

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ЛИСТЬЕВ ЧЕРНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ

Олег Н. Кошевой, Андрей Л. Загайко, Илья А. Колычев,
Эльшан Ю. Ахмедов, Андрей Н. Комиссаренко
Национальный фармацевтический университет, Украина

Ключевые слова: черника обыкновенная, экстракт, фенольные соединения, гипогликемическая активность

В медицинской и фармацевтической практике широко применяются препараты на основе плодов черники (*Fructus Myrtilli*). Отвар из плодов черники применяют, как вяжущее средство при колитах, энтероколитах и диарее. Кроме того, на фармацевтическом рынке Украины представлены такие препараты, как Стрикс, Оптикс, Визио Баланс, Черника Форте и др., содержащие биологически активные вещества (БАВ) плодов черники, и которые применяются при заболеваниях глаз [1].

В народной и научной медицине побеги, листья черники применяют как гипогликемическое средство, в виде отвара, и сырьё входят в состав сборов Арфазетин и Мирфазин с сахароснижающим действием [1]. Однако на рынке Украины нет ни одного стандартизированного лекарственного средства на основе экстрактов из этого сырья. Учитывая широкое распространение сахарного диабета в Украине и мире, целесообразно создать новое лекарственное средство с гипогликемической активностью на основе БАВ листьев черники обыкновенной.

Ранее нами было показано, что оптимальным экстрагентом БАВ из листьев черники обыкновенной, в частности фенольных соединений, является этанол в концентрации 50-70 % [2]. Поэтому, целью наших дальнейших исследований было изучить химический состав и гипогликемическую активность сухого экстракта из листьев черники, полученного 50 % этанолом.

Материалы и методы

0,5 кг листьев черники обыкновенной, измельченных до размера частиц 1-2 мм, помещали в колбу, заливали 1,5 л 50 % этанола, экстрагировали в течение суток при комнатной температуре. Экстракцию повторяли трижды с новыми порциями экстрагента (1,0 л). Полученные извлечения объединяли, отстаивали в течение суток, от-

фильтровывали. Фильтрат упаривали с помощью ротационного вакуум-испарительного аппарата до сухого экстракта.

Для предварительной идентификации БАВ экстракта использовали общепринятые методы исследований – качественные реакции, бумажную (БХ) и тонкослойную хроматографии (ТСХ).

Вещества флавоноидной природы исследовали методом ТСХ с достоверными образцами флавоноидов в системе растворителей кислота уксусная ледяная – вода – этилацетат (20:20:60). Проявление хроматограмм проводили раствором *n*-диметиламинобензальдегида, после чего пластинку нагревали при температуре 100-105 °С в течение 10 мин до проявления пятен и просматривали в дневном свете [3, 4].

Для определения гидроксикоричных кислот использовали метод двумерной БХ в системах: I – *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4: 1: 2) и II – 15 % уксусная кислота. Проявление хроматограмм проводили парами аммиака и диазореактивом [3, 4].

Для гидролиза 300 мкл 4 % спиртового раствора сухого экстракта из листьев черники обыкновенной помещали в вials на 2 мл, добавляли 300 мкл раствора 6N соляной кислоты в этаноле (1:1 по объему). Герметично закрытую вial выдерживали в термошкафе при 100 °С в течение 1 часа. После охлаждения содержимое вials центрифугировали и переносили в вial для анализа.

Изучение качественного состава и количественного содержания фенольных соединений в сухом экстракте из листьев черники обыкновенной, до и после гидролиза, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью хроматографа Agilent Technologies (модель 1100), который укомплектован проточным вакуумным дегазатором G1379A, четырехканальным насосом градиента низкого давления G13111A, автоматическим

инжектором G1313A, термостатом колонок G13116A и диодно-матричным детектором G1316A. Для проведения анализа была использована хроматографическая колонка размером $2,1 \times 150$ мм, которая была заполнена октадецилсилильным сорбентом зернистостью 3,5 мкм «ZORBAX-SB C-18». Анализ проводили при следующих условиях: температура термостата – 35 °С; скорость потока подвижной фазы – 0,25 мл/мин; как подвижную фазу использовали раствор А (0,1% H_3PO_4 , 180 мкл/л триэтиламин, 3 мл/л тетрагидрофуран в воде) и раствор В (MeOH) в соотношении 90:10 (первые 8 мин), 70:30 (с 8 по 24 мин), а с 24 мин использовали только раствор В; рабочее давление элюента – 240-300 кПа. При анализе были такие параметры детектирования: масштаб измерения – 1,0; время сканирования – 0,5 с; параметры снятия спектра – каждый пик 190–600 нм. Идентификацию фенольных соединений проводили по времени удерживания стандартов гидроксикоричных кислот и флавоноидов и их спектральным характеристикам [5].

Изучение качественного состава и количественного содержания моносахаридов в сухом экстракте из листьев черники обыкновенной, до и после гидролиза, проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с помощью хроматографа Agilent Technologies (модель 1100). Для проведения анализа была использована карбогидратная хроматографическая колонка размером $7,8 \times 300$ мм «Supelcogel-S610H». Для проведения анализа устанавливали следующий режим хроматографирования: скорость подачи подвижной фазы 0,5 мл/мин; элюент водный 0,1% раствор H_3PO_4 ; рабочее давление элюента 33-36 кПа; температура термостата колонки 30 °С; объем пробы 5 мкл. Детектирование проводили рефрактометрическим методом. Идентификацию сахаров производили по времени удерживания стандартов.

Количественное определение суммы фенольных соединений, производных гидроксикоричных кислот и флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Spocol 1500 (Швейцария). Содержание производных гидроксикоричных кислот определяли в пересчете на хлорогеновую кислоту при 327 нм, содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин –

при длине волны 417 нм после образования комплекса с алюминия хлоридом, содержание суммы фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту – при 270 нм. Для статистической достоверности опыты проводили не менее пяти раз [3, 4].

Для изучения гипогликемической активности сухого экстракта из листьев черники обыкновенной инсулинорезистентность моделировали содержанием животных на диете, обогащенной фруктозой (60,3% фруктозы, 18,3% белка, 5,2% жиров) [6, 7]. Эксперимент проводили на 18-месячных самцах крыс линии Wistar. Подопытные животные были разделены на три группы: 1) интактные животные, которые содержались на стандартном рационе вивария Национального фармацевтического университета (НФаУ); 2) животные, которые содержались шесть недель на фруктозной диете; 3) животные, которые содержались четыре недели на фруктозной диете и дополнительно две недели на этой диете с ежедневным введением сухого экстракта из листьев черники в дозе 2,5 мг на 100 г массы тела. Животных декапитировали под хлоразоло-уретановым наркозом. Объектом исследования была сыворотка крови. При выполнении экспериментов придерживались «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001), гармонизированных с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Содержание глюкозы, инсулина и триацилглицеролов (ТАГ) определяли с использованием стандартных наборов фирмы «Фелисити-Диагностика» (Украина) и фирмы «Lachema» (Чехия). Концентрации α -холестерина (α -ХС) и β -холестерина (β -ХС) определяли с помощью стандартных ферментативных холестеролоксидазных наборов фирмы Boehringer Mannheim GmbH Diagnostica (Германия), предварительно разделив фракции липопротеинов турбидиметрическим методом [8]. Содержание аргинина и цитруллина определяли фотометрическими методами с использованием стандартных наборов реактивов. Для оценки уровня эндогенного монооксида азота (NO) определяли содержание нитритов и нитратов спектрофотометрическим методом с помощью реактива Грисса.

Результаты и обсуждение

В результате предварительного изучения БАВ в сухом экстракте из листьев черники обыкновенной методами ТСХ и БХ с достоверными образцами было установлено наличие таких групп БАВ: простых фенолов, производных гидроксикоричных кислот и флавоноидов, в частности: кофейной, хло-

рогеновой кислот, рутина и кемпферол-3-О-глюкозида.

В результате исследования фенольного состава сухого экстракта из листьев черники обыкновенной методом ВЭЖХ было выявлено 14 соединений фенольной природы, в частности, производные гидроксикоричных кислот и флавоноиды (таблица 1).

Таблица 1. Фенольный состав сухого экстракта из листьев черники обыкновенной

№	Вещество	Время удерживание, мин	Количественное содержание, мг/100 г	
1	Арбутин	2,65	18	
2	Хлорогеновая к-та	13,08	2979,75	1468,5
3	Кофейная к-та	14,15	178,5	550,5
4	(-)-Эпикатехин	14,58	746,75	
5	<i>n</i> -Кумаровая к-та	17,23	64,5	137,9
6	Производная гидроксикоричной к-ты 1	19,28	121,75	
7	Рутин	19,81	1551,75	
8	Производная гидроксикоричной к-ты 1	20,43	110,75	
9	Кемпферол-3-О-глюкозид	21,41	325,75	
10	Производная гидроксикоричной к-ты 3	23,06	218,5	
11	Производная гидроксикоричной к-ты 4	23,26	203,5	
12	Неидентифицированное вещество	23,48	127,25	
13	Кверцетин	23,52		1109,5
14	Производная гидроксикоричной к-ты 5	24,79	84,25	
15	Кемпферол	25,46		124

В сухом экстракте из листьев черники обыкновенной выявлено 8 гидроксикоричных кислот, 3 из которых установлены, идентифицировано 5 флавоноидов, арбутин и одно вещество идентифицировать не удалось. Доминирующими компонентами являются хлорогеновая кислота (2979,75 мг/100г) и рутин (1551,75 мг/100г). После кислотного гидролиза в экстракте идентифицировано 2 агликона флавоноидов – кверцетин и кемферол, и 3 гидрокси-

коричные кислоты – кофейная, *n*-кумаровая и хлорогеновая. Это свидетельствует о том, что остальные 6 веществ, которые не были идентифицированы, относятся к их гликозидам.

В результате исследования моносахаридного состава сухого экстракта из листьев черники обыкновенной, до и после гидролиза, было выявлено 5 моносахаридов – глюкоза, галактоза, рамноза, арабиноза и рибоза (таблица 2).

Таблица 2. Моносахаридный состав сухого экстракта из листьев черники обыкновенной

Моносахарид	Количественное содержание, г/100 г	
	до гидролиза	после гидролиза
Глюкоза	3,525	3,95
Галактоза	1,35	1,4
Рамноза	4,475	4,85
Арабиноза	6,575	7,65
Рибоза	0,5	0,575

После гидролиза количество глюкозы, рамнозы и арабинозы в экстракте увеличивается, что свидетельствует о наличии в нем глюкозидов, рамнозидов и арабинозидов фенольных соединений.

Результаты количественного определения основных групп БАВ в сухом экстракте из листьев черники обыкновенной приведены в таблице 3.

Таблица 3. Количественное содержание основных групп БАВ в сухом экстракте из листьев черники обыкновенной

Группа БАВ	Метод	Содержание, %
Гидроксикоричные кислоты	Спектрофотометрический (в перерасчете на хлорогеновую кислоту)	9,2±0,08
	ВЭЖХ	3,96
Флавоноиды	Спектрофотометрический (в перерасчете на рутин)	2,03±0,11
	ВЭЖХ	2,62
Сумма фенольных соединений	Спектрофотометрический (в перерасчете на галловую кислоту)	18,42±0,97
	ВЭЖХ	6,73

Таким образом, в сухом экстракте наблюдается высокое содержание гидроксикоричных кислот и флавоноидов, а адаптированные методики и результаты анализа будут использованы при его стандартизации.

Содержание крыс на обогащенной фруктозой диете вызывает почти трехкратное увеличение уровня глюкозы в сыворотке крови (таблица 4). В это же время наблюдается гиперинсулинемия, что при одновре-

менной гипергликемии свидетельствует о нечувствительности клеток к инсулину, то есть о развитии инсулинорезистентности. Рост концентрации ТАГ, что достигается через шесть недель эксперимента, является следствием мобилизации жира из жировой ткани и усиления эндогенного синтеза ТАГ и липопротеинов очень низкой плотности печенью из-за ослабления ингибирующего действия инсулина на липолиз.

Таблица 4. Содержание глюкозы, инсулина, ТАГ, α -ХС и β -холестеролов в сыворотке крови крыс при введении сухого экстракта на фоне высокофруктозной диеты ($M \pm m$, $n = 6$)

Показатель	Интакт	Диета	Диета + черника
Глюкоза, ммоль/л	4,6±0,1	13,6±0,2*	9,3±0,3*#
Инсулин, пг/мл	1265±28	2875±46*	2335±38*#
ТАГ, ммоль/л	0,87±0,04	2,36±0,07*	1,98±0,10*#
α -ХС, ммоль/л	1,25±0,03	0,72±0,04*	0,99±0,08*#
β -ХС, ммоль/л	2,63±0,05	3,64±0,07	3,48±0,04*#

* - отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$),

- отклонение достоверно относительно «Диеты» ($p \leq 0,05$).

В патогенезе сахарного диабета важную роль играют нарушения функционирования эндотелия сосудов. Ключевым фактором, регулирующим тонус сосудистого эндотелия, является важнейший физиологический вазодилататор - монооксид азота. Данный медиатор образуется из аргинина под действием Ca^{2+} зависимого фермента NO-син-

тазы (NOS). Продуктом реакции, кроме NO, является также аминокислота цитруллин.

Установлено, что введение сухого экстракта из листьев черники обыкновенной проявляет нормализующее действие на метаболические нарушения на фоне высокофруктозной диеты. Установленные эффекты обусловлены гипогликемиче-

скими, гипополипидемически-ми и антиоксидантными свойствами компонентов. Резуль-

таты показателей системы оксида азота представлены в таблице 5.

Таблица 5. Содержание нитратов, нитритов, цитруллина и аргинина в сыворотке крови крыс при введении сухого экстракта на фоне высокофруктозной диеты ($M \pm m$, $n = 6$)

Показатель	Интакт	Диета	Диета + черника
NO_2^- , NO_3^- , мкмоль/л	125±9	90±5*	95±7*
Цитруллин, мкмоль/л	42,5±4,3	32±2,6*	34±3,8*#
Аргинин, мкмоль/л	67±3	98,6±4,2*	82,3±2,7*#

* - отклонение достоверно относительно интакта ($p \leq 0,05$),

- отклонение достоверно относительно «Диеты» ($p \leq 0,05$).

Выводы

В результате изучения химического состава и фармакологической активности экстракта из листьев черники обыкновенной

показана перспективность создания нового лекарственного средства с гипогликемической активностью

Литература

1. Компендиум 2014 – лекарственные препараты / Под ред. В. Н. Коваленко, Киев, МОРИОН, 2014, 2700 с.
2. Количев І. О. Вибір оптимального екстрагенту для створення нового лікарського засобу з листя чорниці звичайної / І. О. Количев, Т. О. Краснікова, О. М. Кошовий // Збірник наукових праць співробітників НМАПО імені П. Л. Шупика, 2014, № 4, с. 287-291.
3. Дослідження фенольних сполук сухого екстракту з листя шавлії, одержаного шляхом комплексної переробки після виробництва настоянки / Г. В. Вовк, О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупика, 2014, № 4, с. 237-240.
4. Analysis of lipophilic compounds from corylus avellana leaves / Yu. S. Prokopenko, N. A. Bliznyuk, V. A. Georgiyants et al. // Chemistry of Natural Compounds, 2014, vol. 50, issue 41, p. 106-107.
5. Phenolic compounds from *Potentilla anserine* / A.M. Kovaleva, E.R. Abdulkafarova // Chemistry of Natural Compounds, 2011, vol. 47, issue 3, p. 446-447.
6. Endothelial dysfunction in high fructose containing diet fed rats: increased nitric oxide and decreased endothelin-1 levels in liver tissue / M. Altas, A. Var, K. Ozbilgin et al. // Dicle University Med School, 2010, v. 37, № 3, p. 193-198.
7. Загайко А. Л. Метаболічний синдром: механізми розвитку та перспективи антиоксидантної терапії: Монографія / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, К. В. Стрельченко, Харків, Вид-во НФаУ, Золоті сторінки, 2007, 216 с.
8. Кейтс М. Техника липидологии, 1975, Москва, Мир, 322 с.

QARAGİLƏ YARPAQLARINDAN ALINMIŞ QURU EKSTRAKTIN FİTOKİMYƏVİ TƏTQIQI

Oleq N. Koşevoy, Andrey L. Zaqaiko, İlya A. Koliçev, Elşən Y. Əhmədov, Andrey N. Komissarenko

Milli Əczaçılıq Universiteti, Ukrayna

Açar sözlər: qaragilə, ekstrakt, fenol birləşmələr, hipoglükemik fəallıq

Garagilə yarpaqlarından alınmış quru ekstraktının fenol birləşmələrinin kəmiyyətinin və miqdarının öyrənilməsi, onun əsasında hipoglükemik təsirə malik yeni dərman vasitəsinin yaradılmasının perspektivli olmasını göstərmişdir. Garagilə yarpaqlarından alınmış quru ekstraktın tərkibində 15 fenol təbiətli maddə müəyyən edilmişdir. Bunlardan 8 hidrosidarçın turşusudur, onlardan 3 müəyyən edilib, 5 flavonoid müəyyən edilib, arbutin aşkarlanıb, 1 maddə müəyyən olunmamışdır. Daha çox xlorogen turşusu və rutin varlığı müəyyən edilmişdir. Garagilə yarpaqlarından alınmış quru ekstraktı 5 monoşəkərin olması aşkar edilmişdir. Garagilə yarpaqlarından alınmış quru ekstraktının hipoglükemik, hipolipidemik və antioksidant effektləri müəyyən edilib.

PHYTOCHEMICAL STUDY OF THE DRY EXTRACT FROM *BILBERRY* LEAVES

Oleq M. Koshovyi, Andrey L. Zagayko, İlya O. Kolychev, Elshan Yu. Akhmedov, Andrey N. Komissarenko

National University of Pharmacy, Ukraine

Key words: bilberry, extract, phenolic compounds, hypoglycemic activity

The study of qualitative composition and assay of phenolic compounds in the dry extract from the bilberry leaves showed prospects of creating on its basis a new drug with hypoglycemic activity. In the dry extract from the bilberry leaves 15 phenolic substances were found, including 8 hydroxycinnamic acids, 3 of which are installed, five flavonoids, arbutin were identified, and one substance could not be identified. The dominant substances are chlorogenic acid and rutin. In the dry extract from the bilberry leaves 5 monosugars were found. Hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant effects of the dry extract from the bilberry leaves were established.

©Müəlliflər kollektivi, 2016