

© Коллектив авторов, 2011

С. М. Николаев^{1,2}, И. Г. Николаева^{1,2}, Я. Г. Разуваева¹, А. М. Доржиев²

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО ПАНКРЕОЗАЩИТНОГО СРЕДСТВА “ПАНКРЕОФИТ” И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия;

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ, Россия

В эксперименте на животных установлена антиоксидантная активность растительного средства “Панкреофит” при остром хлорэтиловом панкреатите. Обнаружены флавоноиды — лютеолин-7-гликозид, апигенин, гиперозид, рутин, витексин, дигидрокверцетин, кверцетин и кислоты — коричная, галловая, кофейная и цикориевая.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, экспериментальный панкреатит, растительное средство “Панкреофит”, флавоноидный состав.

В настоящее время имеются многочисленные данные о роли и значении перекисного окисления липидов (ПОЛ) в развитии и прогрессировании ряда патологических процессов, в том числе острого и хронического панкреатитов [1]. Известно, что интенсификация ПОЛ при панкреатитах поддерживает локальный воспалительный процесс, способствует нарушению микроциркуляции и обменных процессов в поджелудочной железе, угнетению тканевого дыхания, что, в свою очередь, приводит к деструкции паренхимы железы и угнетению ферментативного и неферментативного звеньев антиоксидантной защиты организма [2]. Установлено, что степень тяжести панкреатитов коррелирует с интенсивностью ПОЛ и активностью антиоксидантной системы организма [3]. В связи с этим целесообразным является применение антиоксидантов в комплексной терапии и профилактике панкреатитов. Среди антиоксидантов растительного происхождения особый интерес представляют полифенольные соединения, являющиеся ловушками свободных радикалов, защищающие организм от оксидантного стресса, блокирующие процессы ПОЛ и меняющие структурные характеристики биологических мембран [4]. На основании вышесказанного разработано комплексное средство растительного происхождения в форме сухого экстракта, обладающее панкреозащитным действием и условно названное “Панкреофит”. В состав растительной композиции входят лекарственные растения — *Bidens tripartita* L. (трава), *Gnaphalium uliginosum* L. (трава), *Calendula officinalis* L. (цветки), *Inula helenium* L. (корневище), *Pentaphylloides fruticosa* L. (побеги), *Hypericum perforatum* L. (трава), *Vaccinium myrtillus* L. (побеги) и другие виды растений.

В исследовании полифенольных соединений растительного происхождения — флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, кумаринов и других — хроматография занимает ведущее место [5–8]. Для анализа полифенольных соединений ис-

пользуются различные хроматографические методы, такие как хроматография на колонке, тонкослойная хроматография, газожидкостная хроматография (ГЖХ). Одним из наиболее подходящих хроматографических методов является современный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Преимуществом ВЭЖХ перед другими хроматографическими методами является возможность использования разных по механизму хроматографических процессов, различных видов детектирования, изократического и градиентного элюирования. Важным достоинством является четкое разделение многокомпонентных смесей и независимость исследований от молекулярной массы анализируемых веществ [9].

Целью настоящей работы является определение антиоксидантной активности сухого экстракта из растительной композиции “Панкреофит” при остром хлорэтиловом панкреатите и изучение компонентного состава сухого экстракта “Панкреофит” с применением метода ВЭЖХ.

Экспериментальная химическая часть

Исследования химического состава сухого экстракта проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы “Gilston” (Франция), инжектор ручной, модель Rheodyne 7125 USA с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы “Мультихром для Windows”. В качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку размером 4,6 × 250 мм Platinum EPS C-18100, размер частиц 5 микрон. В качестве подвижной фазы метанол — вода — фосфорная кислота концентрированная в соотношении 40:60:0,5. Анализ проводили при комнатной температуре. Образцы хроматографировали в изократическом режиме. Скорость подачи элюента — 0,5 мл/мин. Продолжительность

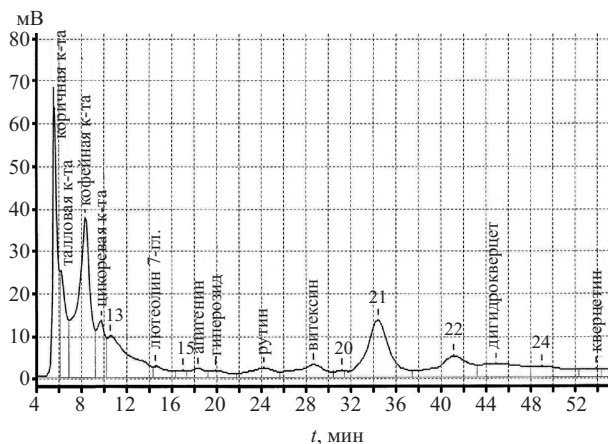


Рис. 1. Хроматограмма раствора сухого экстракта "Панкреофит"

анализа 60 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм.

Точную навеску сухого экстракта 0,5 г растворяли в 70 % этиловом спирте, раствор помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки 70 % этиловым спиртом. По 2,5 мл полученного раствора помещали в мерную колбу на 25 мл и доводили 70 % спиртом этиловым до метки, перемешивали (исследуемый раствор). Параллельно готовили серию 0,05 % растворов сравнения в 70 % спирте этиловом: рутина, кверцетина, лютеолин-7-гликозида, кофейной кислоты, коричневой кислоты, галловой кислоты, цикориевой кислоты, гиперозид, апигенина, дигидрокверцетина, витексина. По 20 мкл исследуемого раствора и растворов сравнения хроматографировали по выше приведенной методике. Пики на хроматограммах идентифицировали по времени удерживания (t_R). Результаты исследований приведены в табл. 1 и на рис. 1.

Из приведенных в таблице данных видно, что полифенольный состав экстракта разнообразен. Идентифицировано 11 веществ. Фенольные соединения представлены в основном кислотами: кофейной (32,74 %), коричневой (19,62 %) и галловой (10,53 %). Кроме этого

Таблица 1
Результаты идентификации веществ в сухом экстракте "Панкреофит" с применением ВЭЖХ

Соединение	t_R , с	Содержание в смеси (метод внутренней нормализации), %
1. Коричневая кислота	332,6	19,62
2. Галловая кислота	368,3	10,53
3. Кофейная кислота	499,9	32,74
4. Цикориевая кислота	579,7	7,57
5. Лютеолин-7-гликозид	837,2	2,63
6. Апигенин	1094,0	2,20
7. Гиперозид	1190,0	2,25
8. Рутин	1452,0	4,23
9. Витексин	1717,0	6,31
10. Дигидрокверцетин	2686,0	9,41
11. Кверцетин	3227,0	2,51

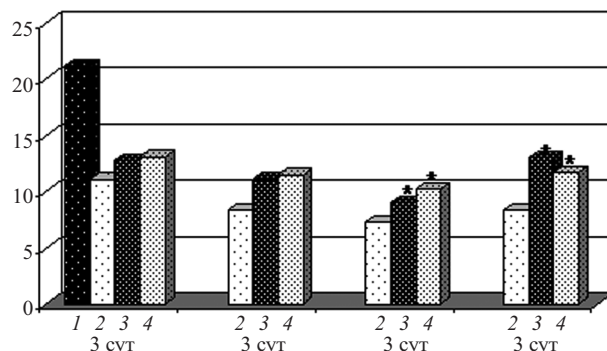


Рис. 2. Влияние "Панкреофита" на активность каталазы (мкат/мл · мин) в сыворотке крови белых крыс при экспериментальном панкреатите: 1 – интактная; 2 – контрольная; 3 – "Панкреофит"; 4 – сбор № 120

в экстракте обнаружены цикориевая кислота, флавоноиды: лютеолин-7-гликозид, апигенин, гиперозид, рутин, витексин, дигидрокверцетин, кверцетин.

Экспериментальная фармакологическая часть

Опыты выполнены на 156 белых крысах линии Wistar обоего пола с исходной массой 170 – 200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Острый панкреатит у лабораторных животных вызывали по методу, разработанному в [10], путем орошения поджелудочной железы крыс хлорэтилом под тиопенталовым наркозом (50 мг/кг) с предварительной 24-часовой пищевой депривацией. Экстракт "Панкреофит" в дозе 300 мг/кг внутривенно вводили оперированным животным с первого дня эксперимента в течение 21 сут. В качестве препарата сравнения использовали растительный сбор № 120, рекомендуемый в [11] для лечения панкреатитов. Препарат сравнения в форме отвара, приготовленного по Государственной Фармакопее СССР XI издания (1990) (ГФ XI) [12], вводили крысам в объеме 1 мл/100 г массы по аналогичной схеме. Животные контрольной группы получали воду, очищенную в эквивалентном количестве по аналогичной схеме. Исследования проводили на 3, 7 и 21 сут опыта. Реакцию ПОЛ при экспериментальном панкреатите определяли по содержанию в сыворотке крови животных малонового диальдегида (МДА) [13], со-

Таблица 2
Влияние "Панкреофита" на содержание МДА (мкмоль/мл · мин) в сыворотке крови белых крыс при экспериментальном панкреатите

Сроки наблюдения, сут	Группы животных			
	Интактная	Контрольная	"Панкреофит"	Сбор № 120
3	2,7 ± 0,17	4,6 ± 0,25	3,4 ± 0,10 *	3,8 ± 0,27*
7		5,4 ± 0,16	4,0 ± 0,11 *	4,8 ± 0,16*
14		6,2 ± 0,32	4,8 ± 0,12 *	5,0 ± 0,22*
21		5,8 ± 0,13	3,6 ± 0,11 *	4,4 ± 0,23*

Примечание: здесь и далее * — значение значимо по сравнению с данными у животных контрольной группы при $p \leq 0,05$.

стояние эндогенной антиоксидантной системы организма — по активности каталазы в сыворотке крови [14]. Значимость различий между указанными параметрами среди экспериментальных групп оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни [15]. Различия считали существенными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследований показали, что охлаждение поджелудочной железы крыс хлорэтилом вызывало динамичное увеличение содержания МДА в сыворотке крови у животных контрольной группы, что свидетельствовало о прогрессировании деструктивных процессов в поджелудочной железе [16]. На 14 сут наблюдения концентрация МДА в сыворотке крови у контрольных крыс достигала максимального значения (табл. 2). Активация ПОЛ коррелировала со снижением активности ключевого антиоксидантного фермента — каталазы (рис. 2). Так, на 14 сут эксперимента активность каталазы у животных контрольной группы снижалась в 3 раза по сравнению с таковой у животных интактной группы.

Курсовое введение белым крысам “Панкреофита” на фоне хлорэтилового панкреатита ингибировало ПОЛ, вызывая понижение концентрации МДА в сыворотке крови в среднем на 28 % во все сроки эксперимента по сравнению с показателями у животных контрольной группы. Наиболее выраженное снижение содержания МДА в сыворотке крови у крыс опытной группы наблюдалось на 21 сут и составляло 38 % от такового у животных контрольной группы. У крыс, получавших “Панкреофит” и сбор № 120, на фоне снижения в сыворотке крови продуктов ПОЛ, наблюдалась активация каталазы: на 3 сут — на 18 и 15 %, на 7 сут — на 37 и 32 %, на 14 сут — на 40 и 23 % и на 21 сут — на 55 и 39 % соответственно по сравнению с таковой у животных контрольной группы.

Таким образом, “Панкреофит” обладает антиоксидантной активностью, подавляет процессы перекисного окисления липидов. В сухом экстракте содержатся коричная, галловая, кофейная, цикориевая кислоты и

флавоноиды: лутеолин-7-гликозид, апигенин, гиперозид, рутин, витексин, дигидрокверцетин и кверцетин. Идентифицированные фенольные соединения представлены в основном кислотами: кофейной (32,74 %), коричной (19,62 %), галловой (10,53 %). Установленное антиоксидантное действие экстракта обуславливается содержанием полифенольных веществ.

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Морозов, В. Т. Долгих, В. Л. Полуэктов, *Бюл. СО РАМН*, № 4, 32 – 35 (2005).
2. Н. Б. Губергриц, Т. Н. Христич, *Клиническая панкреатология*, Донецк (2000).
3. В. С. Савельев, В. М. Буянов, Ю. В. Огнев, *Острый панкреатит*, Москва (1983).
4. N. C. Cook, S. Jamman, *J. Natur. Biochem.*, No. 7, 66 – 76 (1996).
5. Н. А. Тюкавкина, В. Г. Горохова, В. А. Бабкин и др., *Химия древесины*, № 5, 100 – 102 (1979).
6. А. А. Маркарян, А. А. Абрамов, *Вестн. МГУ. Сер. 2. Химия*, 44(5), 356 (2003).
7. А. А. Маркарян, Ю. И. Шабалдина, О. В. Нестерова, *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*, № 1, 21 (2007).
8. Р. В. Шафигулин, А. В. Буланова, *Тез. докл. Всероссийского симпозиума “Хроматография в химическом анализе и физико-химических исследованиях”*, Москва (2007), с. 9.
9. Х. Энгельгардт, *Жидкостная хроматография при высоких давлениях*, Москва (1988).
10. П. С. Симаворян, Р. С. Тишенина, *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*, № 2, 59 – 62 (1973).
11. С. Я. Соколов, И. П. Замотаев, *Справочник по лекарственным растениям (Фитотерапия)*, Москва (1988).
12. *Государственная фармакопея XI издание*, Т. 1, Москва (1990).
13. T. Osakava, S. Matshushita, *Lipids*, 15(3), 137 – 140 (1980).
14. М. А. Королюк, Л. И. Иванова, И. Г. Майрова и др., *Лаб. Дело*, № 1, 16 – 19 (1988).
15. В. И. Сергиенко, И. Б. Бондаренко, И. И. Гайдышев, *Математическая статистика в клинических исследованиях*, Москва (2001).
16. С. В. Морозов, В. Т. Долгих, В. Л. Полуэктов, *Вестн. ВолГМУ*, № 1, 74 – 77 (2006).

Поступила 06.02.09

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND FLAVONOID COMPOSITION OF NEW PANCREOPROTECTIVE PREPARATION PANCREOPHYT

S. M. Nikolaev¹, I. G. Nikolaeva¹, Ya. G. Razuvaeva¹, and A. M. Dorgiev²

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryat Republic, Russia;

² Buryat State University, Ulan-Ude, Buryat Republic, Russia

The antioxidant activity of a new pancreoprotective plant preparation Pancreophyt has been experimentally studied on animal model of acute chloroethyl-induced pancreatitis. The flavonoid composition of Pancreophyt has been determined. It is established that this phytopreparation contains luteolin-7-glycoside, apigenin, hyperoside, rutin, vitexin, dihydroquercetin, and quercetin as well as cinnamic, gallic, caffeic, and cichoric acids.

Key words: Antioxidant activity, experimental pancreatitis, plant preparation, Pancreophyt, flavonoid composition