тонус гладкой мускулатуры при моделировании ацетилхолинового спазма. Оценку тонуса проводили в условных единицах. Интервал между нулевой точкой и точкой 100 единиц определялся пределами чувствительности прибора. Результаты обрабатывали статистически с применением критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Изучено анатомическое строение коры липы сердцелистной. Участки флоэмы пересечены поперек прослойками склеренхимы. Между участками флоэмы располагаются треугольники паренхимы, обращенные вершиной к камбию, а основанием к периферии. От вершины треугольника в древесину тянется сердцевинный луч. В ксилеме он представлен одним рядом клеток. Участки флоэмы, паренхима сердцевинных лучей и перициклическая зона составляют вместе вторичную кору. Кнаружи от нее начинается первичная кора. В состав первичной коры входят слабо выраженная эндодерма, паренхима и пластинчатая колленхима. Сверху стебель покрыт пробкой.

*Покровная ткань.* Самая наружная часть среза наиболее пигментирована. Только на тонких участках при большом увеличении хорошо видна клеточная структура.

*Первичная кора.* К нижней стороне пробки примыкает слой мелких клеток с утолщенными тангентальными стенками (пластинчатая колленхима). Под колленхимой лежит слой крупных клеток паренхимы первичной коры. В некоторых из них есть друзы. Эндодерма выражена слабо.

*Вторичная кора.* Наружный слой вторичной коры, расположенный под эндодермой, многослойный. Он состоит из чередующихся по кругу клеток склеренхимы и паренхимы. В толще вторичной коры заметны участки флоэмы. На поперечном срезе стебля они имеют форму трапеций, расширяющихся в сторону камбия и древесины и суженных к периферии. Горизонтальные прослойки слабо одревесневшей ткани состоят из плотно расположенных клеток склеренхимы – лубяных волокон (твердый луб). Между слоями лубяных волокон расположены остальные элементы флоэмы – мягкий луб. К мягкому лубу относят также паренхиму сердцевинных лучей. Ситовидные трубки коры липы имеют наклонные ситовидные пластинки. Рядом с ситовидными трубками находятся мелкие сопровождающие клетки с темным густым содержимым. Лубяная паренхима состоит из мелких клеток, также с густым содержимым. Эта паренхима располагается более или менее правильными рядами вокруг ситовидных трубок. Таким образом, были установлены следующие диагностические признаки: многорядный бурый пробковый слой, клетки которого неправильной формы (прямоугольной, квадратной, округлой в очертании); под пробкой располагается 3–4 ряда пластинчатой колленхимы; на границе первичной и вторичной коры одиночно или небольшими группами расположены лубяные волокна; участки флоэмы пересечены поперек прослойками склеренхимы; во вторичной коре редко расположены одно-, реже – двухрядные сердцевинные лучи; встречаются крупные каменные клетки желтого цвета; в паренхиме коры видны многочисленные друзы кальция оксалата.

Результаты определения величин влажности и экстрактивных веществ, полученных после экстракции коры липы сердцелистной различными растворителями, приведены в табл. 1, из данных которой следует, что наибольшее количество экстрактивных веществ извлекается водой очищенной.

Таблица 1. Товароведческие показатели коры липы сердцелистной

Наименование показателя	Значение показателя, %
влажность	12,97±0,21
зола общая	7,65±0,28
зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	0,45±0,18
экстрактивные вещества (вода очищенная)	13,41±0,35
экстрактивные вещества (40% этанол)	12,54±0,13

экстрактивные вещества (70% этанол)	11,84±0,38
экстрактивные вещества (95% этанол)	6,84±0,18

В водном извлечении коры липы сердцелистной были обнаружены: полисахариды, дубильные вещества конденсируемой структуры, тритерпеновые сапонины, органические кислоты (аскорбиновая, яблочная, янтарная, щавелевая). При изучении полисахаридов идентифицированы водорастворимые полисахариды; пектиновые вещества; гемицеллюлоза А и гемицеллюлоза Б. Установлено, что сырье и водное извлечение из него богато биологически активными макро-, микро- и ультрамикроэлементами (всего найдено более 30 биоэлементов). При этом наибольшее содержание приходится на фосфор, медь, цинк и марганец. В спиртоводных извлечениях были обнаружены флавоноиды (рутин, кверцетин), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая и галловая). Количественное содержание отдельных БАС в коре липы сердцелистной составило: полисахаридов – 2,17 % (в том числе: ВРПС – 9,25±0,07 %; ПВ – 10,00±0,04 %; ГЦА – 3,25±0,12%; ГЦБ – 3,60±0,25 %); дубильных веществ в пересчете на танин – 7,42±0,81 %; флавоноидов в пересчете на рутин – 0,89±0,06 %; фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – 2,03±0,04 %; кислоты аскорбиновой – 0,18±0,03 %; органических кислот в пересчете на кислоту яблочную – 2,56±0,07 %.

Результаты изучения спазмолитической активности водного извлечения из коры липы сердцелистной представлены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние водного извлечения коры липы сердцелистной на тонус гладкой мускулатуры интактного и спазмированного кишечника

Серия опыта	Исходный тонус (усл. ед.)		Тонус после введения извлечения (усл. ед.)	Р
	Тонический уровень	Спазмированный кишечник		
Интактный кишечник	54,7±2,5	–	33,4±3,1	<0,001
Ацетилхолиновый спазм	48,8±1,7	87,2±3,4	51,9±3,1	<0,001

Из представленных данных следует, что водное извлечение из коры липы сердцелистной снижает тонус интактной кишки в среднем на 39 % и практически полностью снимает спазм, вызванный ацетилхолином.

**Выводы.** Данные проведенных исследований определяют перспективность дальнейшего изучения и рекомендации использования водного извлечения из коры липы сердцелистной в качестве потенциального спазмолитического средства.

### Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР XI изд. – М.: Медицина, 1989. – Вып.2. – 336 с.

2. Гужва Н. Н. Биологически активные вещества астрагала эспарцетного, произрастающего в Предкавказье // Химия растит. сырья. – 2009. – № 3. – С. 123-132.
3. Гюльбякова Х. Н. Разработка методик анализа и норм качества новых лекарственных препаратов на основе «бишофита энтерального»: Автореф. дис... канд. фармацевт. наук. – Пятигорск, 2002. – 22 с.
4. Гюльбякова Х. Н., Тираспольская С. Г., Алфимова Г. В. и др. Изучение травы белокудренника черного с целью создания новых лекарственных средств // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (3). – С.727-730.
5. Кьосев П. А. Полный справочник лекарственных растений. – М.: ЭКСМО-Пресс, 2000. – 992 с.
6. Овчинникова С. Я., Орловская Т. В. Изучение спазмолитической активности экстракта корневищ и корней любистока лекарственного // Научные ведомости Белгородского гос. университета. Серия Медицина. Фармация. – 2012. – № 4 (123). – Вып. 17/1. – С. 275-277.
7. Орловская Т. В., Маширова С. Ю. Морфолого-анатомическое изучение семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) и чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.) // Традиционная медицина. – 2012. – № 3. – С. 54-57.
8. Орловская, Т. В. Изучение аминокислотного состава семян клоповника посевного / Т. В. Орловская // Дальневосточный мед. журн. – 2006. – № 2. – С. 73-74.
9. Рожнова С. А., Компанцева Е. В., Гюльбякова Х. Н. и др. Перспектива создания жидкого экстракта из цветков бузины черной, произрастающей на Северном Кавказе // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения (III; 1999; СПб. – Пушкин): материалы... – СПб.; Пушкин, 1999. – С.70-72.
10. European Pharmacopoeia, 6<sup>th</sup> edition, 2008 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.edgm.eu>. (дата обращения: 25.12.12).

**Рецензенты:**

Лазарян Д. С., д.фарм.н., профессор, заведующий кафедрой токсикологической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г. Пятигорск.

Вергейчик Е. Н., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии Пятигорского филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ МЗ РФ, г. Пятигорск.