

УДК 615.32 + 582.669.2

КАЧЕСТВЕННОЕ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭКДИСТЕРОИДОВ И ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ТРАВЫ УШАНКИ МЕЛКОЦВЕТКОВОЙ (OTITES PARVIFLORUS GROSSH.)

**Дармограй В.Н., Ерофеева Н.С., Дармограй С.В., Филиппова А.С.,
Морозова В.А., Дубоделова Г.В.**

*ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Рязань, e-mail: rzgmu@rzgmu.ru*

Изучен химический состав ушанки мелкоцветковой (*Otites parviflorus* Grossh.) на наличие полифенольных и стероидных соединений. В результате исследования травы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) идентифицировано 14 соединений полифенольной природы и 2 экдистероида (экдистерон, полипидин В). Исследовано актопротекторное действие экдистерона и водно-спиртового извлечения из травы ушанки мелкоцветковой, выраженный актопротекторный эффект экдистерона и водно-спиртового извлечения сопоставимы.

Ключевые слова: ВЭЖХ, полифенольные соединения, виченин, экдистерон, полипидин В, ушанка мелкоцветковая (*Otites parviflorus* Grossh.), актопротекторное действие

QUALITATIVE AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYPHENOLIC AND ECDYSTEROID COMPOUNDS FROM EARFLAPS (OTITES PARVIFLORUS GROSSH.)

**Darmogray V.N., Erofeeva N.S., Darmogray S.V., Filippova A.S.,
Morozova V.A., Dubodelova G.V.**

I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, e-mail: rzgmu@rzgmu.ru

The chemical composition of the earflaps (*Otites parviflorus* Grossh.) polyphenolic and steroid compounds was studied. As a result of examination of the sample by high performance liquid chromatography (HPLC) identified 14 compounds of polyphenol nature and 2 ecdysteroid substances (ecdysterone, polipodin B). Actoprotective effect of ecdysterone and aqueous-alcoholic extract of the herb *Otites parviflorus* was studied in the article, and their actoprotective effect were close in value.

Keywords: HPLC, polyphenolic compounds, ecdysterone, polipodin B, vichenin, *Otites parviflorus*, actoprotective effect

Интерес к использованию фитоэкдистероидов, как адаптогенов растительного происхождения, с годами не только не снижается, а только возрастает. Адаптогены – это вещества, способствующие приспособлению, адаптации. Биорегуляторы в форме фитоэкдистероидов способствуют включению синтоксических программ адаптации с параводом клеточного метаболизма на более низкий уровень, определяющий экономичность обменных процессов, создавая условия для одновременного протекания анаэробного и аэробного окисления. Включение синтоксических адаптивных программ позволяет организму сопереживать с раздражителями внешней и внутренней среды путём активации холинореактивных структур гипоталамуса с дальнейшей активацией антиоксидантных и противосвёртывающих механизмов крови и явлениями иммуносупрессии. Недостаточное выделение синтоксинов в организме животных (АМФГФ, ТБГ и др.) сопровождается соответствующими патологическими процессами или к доминирова-

нию кататоксических программ адаптации, также оказывающих негативное влияние на организм, а введение синтоксинов нормализует баланс программ адаптации и способствует нормализации всех процессов и возрастанию жизнеспособности организма в целом (5). В ходе научных экспериментов постоянно расширяется спектр положительного воздействия экдистероидов на организмы теплокровных.

Экдистероиды – это группа липофильных полигидроксилированных стероидов, участвующих в обмене веществ практически всех организмов (8). У насекомых они являются гормонами линьки, у человека – регулируют множество функций и оказывают различные эффекты: анаболический, ранозаживляющий, ноотропный, гипогликемический, иммуномодулирующий и др. (6). Важным представителем экдистероидов является экдистерон, обладающий основными эффектами, присущими данному классу соединений, и достаточно широко распространенный в растениях центральной поло-

сы России. Например, экистерон обладает выраженным актопротекторным эффектом, также отмечено его антигипоксическое и антиишемическое действие (7), позволяет добиться стихания воспалительного процесса в более ранние сроки по сравнению с традиционным лечением нагноительных заболеваний лёгких и плевры (3). Экистероиды обнаружены у представителей более 100 семейств покрытосеменных растений, но лишь немногие виды экистероидсодержащих растений пригодны в качестве сырья для получения фитоэкистероидов (1).

Цель исследования – проанализировать химический состав ушанки мелкоцветковой (*Otites parviflorus* Grossh.) семейства гвоздичных (*Caryophyllaceae* Juss.) на наличие полифенольных и стероидных соединений, изучить актопротекторную активность экстракта ушанки мелкоцветковой как экистероидсодержащего растения в сравнении с действием экистерона.

Материалы и методы исследования

Сбор растений ушанки мелкоцветковой (*Otites parviflorus* Grossh.) семейства гвоздичных (*Caryophyllaceae* Juss.) в фазе цветения производили в Рязанской области (окрестности с. Заборье, на песках, Рязанский район), сушку сырья осуществляли воздушно-теневым способом.

Изучение качественного состава полифенольных и стероидных соединений проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSON», модель 305, ФРАНЦИЯ; инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 USA, с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для «Windows».

В качестве неподвижной фазы была использована металлическая колонка размером 4,6х250 мм KROMASIL C18, размер частиц 5 микрон.

В качестве подвижной фазы – метанол: вода: фосфорная кислота (400:600:5). Анализ проводили при комнатной температуре. Скорость подачи элюента 0,8 мл/мин. Продолжительность анализа 60 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «GILSON» UV/VIS модель 151, при длине волны 254 нм.

Для исследования сырьё измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм по (ГОСТ 214-83). Около 3,0 г лекарственного сырья помещали в колбу вместимостью 150 мл, прибавляли по 20 мл спирта этилового 70%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объёмом 25 мл и доводили спиртом этиловым 70% до метки (исследуемый раствор).

Параллельно готовили серию 0,05% растворов сравнения в 70% спирте этиловом: рутина, кверцетина, лютеолина, лютеолин-7-гликозида, галловой кислоты, кофейной кислоты, хлорогеновой кислоты, гиперозида, гесперидина, апигенина, кемпферола, феруловой кислоты, цикориевой кислоты, умбеллиферона, диги-

дрокумарина, скополетина, эскулетин, кумарина, дигидрокверцетина, катехина, эпикатехина, эпигаллокатехингаллата (ЭПГКГ), экистерона, вицинина, полиподина В. По 20 мкл исследуемых растворов и растворов сравнения вводили в хроматограф и хроматографировали в вышеприведенных условиях.

Для количественного определения вицинина, полиподина В, экистерона в траве ушанки мелкоцветковой методом ВЭЖХ сырьё измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм по ГОСТ 214-83. Около 3,0 г лекарственного сырья помещали в колбу вместимостью 150 мл, прибавляли по 20 мл спирта этилового 70%, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания спиртоводной смеси в колбе. После охлаждения смесь фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объёмом 25 мл и доводили спиртом этиловым 70% до метки (исследуемый раствор). Параллельно готовили растворы РСО вицинина, полиподина В в 70% спирте этиловом. Для этого около 0,020 г (точная навеска) вицинина, полиподина помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 20 мл спирта этилового 70%, перемешивали до растворения и доводили объём до метки тем же растворителем. (PCO). По 20 мкл исследуемого раствора и растворов РСО вводили в хроматограф и хроматографировали по вышеприведенной методике.

Расчёт количественного содержания вицинина, полиподина В, экистерона производили методом абсолютной калибровки с помощью компьютерной программы «Мультихром» для «Windows» и с помощью формулы

$$X\% = \frac{S_{\text{ис}} \times C \times V \times 100 \times 100 \times P}{S_{\text{ст}} \times a \times 1(100 - W) \times 100},$$

где $S_{\text{ис}}$ – площадь пика вицинина, полиподина В или экистерона в исследуемом растворе; $S_{\text{ст}}$ – площадь пика стандартного раствора (PCO) вицинина или полиподина В; $X\%$ – концентрация вицинина или полиподина В в%; C – концентрация РСО вицинина или полиподина В в г/мл; a – навеска исследуемого образца; W – потери в массе при высушивании в%; P – чистота стандартов вицинина, полиподина В или экистерона.

Актопротекторное действие изучалось на 24 беспородных белых крысах самцах средней массой 230 ± 20 г. Все животные были разделены на 4 серии. 1 серия – контроль – животные ($n = 8$), которым вводили воду очищенную, 2 серия – контроль препарата – животные ($n = 8$), которым вводили экистерон (0,1% раствор экистерона, выделенный из смолёвки поникшей (*Silene nutans* L.) и смолёвки татарской (*Silene tatarica* (L.) Pers.), 3 серия – введение животным ($n = 8$) экстракта из – ушанки мелкоцветковой (*Otites parviflorus* Grossh.) семейства гвоздичных (*Caryophyllaceae* Juss.). Изучаемые вещества вводили per os 1 раз в день из расчета 5 мл/кг массы в течение 15 дней.

Перед началом эксперимента, на 5, 10 и 15 день исследования у крыс определяли физическую работоспособность. Её оценивали по времени плавания в ёмкости с водой при $t 21^\circ\text{C}$ с грузом весом 15% от массы тела у корня хвоста, до полного утопления, критерием которого служило 10-секундное погружение животного под воду (2,4). Фиксировали время первого плавания и время второго плавания (после 60-минутного отдыха), а затем также рассчитывали и общее время плавания.

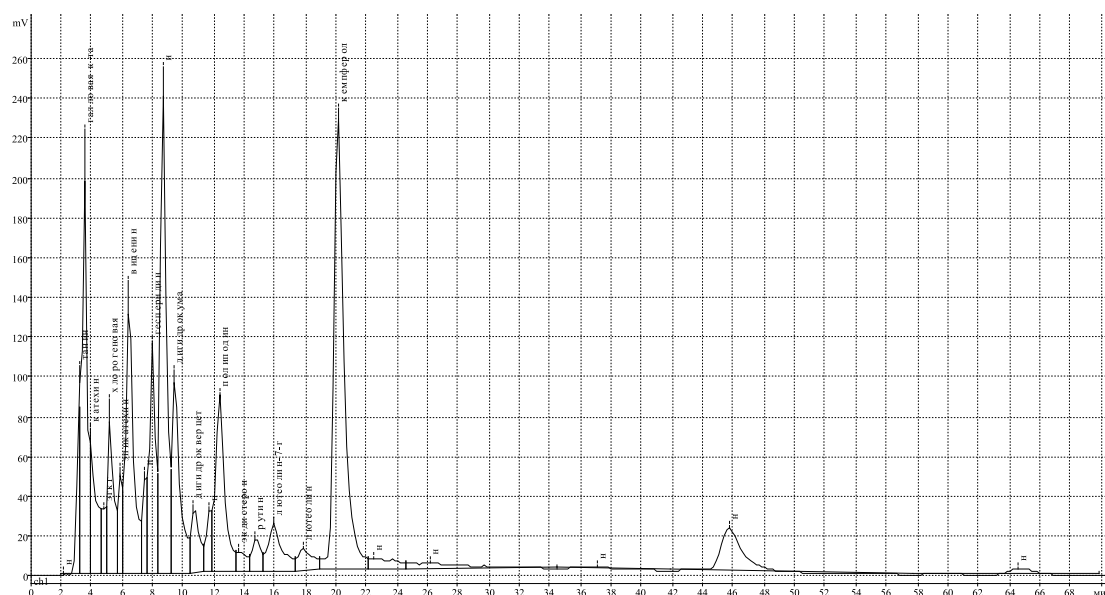


Рис. 1. Хроматограмма ВЭЖХ водно-спиртового извлечения
(детектирование при длине волны 254 нм)

Таблица 1

Результаты идентификации некоторых полифенольных и стероидных соединений ушанки мелкоцветковой (водно-спиртовое извлечение, детектирование 254 нм)

№ п/п	Время, мин	Высота, mV	Площадь, mV*сек	ФО	Конц. %	Название соединения
1	2,199	1,61	27,16	1,000	0,05	н
2	3,13	104,29	1548,77	1,000	2,72	танин
3	3,49	223,44	4378,49	1,000	7,69	галловая кислота
4	3,93	72,98	2107,85	1,000	3,70	катехин
5	4,755	33,73	412,56	1,000	0,72	эпгкг
6	5,16	87,59	2221,23	1,000	93,90	хлорогеновая кислота
7	5,866	53,20	1123,67	1,000	1,97	эпикатехин
8	6,42	147,30	4771,34	1,000	8,37	виценин
9	7,473	51,18	1057,37	1,000	1,86	н
10	7,926	117,03	2964,13	1,000	5,20	гесперидин
11	8,587	253,93	7017,13	1,000	12,32	н
12	9,4	102,05	3575,02	1,000	6,28	дигидрокумарин
13	10,66	34,01	1328,23	1,000	2,33	дигидрокверцетин
14	11,71	33,00	844,17	1,000	1,48	н
15	12,32	90,44	3850,82	1,000	6,76	полипидин В
16	13,66	11,08	469,62	1,000	0,82	экдистерон
17	14,7	17,24	755,47	1,000	1,33	рутин
18	18,88	24,90	1630,67	1,000	2,86	лютеолин-7-гликозид
19	17,79	11,73	890,85	1,000	1,56	лютеолин
20	20,05	231,56	10936,14	1,000	19,20	кемпферол
21	22,32	6,76	806,67	1,000	1,42	н
22	26,17	4,01	1072,25	1,000	1,88	н
23	37,01	1,12	201,64	1,000	0,35	н
24	45,63	21,84	2431,06	1,000	4,27	н
25	64,6	3,60	549,67	1,000	0,96	н
25	70,51	1739,63	5671,98	0,050	100,00	

Полученные результаты обрабатывали статистически с использованием программы «Statistica 7.0», при этом рассчитывали медиану и верхний и нижний квартили. Различия между сериями оценивали с помощью критерия Манна-Уитни, а различия внутри серий – с помощью критерия Вилкоксона. За уровень достоверности принята достоверность различий 95,0% ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

Приводим результаты ВЭЖХ-исследований некоторых полифенольных и стероидных соединений ушанки мелкоцветковой.

Ряд пиков остался неидентифицированным, что даёт повод продолжить изучение качественного состава травы ушанки мелкоцветковой.

Идентифицировано 14 полифенольных (танин, галловая кислота, катехин, эпигаллокатехингаллат, хлорогеновая кислота, эпикатехин, виценин, гесперидин, дигидрокумарин, дигидрокверцетин, рутин, лютеолин-7-гликозид, лютеолин, кемпферол) и 2 стероидных (экдистерон, полипидин В) соединений.

Таблица 2

Результаты количественного определения виценина, полипидина В и экдистерона в траве ушанки мелкоцветковой

виценин, %	полипидин В, %	экдистерон, %
0,72	0,15	0,02

При анализе актопротекторного действия выяснено, что введение экспериментальным животным воды очищенной в течение 15 дней достоверно не влияло на время 1 плавания. Введение экдистерона (препарата сравнения) увеличивало

время плавания животных с грузом через 10 дней введения на 6,8% ($p < 0,05$), а через 15 дней – 19,2% ($p < 0,05$). Применение водной вытяжки из ушанки приводило к повышению времени первого плавания на 10-й день исследования на 18,1% ($p = 0,05$), а, на 15-й день опыта – на 45,1 ($p < 0,05$). На 15-й день эксперимента время плавания животных, получавших ушанку, превышало показатели контроля на 49,3 ($p < 0,05$).

У контрольных животных на 10-й день эксперимента происходило повышение времени второго плавания на 10,6% ($p < 0,05$), на 15-й день – на 29,1% ($p < 0,05$). Введение экдистерона (препарата сравнения) увеличивало время плавания животных с грузом через 5 дней на 16,4% ($p < 0,05$), через 10 дней – на 23,9% ($p < 0,05$). Однако время плавания животных, получавших экдистерон, было меньше показателей контроля на 15,9% ($p < 0,05$). Применение водной вытяжки из ушанки приводило к повышению времени второго плавания на 15-й день исследования на 20,0% ($p < 0,05$).

Влияние изучаемых веществ на суммарное время плавания представлено в табл. 3. У контрольных животных происходило повышение общего времени плавания – на 10,4% ($p < 0,05$) только на 15-й день эксперимента. Введение экдистерона (препарата сравнения) увеличивало время плавания животных с грузом через 10 дней на 16,3% ($p < 0,05$), а через 15 дней – на 21,3% ($p < 0,05$). Применение водной вытяжки из ушанки приводило к повышению времени второго плавания на 5-й день эксперимента на 9,9% ($p < 0,05$), на 10-й день – 16,2% ($p = 0,05$), на 15-й день – на 31,0% ($p < 0,05$).

Таблица 3

Показатели общей физической работоспособности крыс при введении экдистерона и экстракта из ушанки мелкоцветковой (суммарный показатель двойного плавания)

Серии эксперимента \ Сроки определения, продолжительность плавания, с	Исходные данные, 1 день	5 дней	10 дней	15 дней
Вода очищенная	139,0 (128,0; 147,0)	145,5 (129,0; 162,5)	142,0 (128,0; 187,0)	153,5 (142,0; 178,0)*
Экдистерон	141,0 (138,0; 148,0)	145,0 (139,0; 168,0)	164,0 (158,0; 175,0)*	171,0 (159,0; 172,0)*
Ушанка	142,0 (136,0; 149,0)	156,0 (150,0; 194,0)*	165,0 (154,0; 195,0)*	186,0 (171,0; 199,0)*

Примечание. * – $p < 0,05$ – достоверные различия с исходными данными.

Выводы

1. В траве ушанки мелкоцветковой (*Otites parviflorus* Grossh.) семейства гвоздичные (*Caryophyllaceae* Juss.) нами идентифицировано 14 полифенольных соединений, 2 экидистероида (экидистерон и полиподин В).

2. Определено количественное содержание экидистерона, полиподина В и виценина в траве ушанки мелкоцветковой, оно соответственно равно 0,02%, 0,15%, 0,72%.

3. Экстракт из ушанки мелкоцветковой при введении *per os* в количестве 5 мл/кг массы обладает выраженным актопротекторным действием, превосходящим эффект экидистерона.

Список литературы

1. Володина С.О. Ресурсы, биотехнология и использование экидистероидсодержащих растений // Известия Самарского научного центра РАН. – 2010. – Т. 12, № 1(3). – С. 668–674.

2. Ласкова И.Л., Утешев Б.С. Иммуномодулирующее действие энергизирующих препаратов при физических нагрузках // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1995. – № 2. – С. 44–47.

3. Михеев А.В., Игнатов И.С. Опыт применения экидистеронидов в лечении нагноительных заболеваний лёгких и плевры // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2013. – № 3. – С. 27–33.

4. Молодавкин Г.М., Воронина Т.А., Мдзинаришили А.Л. Особенности влияния фармакологических веществ разных классов на вынужденное плавание у крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1994. – № 1. – С. 3–5.

5. Морозов В.Н. Фитозэкидистероиды (естественные синтоксины), как модуляторы адаптивных программ организма при действии раздражителей внешней и внутренней среды. – Тула, 2006. – С. 51.

6. Сыров В.Н. Фитозэкидистероиды: биологические эффекты в организме высших животных и перспективы использования в медицине // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1994. – № 5. – С. 61–66.

7. Щулькин А.В. Изучение антигипоксического и антиишемического эффектов фитозэкидистерона // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2011. – № 3. – С. 30–36.

8. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update // J. Insect. Sci. – 2003. – Vol. 3, № 7. – P. 1–30.