

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА АСТРАГАЛА ЭСПАРЦЕТНОГО

Темирбулатова А.М.¹, Галкин М.А.¹, Хромцова Е.Н.¹, Погорелый В.Е.¹, Лежнева Л.П.¹, Шаталова Т.А.¹

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт - филиал ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства Здравоохранения России, Пятигорск, Россия (357532, Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: anna_vladimir@inbox.ru

Цель настоящей работы - показать, что экстракты астрагала эспарцетного, полученные по общепринятой и ресурсосберегающей технологиям, обладают одинаковым желчегонным действием. В качестве объектов исследования использовали два экстракта из травы астрагала эспарцетного. Первый экстракт астрагала был получен методом реперколяции, в батарее из 3-х диффузоров при соотношении фаз 1:1. Второй вид экстракта астрагала был получен по ресурсосберегающей технологии в батарее из 6-х диффузоров при соотношении фаз 1:1,7. Фактическая эффективность экстрагирования в первом случае составила 40 %; во втором - 75-80 %, соответственно. Полученные экстракты астрагала были использованы для изучения их желчегонной активности и острой токсичности. На фоне однократного введения экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 скорость секреции желчи крыс увеличивалась практически одинаково, на 63% и 67%, соответственно. При введении экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 концентрация желчных кислот в желчи увеличивалась, на 26% и 27%, соответственно; выведение холестерина с желчью ускорялось на 17% и 16%, соответственно. По классификации токсических веществ экстракты астрагала 1:1 и 1:1,7 можно отнести к практически не токсичным объектам.

Ключевые слова: трава астрагала эспарцетного, экстракт, экстракция, желчегонная активность, холестерин, желчные кислоты, анализ, токсичность

STUDY OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACT OF ASTRAGALUS ONOBRYCHIS

Temirbulatova A.M.¹, Galkin M. A. ¹, Hromtsova E. N. ¹, Pogorelyy V.E., Lezhneva L. P. ¹, Shatalova T.A.¹

¹Pyatigorsk medical and pharmaceutical institute, Pyatigorsk branch of the SBEI of HPE Volgograd state medical university, Pyatigorsk, Russia (11, Kalinin ave, Pyatigorsk 357500); e-mail: anna_vladimir@inbox.ru

The purpose of the real work - to show that the extracts of Astragal onobrychis received on the standard and resource-saving technologies possess identical cholagogic action Astragal onobrychis. As objects of research used two extracts from a grass of Astragal onobrychis. The first extract of Astragal onobrychis was received in the battery from 3 diffusers at a ratio of phases 1:1. The second type of extract of Astragal onobrychis was received in the battery from the 6th diffusers at a ratio of phases 1:1,7. The actual efficiency of extraction in the first case made 40%; in the second - 75-80%, respectively. The received extracts of Astragal onobrychis were used for studying of their cholagogic activity and acute toxicity. Against single introduction of extracts of Astragal onobrychis 1:1 and 1:1,7 speeds of secretion of bile of rats increased almost equally, by 63% and 67%, respectively. At introduction of extracts of Astragal onobrychis 1:1 and 1:1,7 concentration of bilious acids in bile increased, for 26% and 27%, respectively; removal of cholesterol with bile was accelerated for 17% and 16%, respectively. On classification of toxic substances extracts of Astragal onobrychis 1:1 and 1:1,7 can be referred to almost not toxic objects.

Keywords: grass of Astragalus onobrychis, extract, extraction, cholagogic action, cholesterol, bilious acids, analysis, toxicity

Изыскание эффективных лекарственных средств является одной из важнейших проблем отечественного здравоохранения. В общем плане разрешения этой задачи большое значение имеет изучение богатейшей флоры нашей страны и использование данных народной медицины. Важным источником для реализации этой цели являются лекарственные растения. Достаточно указать на то, что около половины из 40000 известных

в медицине лекарственных препаратов имеют природное происхождение, большая часть которых получена из растений [4].

Учитывая возрастающую потребность во многих видах лекарственного растительного сырья, актуальным является вопрос о его рациональном использовании, а также поиск новых растительных источников лекарственных средств. Одним из таких средств является трава астрагала эспарцетного (*Astragalus onobrychis* L.).

Химический состав травы астрагала эспарцетного представлен: флавоноидами (кемпферол, кверцетин, изорамнетин, лютеолин, рутин, лютеолин – 3-рутинозид, изокверцетин, гиперозид, астрагалин, цинарозид, астрагалозид, кверцитрин, изорамнетин – 3 – глюкозид, изорамнетин – 3 – рутинозид); фенолкарбоновыми кислотами (кофейная, феруловая, неохлорогеновая, хлорогеновая, п-кумаровая, 3-кумароилхинная, изоферуловая кислота); аминокислотами (аспарагиновая, глутаминовая, пролин, аланин, валин, метионин, изолейцин, лейцин, тирозин, фенилаланин, гистидин, лизин, аргинин); - связанными сахарами (галактоза, глюкоза, арабиноза, ксилоза, рамноза); кумаринами (скополетин, умбеллиферон, скополин)

[6]. Поэтому трава астрагала эспарцетного заслуженно широко применяется в народной медицине при кровотечениях в полости рта и горла, при гинекологических заболеваниях, а также как мочегонное, гипотензивное, желчегонное, гепатозащитное, антисклеротическое, антиоксидантное средство [6].

Цель настоящей работы: показать, что экстракты астрагала эспарцетного, полученные по общепринятой и ресурсосберегающей технологиям, обладают одинаковым желчегонным действием.

Материалы и методика. В качестве объектов исследования использовали два экстракта из травы астрагала эспарцетного, собранной в районе Кавказских Минеральных Вод (гора Машук) в 2014 году. Для их получения была использована реперколяция с завершённым циклом в общепринятом и ресурсосберегающем вариантах [1, 3, 8].

Общепринятый вариант реперколяции с завершённым циклом заключается в противоточном экстрагировании сырья в батарее из 3-х диффузоров, при соотношении фаз 1:1 и степени мелкости сырья около 7 мм. Недостатком данной технологии является то, что она применяется ко всем типам растительного сырья (листья, цветки, плоды, корни), несмотря на то, что они имеют различные технологические свойства (например, коэффициент образования внутреннего сока, коэффициент поглощения сырья и др.) в виду различного анатомического строения органов. В связи с этим эффективность экстрагирования для разных типов сырья может изменяться в несколько раз (например, для травы равна 40 %; а для листьев – 50 %). С целью обеспечения одинаковой и большой

эффективности экстрагирования (до 80 - 90 %) необходимо использование ресурсосберегающего варианта реперколяции, т.е. индивидуальный выбор значения соотношения фаз и увеличение числа ступеней экстракции с трех до пяти-шести [8].

Первый вид экстракта астрагала был получен по общепринятой технологии [6]: методом реперколяции, в батарее из 3-х диффузоров при соотношении фаз 1:1 и степени измельченности сырья не более 7 мм. Второй вид экстракта астрагала был получен по ресурсосберегающей технологии [8]: в батарее из 6-х диффузоров при соотношении фаз 1:1,7 и степени измельченности сырья не более 7 мм. Фактическая эффективность экстрагирования в первом случае составила 40 %; во втором - 75-80 %, соответственно. Показатели качества экстрактов астрагала, полученных разными способами, представлены в таблице 1.

Таблица 1

Показатели качества жидких экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7

Показатели качества	Экстракт 1:1	Экстракт 1:1,7
Содержание сухих веществ, %	13,37±0,45	13,35±0,37
Содержание полифенольных соединений, %	1,42±0,07	1,38±0,06
Содержание этилового спирта, %	63,37±1,89	63,39±1,65
Плотность, г/см ³	0,897±0,036	0,895±0,033

Таким образом, использование ресурсосберегающей технологии позволяет получить из одного и того же количества сырья в 1,7 раза больше экстракта астрагала, чем по общепринятой технологии. Качественный состав экстрактов при этом остается практически одинаковым.

Полученные экстракты астрагала были использованы для изучения их желчегонной активности и острой токсичности. Исследования проведены на специально отобранных крысах-самцах массой 300-400 г. Крыс подвергали этаминаловому наркозу, а затем проводили разрез брюшной полости в эпигастральной области длиной 1,5-3 см. Двенадцатиперсную кишку выше места вхождения в него желчного протока перевязывали и пинцетом выдавливали ее содержимое. Вторую лигатуру накладывали на двенадцатиперсную кишку на 3-5 см ниже места впадения в кишечник желчного протока, создавая изолированный отрезок кишечника – "биологическую пробирку", в которую по неповрежденному желчному протоку изливается желчь. Секрет поджелудочной железы прекращал поступать в кишечник после перевязки ее выводного протока, который выходит в кишечник рядом с желчным протоком. Для восстановления проходимости пищеварительного канала после резекции сегмента кишечника желудок или проксимальный

конец тонкой кишки эластичной трубкой соединяли с дистальным участком. После этого на брюшину накладывали несколько провизорных швов [2]. При анализе учитывали общее количество желчи, выделившееся за 2 часа наблюдения.

Собранную желчь подвергали биохимическому исследованию. Концентрацию желчных кислот и холестерина определяли спектрофотометрически. Используемая методика определения суммарного содержания желчных кислот и холестерина основана на способности предварительно охлажденного 0,1 % раствора хлорного железа в смеси равных объемов ледяной уксусной кислоты и концентрированной серной кислоты реагировать с желчными кислотами и холестерином. При этом образуются продукты с максимумами поглощения при различных длинах волн, что позволяет исключить их взаимное влияние. В данной смеси при комнатной температуре холестерин дает на 15-20 минуте максимальное поглощение при длине волны 480 нм, а желчные кислоты практически не образуют окрашенных продуктов. Они реагируют лишь после нагревания в течение 20 минут при 60°C. Максимальное поглощение наблюдается при 380-390 нм, т.е. в другой части спектра, где влияние холестерина проявляется при соотношении с желчными кислотами 1:2 [2]. Наименьшие различия величин оптических плотностей разных свободных желчных кислот отмечали при 380 нм, связанные желчные кислоты при этих же длинах волн дают меньшие величины оптических плотностей. Эти свойства позволяли определить суммарное содержание желчных кислот. Его рассчитывали по количеству свободных желчных кислот – холевой, хенодезоксихолевой, дезоксихолевой. Литохолевая кислота, содержание которой в желчи незначительно, данным реактивом не выявляется. Растворы холестерина подчиняются закону Ламберта-Бера в пределах 5-30 мг %, а растворы желчных кислот – в пределах 15-150 мг%. Исследование экстрактов астрагала было проведено на 24 крысах. Предварительно животных разделяли на 3 группы. Животным 1-й группы – контроль - вводили физиологический раствор с добавкой этанола, соответственно его содержанию в экстракте астрагала эспарцетного жидкого, 2-й и 3-й группе за 2 часа до начала эксперимента зондом в желудок вливали экстракты астрагала эспарцетного жидкие 1:1 и 1:1,7, соответственно. У всех подопытных крыс на протяжении последующих 2 часов собирали желчь и определяли ее количество.

Для определения желчных кислот – желчь предварительно разводили 96 % этиловым спиртом в 5 раз для 1-й и 3-й порции и в 10-20 раз для 2-й порции и центрифугировали. К 0,1 мл надосадочной жидкости добавляли 3,5 мл реактива (0,1 % раствор хлорного железа (III) в смеси равных объемов ледяной уксусной кислоты и концентрированной серной кислоты). Смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 2 мин. На 20 –й минуте от начала реакции определяли оптическую плотность продуктов реакции

холестерина при 480 нм в кювете с толщиной рабочего слоя 10 мм. На 30-минуте кюветы с раствором помещали в термостат на 20 минут при 60°C. Охлаждали до комнатной температуры в течение 15-20 минут и определяли величину оптической плотности желчных кислот при 385 нм. В качестве раствора сравнения использовали рабочий раствор 0,1 % хлорного железа [7].

Содержание исследуемых компонентов, желчных кислот и холестерина, определяли по формулам 1 и 2, соответственно:

$$C_{\text{ЖК}} = 114 D_{385} \cdot P \quad (1),$$

где $C_{\text{ЖК}}$ - определяемая концентрация желчных кислот, мг %; D_{385} - величина оптической плотности при 385 нм; P - разведение желчи.

$$C_{\text{ХСТ}} = 50 (D_{480} - 0,04 D_{385}) \cdot P \quad (2),$$

где $C_{\text{ХСТ}}$ - определяемая концентрация холестерина, мг %; D_{480} - величина оптической плотности при 480 нм; D_{385} - величина оптической плотности при 385 нм.

Острую токсичность экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 определяли по методу Кербера на четырех группах крыс, каждая из которых состояла из шести животных [5]. Экстракт освобождали от спирта. Высушенный препарат вводили крысам самцам *per os* начиная с дозы 20 мг/кг (не вызывает эффекта гибели ни у одного животного в группе) и заканчивая дозой, максимально возможной технически для введения – 5000 мг/кг. Наблюдение вели в течение двух недель после введения исследуемого объекта. В течение двух недель наблюдали за: двигательной активностью; наличием судорог; тонусом скелетной мускулатуры; дыханием; окраской видимых слизистых оболочек; размером зрачка; количеством и консистенцией фекальных масс; мочеотделением и окраской мочи; координацией движений; реакцией на раздражители; состоянием кожного покрова и шерсти; потреблением воды и пищи; массой тела.

Расчет LD_{50} проводили по формуле (3):

$$LD_{50} = D_{100} - \frac{(dZ)}{m} \quad (3),$$

где LD_{100} - доза, которая вызывала гибель всей группы животных; d - интервал между двумя смежными дозами; Z - среднее арифметическое из числа животных, у которых наблюдалась летальность; m - число животных в группе.

Результаты. Результаты влияния экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 на скорость секреции желчи крыс при однократном введении представлены в таблице 2.

Таблица 2

Влияние экстрактов астрагала эспарцетного жидкого на скорость секреции желчи крыс при однократном введении

Доза, г/кг	Скорость секреции желчи, мг/мин на 100 г массы тела крысы			
	при введении экстракта 1:1,7		при введении экстракта 1:1	
	через 1 час	через 2 часа	Через 1 час	Через 2 часа
0,3	7,0±0,2*	8,9 ± 0,4*	7,1±0,2*	8,7 ± 0,4*
0,5	7,9±0,3*	9,0 ± 0,3*	7,7±0,3*	9,2 ± 0,3*
Контроль	5,7±0,3*	5,5 ± 0,4	5,7±0,3*	5,5 ± 0,4

*-обозначены достоверные сдвиги относительно контроля ($p < 0,05$)

Результаты исследований, представленных в таблице 2, показали, что на фоне однократного введения экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 скорость секреции желчи крыс увеличивалась практически одинаково, на 63% и 67%, соответственно.

Исследования по изучению влияния экстракта астрагала эспарцетного жидкого на показатели функционального состава печени у крыс при однократном введении представлены в таблице 3.

Таблица 3

Влияние экстракта астрагала 1:1 и 1:1,7 на показатели функционального состава печени у крыс при однократном введении

Доза экстракта, г/кг	Экстракт 1:1,7				Экстракт 1:1			
	Желчные кислоты		Холестерин		Желчные кислоты		Холестерин	
	мг/100 г	%	мг/100 г	%	мг/100 г	%	мг/100 г	%
0,3	3,72	118	0,070	109	3,72	118	0,070	109
0,5	3,97	126	0,075	117	3,98	127	0,074	116
Контроль	3,15	100	0,064	100	3,15	100	0,064	100

Результаты исследований, представленных в таблице 3, показали, что на фоне введения экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 концентрация желчных кислот в желчи увеличивалась, на 26% и 27%, соответственно; выведение холестерина с желчью ускорилось на 17% и 16%, соответственно.

В процессе наблюдения за группами крыс при определении острой токсичности экстрактов астрагала не выявлено отклонений по сравнению с контрольной группой животных. Результаты исследований представлены в таблице 4.

Таблица 4

Результаты исследования острой токсичности экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7

Результат, количество животных (M=6)	Доза, мг/кг				
	20	200	400	2000	5000
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	0	0	0	0	
d	180	200		1600	5000

dZ	0	0	0	0
----	---	---	---	---

Таким образом, $LD_{50} = 0 - 0 / 6 = 0$, $LD_{50} > 5000\text{мг/кг}$. По классификации токсических веществ (Hodge Н.С., Sterner Л.Н., 1943; Сидоров К.К., 1974) экстракты астрагала 1:1 и 1:1,7 можно отнести к практически не токсичным объектам.

Выводы

1. Использование ресурсосберегающей технологии позволяет получить из одного и того же количества сырья в 1,7 раза больше экстракта астрагала, чем по общепринятой технологии. Качественный состав экстрактов 1:1 и 1:1,7 при этом остается практически одинаковым.
2. На фоне однократного введения экстрактов астрагала 1:1 и 1:1,7 скорость секреции желчи крыс увеличивается практически одинаково, на 63% и 67%, соответственно; концентрация желчных кислот в желчи возрастает, на 26% и 27%, соответственно; выведение холестерина с желчью ускоряется на 17% и 16%, соответственно.
3. По классификации токсических веществ экстракты астрагала 1:1 и 1:1,7 можно отнести к практически не токсичным объектам.

Список литературы

1. Государственная фармакопея СССР: в 2-х вып.- 11-е изд. - М.: Медицина, 1987 – 1 вып.; 1990.- 2 вып.
2. Изучение влияния отвара и спиртового извлечения травы мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* L.) на секрецию желчи у крыс./Сидакова Т.М., Саджая Л.А., Сергеева Е.О., Попова О.И.//Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.- 2011.- Т. 9. -№ 3.- С. 30-32.
3. Лежнева Л.П. Биофармация – теоретическая основа разработки и стандартизации рациональных лекарственных форм. Монография // Л.П. Лежнева, Л.С. Кузнецова, З.Д. Хаджиева.- Пятигорск : РИА-КМВ, 2011.- 138 с.
4. Разработка технологии и качественного анализа лекарственного средства «Спорт-актив» /Биляч Я.И., Компанцева Е.В., Компанцев Д.В., Кузнецова Л.С., Халиуллин Ф.А. // Башкирский химический журнал.- 2009. -Т. 16.- № 3.- С. 152-156.
5. Определение острой токсичности водного и спиртового извлечений травы мяты длиннолистной (*Mentha longifolia* L.)/Сидакова Т.М., Попова О.И., Саджая Л.А., Сергеева Е.О.//Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. -2011. -Т. 9. -№ 5.- С. 13-15.
6. Романцова Н.А. Решение проблемы ресурсосбережения при получении экстракта жидкого из сбора лекарственного растительного сырья / Н.А. Романцова, Т.Ю.

Манджиголодзе, Л.С. Кузнецова // Известия Самарского науч. центра РАН.-2015.-Т.17.- №5.-С.188-192.

7. Способ получения суммарных субстанций, обладающих желчегонной, гепатозащитной, гипохолестеринемической активностью (варианты) Гужва Н.Н., Оганесян Э.Т., Колпак А.М., Гужва Л.Б. патент на изобретение RUS 2155056 22.03.1999.

8. Шаталова Т.А. Разработка ресурсосберегающей технологии и норм качества экстракта левзеи жидкого. -Автореф. дисс. канд. фармац.наук.- Пятигорск, 1996.-24 с.

Рецензенты:

Степанова Э. Ф. , д.фарм.н., профессор, профессор кафедры технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Пятигорск;

Кузнецов А.В. , д.фарм.н., профессор, профессор кафедры технологии лекарств – Пятигорского медико-фармацевтического института филиала ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Пятигорск.