

ИЗУЧЕНИЕ ФЕНОЛЬНОГО СОСТАВА И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ АДАПТОГЕННОГО СРЕДСТВА «АДАПТОФИТ» IN VITRO И IN VIVO

П.Б. Лубсандоржиева¹, М.В. Балдандоржиева¹, Л.Н. Шантанова¹, Л.В. Осадчук²

¹ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ)

²ФГБУН Институт цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск)

The study of phenolic composition and antioxidant activity of adaptogenic remedy «Adaptophyte» in vitro and in vivo

P.B. Lubsandorzhieva¹, M.V. Baldandorzhieva¹, L.N. Shantanova¹, L.V. Osadchuk²

¹The Institute of General and Experimental Biology of SB RAS (Ulan-Ude, Russia)

²The Institute of Cytology and Genetics of SB RAS (Novosibirsk, Russia)

РЕЗЮМЕ

Определено количественное содержание основных групп биологически активных веществ и антиоксидантная активность *in vitro* и *in vivo* 15-компонентного адаптогенного средства «Адаптофит». Для опытов *in vitro* использованы этилацетатная фракция, отвар и экстракт сухой из «Адаптофита». В сухом экстракте из «Адаптофита» методом ВЭЖХ установлено содержание следующих фенольных соединений: галловой (31,7 %), хлорогеновой (21,8 %), изоферуловой (8 %), цикориевой (7,4 %) кислот, витексина (3,3 %), рутина (2,6 %). Данные опытов *in vitro* показали, что наиболее эффективной Fe²⁺ – хелатирующей активностью обладает экстракт сухой, супероксид радикалсвязывающей активностью – этилацетатная фракция и экстракт сухой, NO-связывающей активностью – этилацетатная фракция. Кроме того, этилацетатная фракция наиболее эффективно подавляет образование малонового диальдегида в модели с липопропротеидами, чем сухой экстракт или отвар «Адаптофита». Показано, что «Адаптофит» ингибирует интенсивность образования продуктов свободнорадикального окисления и активирует эндогенную антиоксидантную систему у крыс линии Wistar на фоне интенсивных физических нагрузок.

Ключевые слова: адаптогенное средство, фенольные соединения, антиоксидантная активность *in vitro* и *in vivo*.

RESUME

The content of biologically active compounds and the antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* in a 15-component adaptogenic herbal remedy «Adaptophyte» were studied. The ethyl acetate fraction, decoction and dry extract of «Adaptophyte» were used for *in vitro* study. The content of following phenolic substances in the dry extract of «Adaptophyte» was established by the HPLC method: gallic (31,7 %), chlorogenic (21,8 %), isoferulic (8 %), chicoric (7,4 %) acids, vitexin (3,3 %) and rutin (2,6 %). The *in vitro* experimental data showed that the most effective Fe²⁺ – chelating activity possessed the dry extract, the strong superoxide radical scavenging activity possessed the ethyl acetate fraction and dry extract, and the – NO scavenging activity – ethyl acetate fraction. In addition the ethyl acetate fraction suppressed the formation of malone dialdehyde more effectively than the dry extract or decoction in the lipoprotein model. It has been shown that «Adaptophyte» inhibited the intensive formation of free radical oxidation products and activated the endogenous antioxidant system in rats of the strain Wistar under intensive physical exercises.

Keywords: adaptogenic remedy, phenolic compounds, antioxidant activity *in vitro* and *in vivo*.

ВВЕДЕНИЕ

В патогенезе различных хронических заболеваний, ведущих к истощению защитных сил организма, ключевую роль играет свободнорадикальное окисление (СРО) макромолекул. Известно, что фенольные соединения (ФС) фитопрепаратов в зависимости от

структуры, липофильности/гидрофобности и концентрации обладают антиоксидантной активностью [1]. Экспериментальные данные об антиоксидантной активности (АОА) фитопрепаратов, полученные *in vitro*, не всегда подтверждаются *in vivo* вследствие метаболизма ФС в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ) [2].

Ранее нами была разработана рецептура 15-компонентного адаптогенного средства «Адаптофит» (условное название), и с использованием метода ВЭЖХ изучен его флавоноидный состав в этилацетатной фракции, где были обнаружены рутин, кверцетин, лютеолин, изорамнетин, изокверцитрин, нарциссин, кемпферола рамноглюкозид, изорамнетина-3-О-рутинозилрамнозид, цинарозид, изоскутелляреина-7-О-β-ксилопиранозид [3].

Цель данной работы – изучение количественного содержания основных групп биологически активных веществ (БАВ), фенольного состава методом ВЭЖХ, и антиоксидантной активности (АОА) адаптогенного средства «Адаптофит» *in vitro* и *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В состав адаптогенного средства «Адаптофит» входят: корневища и корни левзеи сафлоровидной *Rhaponticum carthamoides* (Willd) DC. (13 ч.), девясила высокого *Inula helenium* L. (7 ч.), алтея лекарственного *Althaea officinalis* L. (5 ч.), аира болотного *Acorus calamus* L. (5 ч.), имбиря *Zingiber officinale* Roscoe (4,5 ч.), соцветия календулы лекарственной *Calendula officinalis* L. (13 ч.), плоды кардамона *Elettaria cardamomum* Maton. (9 ч.), мускатного ореха *Myristica fragrans* Houtt. (5 ч.), граната *Punica granatum* L. (11,5 ч.), перца длинного *Piper longum* L. 6,5 ч.), можжевельника *Juniperus communis* L. 5 ч.), кора коричневого дерева *Cinnamomum cassia* (4,5 ч.), трава горца птичьего *Polygonum aviculare* L. (5 ч.), листья черные бадана толстолистного *Bergenia crassifolia* (L.) Fritsch. (3 ч.) и хитозана (3 ч.). Фармакопейные виды сырья, хитозан (ТУ 9197-031-94981642-07) приобретены в аптечной сети, пищевые пряности имбирь, кардамон, корица, мускатный орех (ГОСТы 29049-91, 29046-91, 29048-91, 29052-91) производства ООО «Новосибирский пищевой комбинат», плоды *P. granatum* (ГОСТ 27573-87), *P. longum* – в торговой сети, черные (перезимовавшие) листья *B. crassifolia* собраны на хребте Улан-Бургасы в Прибайкальском районе Бурятии в осенне-весенний периоды 2010-2011 гг.

Для получения экстракта сухого 30 г (точная навеска) «Адаптофита» экстрагировали последовательно 80 % и 40 % этиловым спиртом, водой горячей двукратно по 150 мл, извлечения отфильтровали, спирт удалили, водный остаток высушили в вакуум-сушильном шкафу. Выход экстракта сухого составил 38,7 % от

массы исходной смеси. Для получения этилацетатной фракции 5 г (точная навеска) «Адаптофита» обрабатывали дважды по 25 мл гексана, затем по 25 мл хлороформа (3-кратная экстракция) для удаления липофильных веществ. Шрот экстрагировали последовательно 80 % и 40 % этиловым спиртом, водой горячей трижды по 50 мл, извлечения отфильтровали, спирт удалили, водный остаток концентрировали до 10–15 мл. Водный остаток обрабатывали 30 мл этилацетата (5-кратно), извлечения отделили от водного слоя, растворитель удалили, сухой остаток этилацетатной фракции растворили в 25 мл 96 % этилового спирта. Отвар (1:10) «Адаптофита» для опытов *in vitro* готовили по фармакопейному методу, для опытов *in vivo* использована взвесь отвара со шротом (степень измельчения исходной смеси 0,18 мм) вследствие нерастворимости хитозана в воде.

Количественное содержание БАВ в «Адаптофите» определяли известными методами: дубильных веществ, флавоноидов, водорастворимых полисахаридов, эфирных масел – фармакопейным, каротиноидов [4] и тритерпеновых сапонинов [5] – спектрофотометрическим, аминокислот – с использованием реакции с 1 % спиртовым раствором нингидрина. Изучение количественного состава индивидуальных веществ в сухом экстракте Адаптофита проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSTON», модель 305 (Франция); инжектор ручной, модель RHEODYNE 7125 (USA) с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы Мультихром для Windows. В качестве подвижной фазы использованы смесь метанол – вода – кислота фосфорная концентрированная в соотношении 400:600:5. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора «GILSTON» UV/VIS при длине волны 254 нм. Стандартные образцы галловой, хлорогеновой, изоферуловой, цикориевой кислот, витексина и рутина готовили на 70 %-ном этиловом спирте в концентрации 0,05 %. Количественное соотношение веществ в анализируемом растворе установлено методом нормирования по площади хроматографических пиков.

Для установления спектра АОА водного извлечения (1:10), экстракта сухого, этилацетатной фракции «Адаптофита» использованы нитропруссидный метод для определения NO-связывающей активности [6]; фенантролиновый метод – для Fe²⁺-хелатирующей

активности [7]. Определение супероксидных анион-радикалсвязывающей активности велось по методике [8]; а для определения ТБК-активных продуктов использовалась методика с желточными липопротеидами (ЖЛП) [9].

Эксперименты *in vivo* проведены на 28 белых крысах линии Wistar обоего пола массой 180–220 г. Животные содержались в соответствии с правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей. Для изучения влияния «Адаптофита» на интенсивность процесса СРО использована модель плавания животных в бассейне с грузом, составляющим 7 % от массы тела. Крысам опытной группы внутрижелудочно вводили отвар (1:10) «Адаптофита» (взвесь, содержащая отвар и шрот) в объеме 10 мл/кг в течение 7 дней до стрессорного воздействия (1 раз в день за 30 минут до кормления). Животные контрольной группы получали эквивалентное количество дистиллированной воды по аналогичной схеме. В качестве препарата сравнения использовали деалкоголизированный экстракт жидкий элеутерококка в объеме 5 мл/кг. Через 7 суток от начала введения средства оценивали интенсивность процессов СРО по содержанию каталазы [10], восстановленного глутатиона [11], малонового диальдегида (МДА) в сыворотке крови [12]. Данные экспериментов приведены в таблице 4.

Для обработки результатов использованы программы Advanced Grapher 2.0, Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В исходной смеси «Адаптофита» и экстракте сухом определено содержание основных групп БАВ: эфирных масел, каротиноидов, три-терпеновых сапонинов, дубильных веществ, флавоноидов, аминокислот, водорастворимых

полисахаридов (табл. 1). Из исходной смеси в экстракт сухой «Адаптофита», содержащего липофильные (экстракция 80% этиловым спиртом), среднеполярные (экстракция 40 % этиловым спиртом) и водорастворимые (экстракция водой) вещества извлечена большая часть БАВ, кроме летучих веществ (табл. 1). Методом ВЭЖХ в экстракте сухом «Адаптофита» обнаружено присутствие фенолокислот: галловой, хлорогеновой, изоферуловой, цикориевой; флавоноидов: витексина и рутина (табл. 2). Следует отметить, что галловая кислота является доминирующим веществом в фенольном комплексе «Адаптофита».

Опыты *in vitro* по определению АОА извлечений из «Адаптофита» показали, что водорастворимые вещества с летучими компонентами (отвар), суммарное извлечение БАВ разной полярности (экстракт сухой), фракция фенольных, преимущественно флавоноидных веществ (этилацетатная фракция) обладают антирадикальной активностью по отношению к активированным формам кислорода: O_2^- и NO, а также проявляют Fe^{2+} -хелатирующую активность *in vitro* (табл. 3). Так, водорастворимые вещества «Адаптофита» проявляет умеренную Fe^{2+} -хелатирующую активность ($IC_{50}=128$ мкг/мл) по сравнению с экстрактом сухим ($IC_{50}=24$ мкг/мл), содержащим как гидрофильные, так и липофильные вещества. Инактивирующая способность в отношении O_2^- – радикалов у извлечений «Адаптофита» убывает в ряду: этилацетатная фракция > экстракт сухой > водное извлечение (табл. 3). Этилацетатная фракция, содержащая флавоноидные соединения [3], также эффективно проявляет NO-связывающую активность в наименьшей концентрации – $IC_{50} = 239$ мкг/мл, что в 4,5 раза превышает активность аскорбиновой кислоты ($IC_{50} = 1140$ мкг/мл). Кроме того,

Таблица 1

Содержание биологически активных веществ в «Адаптофите» и экстракте сухом из него

Наименование	Содержание	
	«Адаптофит»	Экстракт сухой «Адаптофита»
Эфирные масла, %	1,7	-
Каротиноиды в пересчете на β -каротин, мг%	1,2	0,6
Тритерпеновые сапонины, в пересчете на олеаноловую к-ту, %	1,4	3,4
Дубильные вещества, в пересчете на таннин, %	1,3	6,5
Флавоноиды, в пересчете на рутин, %	0,6	1,4
Свободные аминокислоты, в пересчете на глютаминовую к-ту, %	0,3	0,8
Водорастворимые полисахариды, %	18,2	25,0

Примечание: данные представляют среднее из трех определений; прочерк означает, что вещества не обнаружены.

Таблица 2

**Количественное содержание
некоторых фенольных соединений
в экстракте сухом «Адаптофита»
(метод ВЭЖХ)**

Наименование	Время удерживания, мин	Содержание, %
Галловая кислота	3,3	31,7
Хлорогеновая кислота	3,8	21,8
Изоферуловая кислота	5,5	8,0
Цикориевая кислота	6,8	7,4
Витексин	10,3	3,3
Рутин	15,5	2,6

Таблица 3

**Антиоксидантная активность
извлечений «Адаптофита» *in vitro***

Наименование	Концентрация (IC ₅₀), мкг/мл			
	ЖЛП-метод	Fe ²⁺	O ₂ ^{·-}	NO
«Адаптофит» - отвар (1:10)	312 ± 12	128 ± 10	370 ± 12	2825 ± 45
«Адаптофит» - этилацетатная фракция	33 ± 1	-	11 ± 1	239 ± 11
«Адаптофит» - экстракт сухой	270 ± 3	24 ± 1	18 ± 1	> 5000
Аскорбиновая кислота ^a	50 ± 1	0,15 ± 0,01	101 ± 3	1140 ± 34

Примечание: ЖЛП-метод – антиоксидантная активность в отношении накопления ТБК-активных продуктов, Fe²⁺ – Fe²⁺-хелатирующая активность, O₂^{·-} – связывание супероксид-анион радикала, NO – связывание молекул оксида азота; ^a вещество сравнения, прочерк означает отсутствие данных.

Таблица 4

**Влияние «Адаптофита»
на интенсивность процессов
свободнорадикального окисления
и состояние антиокислительной системы
у крыс линии Wistar на фоне интенсивной
физической нагрузки**

Показатель	Группы животных		
	Контроль (n=8)	Элеутерококк (n=10)	«Адаптофит» (n=10)
МДА, нмоль/мл	6,3 ± 0,3	4,0 ± 0,3	3,9 ± 0,2
Каталаза, мкат/л	13,7 ± 0,3	15,2 ± 0,3	15,7 ± 1,3
Восста- новленный глутатион, ммоль/л	6,4 ± 0,5	9,0 ± 0,1	8,2 ± 0,3

Примечание: МДА – малоновый диальдегид; n – количество животных в группе.

этилацетатная фракция наиболее эффективно препятствует перекисному окислению биологического субстрата в модели ЖЛП, подавляя образование МДА в наименьшей концентрации (IC₅₀ = 33 мкг/мл), что превышает активность вещества сравнения – аскорбиновой кислоты (IC₅₀ = 50 мкг/мл) в данной тест-системе (табл. 3).

Таким образом, наиболее выраженной антиоксидантной активностью в различных моделях *in vitro* обладают этилацетатная фракция, содержащая флавоноиды [3], а также экстракт сухой, содержащий флавоноиды, фенолокислоты (табл. 2), что подтверждает преимущественный вклад ФС в суммарную АОА «Адаптофита».

Данные опытов *in vitro* подтверждены экспериментальными данными о влиянии «Адаптофита» на интенсивность процессов СРО и состояние антиокислительной системы организма белых крыс на фоне интенсивной физической нагрузки (табл. 4). У животных на фоне максимальной физической нагрузки отмечается существенное повышение уровня МДА в крови, а также снижение активности каталазы и СОД сыворотки крови, что свидетельствует об индукции перекисного окисления липидов и угнетении активности эндогенной антиокислительной системы организма в результате плавления до полного утомления. На фоне превентивного введения «Адаптофита» в указанной дозе отмечаются менее выраженные изменения в показателях свободнорадикального окисления и параметров антиокислительной системы. Так, концентрация МДА в сыворотке крови животных опытной группы была меньше на 38%, экстракта элеутерококка – на 37 % по сравнению с аналогичными показателями у крыс контрольной группы. Наряду с этим, на фоне введения испытуемого средства в сыворотке крови животных опытной группы отмечалось повышение активности каталазы на 14 %, содержания восстановленного глутатиона на 28 % по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации антиокислительной системы (табл. 4).

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют, что адаптогенное средство «Адаптофит» проявляет антиоксидантную активность как *in vitro*, так и *in vivo*.

ВЫВОДЫ

Установлено, что «Адаптофит» содержит 1,7 % эфирного масла, 1,3 % дубильных веществ,

0,6 % флавоноидов, 1,2 мг % каротиноидов, 1,4 % тритерпеновых сапонинов, 0,3 % аминокислот, 18,2 % водорастворимых полисахаридов. В составе сухого экстракта «Адаптофита» выявлено содержание галловой (31,7 %), хлорогеновой (21,8 %), изоферуловой (8,0 %), цикориевой (7,4 %) кислот, а также витексина (3,3 %) и рутина (2,6 %).

Отвар, сухой экстракт и этилацетатная фракция «Адаптофита» обладают радикал-связывающей, металл-хелатирующей активностью, а также способностью ингибировать перекисное окисление липидов. Наиболее эффективной антиоксидантной активностью *in vitro* характеризуется этилацетатная фракция.

В экспериментах на крысах линии Wistar, которые подвергались интенсивным физическим нагрузкам, показано, что «Адаптофит» ингибирует интенсивность образования продуктов свободнорадикального окисления и активирует эндогенную антиоксидантную систему.

Работа выполнена при финансовой поддержке Президиума СО РАН (Интеграционный проект № 57).

ЛИТЕРАТУРА

1. Critical reviews of oxidative stress and aging. Advances in Basic Science, Diagnostics and Intervention // Ed. R.G. Cutler, H. Rodriguez. – New Jersey, London, Singapore, Hong Kong: World scientific. – 2003. – V. I. – 822 p.
2. Houghton P.J., Howes M.-J., Lee C.C. et al. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant // Journal of Ethnopharmacology. – 2007. – V. 110. – P. 391–400.
3. Лубсандоржиева П.Б., Болданова Н.Б., Попов Д.В. Количественный анализ флавоноидов в растительном средстве методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 114–115.
4. Евдокимова О.В., Самылина И.А., Нестерова О.В. Определение содержания суммы фосфолипидов и каротиноидов в плодах некоторых видов боярышника // Фармация. – 1992. – № 6. – С. 70–72.
5. Муравьев И.А., Шатило В.В., Семенченко В.Ф. Спектрофотометрический метод количественного определения урсоловой кислоты // Химия природных соединений. – 1972. – № 6. – С. 738–740.
6. Govindarajan R., Rastogi S., Vijayakumar M. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gagenticum* // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – V. 26. – P. 1424–1427.
7. Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н., Торопова А.А. и др. Химический состав сока каллизии душистой (*Callisia fragrans* Wood.) и его антиоксидантная активность (in vitro) // Химия растительного сырья. – 2008. – № 4. – С. 95–100.
8. Chen A.-S., Taguchi T., Sakai K. et al. Antioxidant activities of chitobiose and chititriose // Biol. Pharm. Bull. – 2003. – 2003. – V. 26. – P. 1326–1330.
9. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкина Ю.О. и др. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59–62.
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. и др. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
11. Anderson R.L., Linas S.L., Berns A.S. et al. Nonolegic acute renal failure // N. Engl. J. Med. – 1977. – V. 236. – P. 1134.
12. Темирбулатов Р.А., Селезнев Е.И. Метод повышения интенсивности свободнорадикального окисления липидсодержащих компонентов крови и его диагностическое значение // Лаб. дело. – 1981. – № 4. – С. 209–211.

Адрес автора

Лубсандоржиева П.Б.
ИОЭБ СО РАН, лаборатория медико-биологических исследований
bpunsic@mail.ru