Рекомендована д.м.н., академіком АНТК України І.Л.Диким

УДК 615.322:633.416]001.8

ДОСЛІДЖЕННЯ ХІМІЧНОГО СКЛАДУ ТА БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ БУРЯКА ЗВИЧАЙНОГО

Л.М.Вороніна, В.М.Ковальов, Т.С.Сахарова, Л.В.Упир, І.В.Сенюк

Українська фармацевтична академія

Проведені фітохімічний аналіз та дослідження протизапальної активності декількох сухих екстрактів з надземної частини буряка звичайного. Доведена наявність біофлавоноїдів, оксикоричних кислот, кумаринів, сапонінів та інших біологічно активних сполук, ідентифіковані 4 речовини флавоноїдної природи. Встановлений виражений антиексудативний ефект одержаних рослинних екстрактів та розглянуті деякі сторони механізму їх дії.

Безліч нефармакопейних лікарських рослин (як окультурених, так і дикоростучих), які використовуються народною медициною, приваблюють учених в області фармації своїми цілющими властивостями. Деякі з цих рослин є перспективними для створення нових лікарських речовин. Приймаючи до уваги все вищесказане, ми почали проводити всебічне дослідження буряка звичайного Beta vulgaris L. родини Chenopodiaceae, який широко культивується в Україні, як кормова, столова та технічна культура. Бадилля, яке є побічним продуктом харчової промисловості, здавна використовувалось в народних рецептах, як протизапальний, спазмолітичний, діуретичний засіб. Сік молодого бадилля стимулює еритропоез, покращує пам'ять, розширює кровоносні судини, рекомендується народними цілителями при гіпертонії, недокрів'ї, неврозах, безсонні, атеросклерозі, туберкульозі, під час клімактеричного періоду [6].

Експериментальна частина

Незважаючи на велику сировинну базу та широке застосування в народній медицині, хімічний склад буряка вивчений недостатньо. На кафедрі фармакогнозії УкрФА було проведено фітохімічне дослідження надземної частини буряка звичайного та розроблена технологія одержання препаратів з нього. Для проведення якісних реакцій готували водні та спирто-водні витяжки з повітряно-сухої подрібненої сировини. В результаті досліджень були виявлені такі групи біологічно активних речовин, як флавоноїди, оксикоричні кислоти, кумарини, сапоніни, бетаїн, полісахариди та амінокислоти.

Виділення індивідуальних сполук здійснювали за допомогою адсорбційної хроматографії на колонках поліаміду, препаративної хроматографії на папері та дрібної кристалізації.

Для цього повітряно-суху подрібнену сировину обробляли 85% спиртом. Спиртові витяжки упарювали до водного залишку у вакуумі і обробляли етилацетатом. Етилацетат відганяли, а смолистий залишок наносили на колонку з поліамідним сорбентом. Розподіл етилацетатних фракцій здійснювали хлороформом та його сумішшю з спиртом у різних концентраціях.

Таким чином були одержані 4 речовини. Речовини I-III за флуоресценцією плям на хроматограмах в УФ-світлі та завдяки якісним реакціям були віднесені до похідних коричної кислоти, які мають максимум поглинання в області 225-240 і 290-330 нм [1, 2]. Батохромне зміщення в УФ-спектрі речовини I в присутності натрію етилату дозволяє зробити висновок про наявність вільної оксигрупи; додавання алюмінію хлориду не викликає батохромії першої смуги УФ-спектра, що свідчить про відсутність в структурі речовини ортодіоксигрупи. Порівняння елементного складу, фізико-хімічних властивостей речовини I з феруловою кислотою показали їх аутентичність. Враховуючи результати проведених досліджень, речовину I ідентифікували, як 3-окси-4-метоксикоричну або ферулову кислоту.

При внесенні натрію стилату до розчину речовини II простежується батохромне зміщення максимумів довгохвильової та короткохвильової смуги на 50 та 25 нм відповідно, що свідчить про наявність оксигруп у молекулі. Внесення до розчину речовини алюмінію хлориду викликає батохромні зміщення максимумів I смуги на 35 та 15 нм, що вказує на присутність 3,4-діоксигрупи в досліджуваній речовині. При лужному гідролізі речовин II та III утворюються кофейна та Д-хінна кислоти в еквімолекулярних кількостях.

Для встановлення місця приєднання кислоти кофейної до кислоти Д-хінної речовин II і III провели їх нагрівання з льодяною оцтовою кис-

лотою; паралельно здійснювали аналогічний дослід з кислотою Д-хінною. При цьому речовина II залишалась незмінною, а речовина III і кислота Д-хінна утворювали лактон хініду. Отже, залишок кислоти кофейної в речовині II приєднується по С-3 кислоти хінної, а в речовині III в С-3 положенні знаходиться вільна гідроксильна група, за якою можливе утворення лактону. Проба змішування речовини II з кислотою хлорогеновою не давала депресії температури топлення, тобто було встановлено, що речовина II є 5-О-кофеїл-Д-хінною кислотою (хлорогеновою).

Батохромне зміщення I смуги при додаванні натрію етилату та алюмінію хлориду свідчить про наявність в структурі речовини III 3,4-діоксигрупи. Отже, речовина III є 3-кофеїл-Д-хінною або неохлорогеновою кислотою.

Речовина IV дає позитивну ціанідинову реакцію. В УФ-світлі при обробці парами аміаку вона має темне забарвлення, яке переходить в жовте. Флавоноїдна природа досліджуваної речовини підтверджується результатами аналізу УФ- та ІЧ-спектрів. Так, в ІЧ-спектрах виділеної речовини виявлені смуги поглинання в області 3100-3520 $см^{-1}$, характерні для фенольних гідроксильних груп; при 1670-1636 $см^{-1}$ — для карбонільної групи γ-піронового циклу.

В УФ-спектрі речовини IV інтенсивність обох максимумів була практично однаковою, що свідчить про її флавонову структуру [5]. Флавоноїд не гідролізується 10% сірчаною кислотою протягом 6 годин і розщеплюється сумішшю Кіліані на апігенін і на Д-глюкозу [13].

В УФ-спектрах досліджуваної речовини в присутності ацетату натрію спостерігались батохромні зміщення максимумів в довгохвильовій та короткохвильовій області, що вказує на наявність вільної гідроксильної групи у С-7. З калію гідроксидом у спектрі спостерігалося значне батохромне зміщення максимуму I смуги на 55 нм і II-ої смуги на 10 нм, що свідчить про наявність гідроксильної групи у С-4[1].

Хлорид цирконілу викликає в спектрах сполук батохромне зміщення довгохвильової смуги на 47 нм, яка зникає при додаванні лимонної кислоти, що є характерним для вільної гідроксильної групи у С-5. Проба змішування речовини IV з аутентичним зразком свідка не давала депресії температури топлення.

Таким чином, на основі проведених досліджень виділений С-глікозид можна охарактеризувати як апігенін-8-С-β-Д-глюкопіранозид (вітексин).

Проведений фітохімічний аналіз листя буряка звичайного став обгрунтуванням для використання цієї сировини, як перспективного джерела для створення нових фармакологічних препаратів. З цією метою були одержані два сухих екстракти, позначені №1 та №2 при екстракції сировини спиртом різної концентрації. На колонці з катионітом КУ-2 з водної витяжки нами був виділений бетаїн.

Різнобічне дослідження біологічної активності рослинних препаратів з буряка звичайного та вивчення деяких біохімічних механізмів їх дії проводиться на кафедрі біохімії УкрФА. Перш за все нашу увагу привернули емпіричні дані народної медицини щодо використання буряка звичайного для лікування захворювань запального генезу [6].

Протизапальну активність сухих екстрактів вивчали на білих щурах обох статей масою 150-200 г на моделі гострого запалення, викликаного субплантарним введенням 0,1 мл 1% розчину карагеніну. Збільшення об'єму лапи, що свідчило про розвиток набряку, оцінювали онкометрично до та через 3 години після ін'єкції карагеніну [7]. Сухі екстракти у вигляді водних розчинів вводили перорально за 1 год. до індукції запалення в ефективній дозі — 100 мг/кг. Препарат порівняння — ортофен — досліджували в дозі 8 мг/кг (його $ЕД_{50}$).

Гостре запалення, змодельоване карагеніном, характеризується фазою ранніх судинних змін, у виникненні яких вирішальну роль відіграють так звані медіатори запалення (гістамін, серотонін, кініни, простагландини та ін.) [12]. Підтвердженням цього стало збільшення об'єму запаленої лапки тварин контрольної групи у 2,5 рази в "піковий" момент карагенінового набряку у порівнянні з вихідним значенням. Обмежуючий вплив на прояви ексудації в запаленій кінцівці білих щурів спостерігався при використанні всіх рослинних препаратів (табл. 1).

Таблиця 1

Антиексудативна активність сухих екстрактів з буряка звичайного

№ п/п	Серія дослідів	Середній приріст об'єму запаленої кінцівки,ум.од.	Антиексудативна активність,%
1	Карагеніновий набряк (контроль)	38,5±6,3	
2	Бетаїн	10,3±4,1*	73,3
3	Сухий екстракт №1	14,0±1,6*	63,6
4	Сухий екстракт №2	22,0±4,8*	42,8
5	Ортофен	19,8±3,5*	48,6

Примітка: * — достовірна розбіжність з контролем при $p<0,05$.

Найбільш ефективним виявилося застосування бетаїну, який вірогідно значуще пригнічував розвиток набряку на 3-й годині формування

карагенінового запалення (у 3,7 рази). Дещо поступався йому за виразністю ефекту сухий екстракт №1, що гальмував приріст об'єму запаленої лапки в 2,8 разів. Вірогідно значущою була антиексудативна дія сухого екстракту №2, проте на відміну від двох попередніх рослинних препаратів вона не досягала активності препарату порівняння. Таким чином було встановлено, що протизапальний ефект бетаїну та сухого екстракту №1 реалізувався в ексудативній фазі гострого запалення.

Одержані нами дані щодо антиексудативної активності сухих екстрактів з буряка звичайного дозволили припустити наявність у них антиоксидантної дії, оскільки при запаленні в результаті хімічних реакцій перетворення простагландинів та внаслідок фагоцитозу утворюються вільні радикали, які виявляють цитопатичні властивості. Першими ознаками "перевантаження" молекулярних механізмів, які відповідають за підтримку гомеостазу при дії цих високореакційних продуктів, є посилення перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) клітинних мембран. Реакції переокислення спричиняють модифікацію та пошкодження ліпідного шару мембран, що й призводить до цитолізу клітини [9]. Стосовно вищезазначеного деякі автори стверджують, що активність запального процесу визначається саме посиленням ПОЛ, а виразність протиокислювальної дії антифлогістиків корелює з їх протизапальним ефектом [8].

Досить адекватно відтворює процеси активації ПОЛ в експерименті модель гострого тетрахлорметанового гепатиту.

В основі молекулярних механізмів пошкодження мембран гепатоцитів CCl_4 лежить його біотрансформація в мембранах ендоплазматичного ретикулуму за участю цитохромів Р-448 та Р-450, які здійснюють метаболізм цього ксенобіотика з утворенням мембранотоксичних продуктів вільнорадикальної природи [4].

Токсичне пошкодження печінки моделювали одноразовим внутрішньоочеревинним введенням 25% масляного розчину CCl_4 в об'ємі 0,2 мл на 100 г маси дослідних тварин [10]. Через 24 години у гомогенатах печінки визначали вміст малонового діальдегіду (МДА) — кінцевого продукту перекисної деградації мембранних ліпідів гепатоцитів [11]. Всього було поставлено 6 серій дослідів на 30 білих щурах обох статей масою 200-250 г; I — інтактні тварини; II — тварини, у яких дистрофія печінки викликана CCl_4 (контрольна група тварин); III-V — групи тварин, які перорально отримували досліджувані рослинні екстракти в дозі 100 мг/кг одноразово через 1 год. після ін'єкції CCl_4; VI — тварини, які отримували за тих же умов патології природний антиоксидант — вітамін Е — в дозі 50 мг/кг ($ЕД_{50}$).

Досліди показали, що через добу вміст МДА у тканині печінки щурів контрольної групи підвищувався в 1,6 рази в порівнянні з інтактною групою. Рівень МДА, близький до значення інтактних тварин, зберігався при лікуванні бетаїном. Використання екстракту №2 приводило до зниження вмісту МДА в 1,3 рази в порівнянні з групою нелікованих тварин, проте значення цього показника залишалось вищим в 1,2 рази за аналогічне в інтактних тварин.

Найбільш значущим було пригнічення процесів пероксидації при введенні тваринам екстракту №1. Про це свідчило зниження вмісту МДА в порівнянні з контрольною групою в 2,3 рази. Одержані результати дозволили прирівняти антиоксидантну активність сухого екстракту №1 до ефекту вітаміну Е (табл. 2).

Таблиця 2

Антиоксидантна активність сухих екстрактів з буряка звичайного

№ п/п	Серія дослідів	Вміст МДА, мкмоль/г	Антиоксидантна активність,%
1	Інтактні тварини	40,3±2,5	-
2	Тетрахлорметановий гепатит (контрольна група)	64,0±3,5	-
3	Бетаїн	39,4±4,3*	38,5
4	Сухий екстракт №1	27,8±6,1*	56,6
5	Сухий екстракт №2	48,5±4,6	24,2
6	Вітамін Е	28,2±5,4*	55,8

Примітка: * — достовірна розбіжність з контролем при $p<0,05$.

Приймаючи до уваги чисельні дані літератури відносно особливостей токсичної дії CCl_4 [3], ми провели також попереднє дослідження вмісту цитохрому Р-450 в умовах поставлених дослідів [11]. Результати експериментів свідчать про зменшення вмісту цитохрому Р-450 у мікросомальній фракції печінки щурів, оброблених CCl_4. Введення дослідним тваринам сухих екстрактів та бетаїну з буряка звичайного на фоні тетрахлорметану приводило до певного відновлення вмісту цитохрому Р-450 до рівня інтактних тварин. Особливо виразно нормалізація спостерігалась при лікуванні дослідних тварин екстрактом №1.

ВИСНОВКИ

1. Проведений фітохімічний аналіз надземної частини буряка звичайного та розроблена технологія отримання сухих екстрактів із запропонованої сировини, що дозволило виявити рослинні препарати з вираженою протизапальною активністю.

2. Протизапальна дія сухих екстрактів та бетаїну з буряка звичайного проявляється на стадії ексудації.

3. Для бетаїну і сухого екстракту №1 простежується кореляція протизапальної активності з антиоксидантним ефектом.

4. Можна припустити, що дія вивчених рослинних препаратів на процеси ПОЛ зумовлюється їх впливом на ферментативну систему мікросомальних монооксигеназ, зокрема на цитохром Р-450.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Бандюкова В.А.// Химия природ. соед. — 1983. — №3. — С. 263-273.*
2. *Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. — Новосибирск: Наука. Сиб. отд-ние. — 1990. — 333 с.*
3. *Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия. —Ленинград: Медицина. — 1986. — С. 184-185.*
4. *Губский Ю.И. Молекулярные механизмы повреждения мембран гепатоцитов при експериментальном повреждении печени: Автореф. ... докт.мед.наук. — Киев, 1984. — 33 с.*
5. *Клышев Л.К., Бандюкова В.А., Алюхина Л.С. Флавоноиды растений. — Алма-Ата: Наука. — 1978. — 220 с.*
6. *Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник/ Відп. ред. Гродзінський А.М. — К.: Голов. ред УРЕ, 1989. — С. 74.*
7. *Методические рекомендации по експериментальному (доклиническому) изучению нестероидных противовоспалительных фармакологических веществ. — М., 1983. — 15 с.*
8. *Насыров Х.М. Механизм действия антифлогистиков, как основа изыскания новых противовоспалительных средств: Автореф. дис. ... докт.мед.наук. — Казань, 1986. — 44 с.*
9. *Саратиков А.С., Прищеп Т.П.// Фармакол. и токсикол. — 1982. — Т. 45. — №42. — С. 133-138.*
10. *Саркисов Д.С., Ремезов П.И. Воспроизведение болезней человека в эксперименте.— М.: Медицина, 1960. — С. 189.*
11. *Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. — М.: Медицина, 1977. — С. 42-44.*
12. *Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д.// Фармакол. и токсикол. — 1982. — №2. — С. 46-49.*
13. *Черонис Н.Д., Ма Т.С. Микро- и полуметоды органического функционального анализа. — М.: Химия, 1973. — 576 с.*

УДК 615.322:633.416]001.8

ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СВЕКЛЫ ОБЫКНОВЕННОЙ

Л.Н.Воронина, В.Н.Ковалев, Т.С.Сахарова, Л.В.Упырь, И.В.Сенюк

Проведен фитохимический анализ и исследования противовоспалительной активности некоторых сухих экстрактов из надземной части свеклы обыкновенной. Доказано наличие биофлавоноидов, оксикоричных кислот, кумаринов, сапонинов и некоторых других биологически активных веществ, идентифицированы 4 вещества флавоноидной природы. Выявлен выраженный антиэкссудативный эффект полученных растительных экстрактов и рассмотрены некоторые стороны механизма их действия.

UDC 615.322:633.416]001.8

PHYTOCHEMICAL AND PHARMACOLOGICAL INVESTIGATION OF COMMON BEET ROOT

L.N.Voronina, V.M.Kovalyov, T.S.Sakharova, L.V.Upyr, I.V.Senyuk

The phytochemical analysis and investigation of anti-inflammatory properties of some dry extracts from the parts of common beet root have been carried out. The presence of bioflavonoids, oxicoric acids, cumarins, saponins and the other biologicaly active compounds has proved; four substances of the flavonoid origin have been identified. The antiexsudative effect of the plant extracts obtained and the mechanism of their action have been investigated.