

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2023.4.26 EDN: WDPMGO

ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ И АНТИАГРЕГАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ МАЛИНЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*RUBUS IDAEUS L.*)© Гуляев Д.К.¹, Белоногова В.Д.¹, Крылова И.Д.², Юлмухаметова Г.Р.², Курбанова Ч.С.²¹Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2²Башкирский государственный медицинский университет, Россия, 450008, Уфа, ул. Ленина, 3*Резюме*

Цель. Определение содержания биологически активных веществ и антиагрегантной активности малины обыкновенной корневищ с корнями.

Методика. Определение суммы полифенольных соединений проводили с реактивом Folin-Ciocalteu. Количественное определение содержания дубильных веществ проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи. Определение содержания процианидинов в малины обыкновенной корневищах с корнями проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера. Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин. Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born.

Результаты. По результатам качественных реакций в малины обыкновенной корневищах с корнями обнаружены сапонины, фенольные соединения, дубильные вещества и полисахариды. По результатам количественного определения установлено, что основной группой биологически активных веществ в корневищах с корнями малины обыкновенной являются дубильные вещества ($9,76 \pm 0,95$) и сапонины ($4,94 \pm 0,35$). Установлено, что сухой водный экстракт малины обыкновенной корневищ с корнями проявляет антиагрегационную активность (таблица 3), которая проявляется удлинением lag-периода и снижением агрегации тромбоцитов.

Заключение. В корневищах с корнями малины обыкновенной преобладают дубильные вещества гидролизуемой группы. Сухой водный экстракт малины обыкновенной корневищ с корнями обладает антиагрегантным действием, превосходящим по силе ацетилсалициловую кислоту.

Ключевые слова: малина обыкновенная, корневища с корнями, дубильные вещества, сапонины, сухой экстракт, антиагрегантная активность

INVESTIGATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES AND ANTIPLATELET ACTIVITY OF UNDERGROUND ORGANS OF RASPBERRIES (*RUBUS IDAEUS L.*)Guljaev D.K.¹, Belonogova V.D.¹, Krylova I.D.², Julmuhametova G.R.², Kurbanova Ch.S.²¹Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Poleyaya St., 614990, Perm, Russia²Bashkir State Medical University, 3, Lenin St., 450008, Ufa, Russia*Abstract*

Objective. Determination of the content of biologically active substances and antiplatelet activity of raspberry ordinary rhizomes with roots.

Methods. The determination of the sum of polyphenolic compounds was carried out with the Folin-Ciocalteu reagent. Quantitative determination of the tannin content was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia. Determination of the content of procyanidins in raspberry ordinary rhizomes with roots was carried out using acid cleavage of procyanidins to anthocyanidins by the Porter method. In vitro experiments were performed on the blood of healthy male donors. The study of the effect on platelet aggregation was carried out using the Born method.

Results. According to the results of qualitative reactions, saponins, phenolic compounds, tannins and polysaccharides were found in ordinary raspberry rhizomes with roots. According to the results of quantitative determination, it was found that the main group of biologically active substances in rhizomes

with raspberry roots are tannins (9.76 ± 0.95) and saponins (4.94 ± 0.35). It was found that the dry aqueous extract of raspberry ordinary rhizome with roots exhibits antiaggregational activity (Table 3), which is manifested by an elongation of the lag period and a decrease in platelet aggregation.

Conclusion. In rhizomes with raspberry roots, tannins of the hydrolyzable group predominate. Dry aqueous extract of raspberry ordinary rhizome with roots has an antiplatelet effect, superior in strength to acetylsalicylic acid.

Keywords: red raspberry, rhizomes with roots, tannins, saponins, dry extract, antiplatelet activity

Введение

Малина обыкновенная (*Rubus idaeus L.*) распространена в лесной зоне по всей территории России от Кавказа до Дальнего Востока и имеет хорошо обеспеченную сырьевую базу. В настоящее время у малины обыкновенной заготавливают плоды для применения в качестве потогонного и жаропонижающего средства. Малина обыкновенная широко распространена в подлеске, где она не перспективна для заготовки плодов, но является огромным сырьевым источником подземных органов, которые издавна применялись в народной медицине и представляют интерес для внедрения в медицинскую практику.

Подземные органы рода *Rubus* и их экстракты в экспериментах обладали противовоспалительной, гепатопротекторной, противораковой активностью [4, 7, 8, 10]. Наши прошлые исследования сухого водного экстракта малины обыкновенной корневищ с корнями позволили установить антидиабетическую активность, сравнимую по выраженности действия с метформином, одним из самых популярных антидиабетических препаратов [1, 2].

При поиске новых возможных видов активности, наше внимание привлекло исследование, где показано как экстракт листьев *Rubus idaeus L.* значительно ингибировал агрегацию тромбоцитов в крови, стимулированной аденозинтрифосфатом [5]. Представляло интерес, определить антиагрегантную активность малины обыкновенной корневищ с корнями.

Антиагрегантное действие растительного сырья и лекарственных растительных препаратов часто связывают с фенолами и полифенольными соединениями [3]. Поэтому, в задачи исследования было включено определение содержания дубильных веществ и полифенолов.

В подземных органах рода *Rubus* обнаружены сапонины. В корнях растения *Rubus innominatus S. Moore.*, производные олеаноловой, урсоловой кислот [4]. В подземных органах *Rubus chingii Hu* обнаружили урсоловую кислоту, зускафиновую кислоту, 1 α -гидроксиэускафиновую кислоту [10]. Широкое распространение сапонинов в подземных органах рода *Rubus* дает основание для исследований по определению их содержания в подземных органах малины обыкновенной.

Цель исследования – определение содержания биологически активных веществ и антиагрегантной активности малины обыкновенной корневищ с корнями.

Методика

Объектами исследования являлись корневища с корнями малины обыкновенной. Подземные органы собирали в октябре 2022 года. Данное сырье было собрано в подлеске смешанного и темнохвойного леса.

Определение суммы полифенольных соединений проводили с реактивом Folin–Ciocalteu [6]. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 0,5 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 60%. Колбу закрывали и взвешивали с погрешностью +0,01 г, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 40 мин, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Колбу с содержимым охлаждали до комнатной температуры, закрывали пробкой, взвешивали с погрешностью +0,01 г и доводили массу спиртом этиловым 60% до первоначальной и перемешивали. Полученный экстракт центрифугировали в течение 5 мин со скоростью 2500 об/мин. Затем готовили разведение экстракта в соотношении 1:1 (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 0,1 мл раствора А, прибавляли 0,5 мл реактива Folin–Ciocalteu, 10 мл воды очищенной и доводили объем раствора до метки 15% раствором

натрия карбоната (раствор Б). Через 40 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора Б на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 760 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения раствор, состоящий из 0,5 мл реактива Folin-Ciocalteu, 10 мл воды очищенной и доведенный 15% раствором натрия карбоната до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Содержание суммы фенольных соединений (X) в пересчете на галловую кислоту и абсолютно сухое сырье, в процентах, вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{C \times V \times V_1 \times 2 \times 100 \times 100}{m \times V_2 \times (100 - W) \times 1000}, \text{ где}$$

C – содержание фенольных соединений в пересчете на галловую кислоту, найденное по калибровочному графику, в мг/мл; V – объем полученного извлечения, в мл; V₁ – объем колбы (25 мл); V₂ – объем пипетки (0,1 мл); 2 – разбавление; m – масса навески, в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %

Количественное определение содержания дубильных веществ проводили в соответствии с ОФС № 1.5.3.008.18 ГФ 14 издания титриметрическим методом, основанным на легкой окисляемости дубильных веществ раствором перманганата калия в присутствии индикатора индигосульфокислоты до золотисто-желтого окрашивания.

Определение содержания процианидинов в малины обыкновенной корневищах с корнями проводили с помощью кислотного расщепления процианидинов до антоцианидинов по методу Портера [13].

Определение содержания сапонинов проводили по следующей методике: сырье измельчали до частиц размером 1 мм. Точную навеску около 1,0 экстрагировали 50 мл спирта этилового 70% в течение 1 часа на водяной бане. Спирт удаляли путем отгонки, после чего водный остаток обрабатывали 10 мл хлороформа. Хлороформную фракцию отделяли и отбрасывали. К очищенному водному остатку прибавляли 3 мл серной кислоты концентрированной и 12 мл уксусной кислоты ледяной. Содержимое колбы нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Образовавшиеся агликаны извлекали хлороформом трехкратно по 10 мл. Хлороформный слой промывали водой порциями по 20 мл в делительной воронке до pH=7. Хлороформ фильтровали через бумажный фильтр, на который помещали 2 г натрия сульфата безводного, в мерную колбу объемом 50 мл; фильтр промывали 10 мл хлороформа. Затем содержимое колбы доводили до метки хлороформом. В мерную пробирку помещали 0,4 мл фильтрата, хлороформ удаляли до сухого остатка при нагревании на водяной бане. К сухому остатку прибавляли серную кислоту, концентрированную до объема 5 мл. Смесь термостатировали при температуре 700°C в течение 1 часа. Измерение оптической плотности проводили на спектрофотометре в кварцевых кюветах с толщиной слоя 1 см при λ=315 нм, в качестве раствора сравнения использовали серную кислоту концентрированную. Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту и абсолютно-сухое сырье вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times V_1 \times V_2}{\varepsilon_{315} \times m \times V_3} \times \frac{100}{(100 - W)}, \text{ где}$$

A – значение оптической плотности; ε – удельный показатель поглощения олеаноловой кислоты, равный 311; m – масса сырья, г; V₁ – объем извлечения, равный 50 мл; V₂ – объем извлечения, взятый для разведения, равный 0,4 мл; V₃ – объем разведения, равный 5 мл

Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин в возрасте 18-24 лет. Общее количество доноров составило 11 человек. Забор крови для исследования соединений в отношении системы гемостаза проводился из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Все тесты проводились на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы – при 3000 об/мин в течение 20 минут. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия).

Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born G.G. (1962) на агрегометре «АТ-02» (НПФ «Медтех», Россия). В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл

производства «Технология-Стандарт» (Россия). Проводили оценку максимальной амплитуды агрегации, скорости агрегации, время достижения максимальной амплитуды и дезагрегацию в присутствии изучаемых соединений при агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. При коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали латентный период, во время которого происходит активация фосфолипазы С (что приводит к образованию вторичных посредников, вследствие чего развивается секреция тромбоцитарных гранул и синтез тромбоксана А₂). Исследуемый экстракт вносили в плазму из расчета 5% от объема реакционной смеси. Антиагрегационная активность пентоксифиллина и ацетилсалициловой кислоты представлена для концентрации 1×10^{-3} М/л.

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 10,0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Выявлено, что вид распределения полученных данных отличается от нормального, поэтому при дальнейшей работе использовались непараметрические методы. Данные представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе работы с растительным сырьем проводят качественные реакции для определения групп биологически активных веществ. Поэтому, нами проведены качественные реакции с отваром малины обыкновенной корневищ с корнями. Отвар готовили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIV издания. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Качественные реакции на основные группы БАВ малины обыкновенной корневищ с корнями

№ п/п	Группа БАВ	Реакция	Ожидаемый эффект	Результат
1.	Кумарины	С 10% раствором NaOH (лактонная проба)	1-я пробирка с NaOH – желтый раствор 2-я пробирка – раствор мутнеет	Отрицательно
2.	Сапонины	Пенообразования	Образование устойчивой пены	Устойчивая пена в пробирке с кислой средой (тритерпеновые сапонины)
3.	Флавоноиды	Проба Синода	Оранжево-красное окрашивание	Отрицательно
		С 2% раствором AlCl ₃	Желтое с желто-зеленой флуоресценцией	Отрицательно
4.	Фенольные соединения	Реакция образования азокрасителя	Окрашивание от оранжевого до вишнево-красного	Красное окрашивание
		С раствором FeCl ₃ , 3%		Желто-оранжевое окрашивание
5.	Дубильные вещества	С 1% раствором ЖАК	Черно-синее или черно-зеленое окрашивание	Черно-синее окрашивание
		С 1% раствором желатина	Муть или белый хлопьевидный осадок	Муть
6.	Полисахариды	С 95% спиртом этиловым	Белый хлопьевидный осадок	Белый хлопьевидный осадок
7.	Алкалоиды	С реактивом Драгендорфа	Оранжевый или красно-бурый осадок	Отрицательно
		С реактивом Вагнера	Бурый осадок	Отрицательно
		С реактивом Бушарда	Бурый осадок	Отрицательно
		С пикриновой кислотой	Желтый осадок	Отрицательно

По результатам качественных реакций в малины обыкновенной корневищах с корнями обнаружены сапонины, фенольные соединения, дубильные вещества и полисахариды. Флавоноиды были не обнаружены, эти данные согласуются с результатами высокоэффективной жидкостной хроматографии сухого водного экстракта малины обыкновенной корневищ с корнями [4]. Определение содержания сапонинов определяли в пересчете на олеаноловую кислоту. Ранее было установлено, что основным агликоном сапонинов в экстракте корневищ с корнями малины обыкновенной является олеаноловая кислота. На ВЭЖХ-УФ хроматограмме экстракта корневищ с корнями малины после гидролиза при 210 нм наблюдается максимум 18,2 мин., что совпадает со временем удерживания стандартного образца олеаноловой кислоты [4]. Результаты количественного определения основных групп БАВ представлены в табл. 2.

Таблица 2. Содержание основных групп биологически активных веществ в малины обыкновенной корневищах с корнями

№	Группа БАВ	Содержание в сырье, %
1.	Сапонины	4,94±0,35
2.	Дубильные вещества	9,76±0,95
3.	Процианидины	2,17±0,2
4.	Сумма фенольных соединений с реактивом Folin-Ciocalteu	7,36±1,34

В результате исследования установлено, что дубильные вещества являются основной группой биологически активных веществ в малины обыкновенной корневищах с корнями. Дубильные вещества представлены преимущественно гидролизуемой группой, на что указывает черное окрашивание с 1% раствором ЖАК и не высокое содержание процианидинов, относящихся к конденсированной группе. Однако, следует учитывать, что окисляются перманганатом калия не только макромолекулы дубильных веществ, но и некоторые другие группы веществ.

На следующем этапе исследования определяли влияние водного экстракта корневищ с корнями малины обыкновенной на агрегацию тромбоцитов в условиях *in vitro*. Результаты исследования представлены в табл. 3.

Таблица 3. Влияние сухого водного экстракта малины обыкновенной корневищ с корнями на показатели агрегации тромбоцитов

№	Вещество	Латентный период, % к контролю	Макс. амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю
1.	Экстракт малины обыкновенной корневищ с корнями	-1,3 (1,0–3,6) †	-20,5 (17,4–21,7) *, #, †	-30,4 (28,5–33,7) *, #	+12,6 (10,5–14,7) *, †
2.	Ацетилсалициловая кислота	-2,1 (1,1–2,6)	-13,7 (10,8–16,4) *	-10,5 (7,6–12,3) *	+10,5 (8,7–13,4) *
3.	Пентоксифиллин	+32,4 (28,7–5,6) **, ##	-48,4 (42,7–56,5) **, ##	-34,9 (28,7–39,6) **	+32,1 (27,6–36,4) **, #

Примечание: * $p < 0,05$ – в сравнении с контролем; # $p < 0,05$ – в сравнении с ацетилсалициловой кислотой; † $p \leq 0,05$ – в сравнении с пентоксифиллином

Установлено, что сухой водный экстракт малины обыкновенной корневищ с корнями проявляет антиагрегационную активность, которая проявляется удлинением lag-периода и снижением агрегации тромбоцитов. Исследуемый экстракт превосходит по уровню антиагрегационной активности ацетилсалициловую кислоту, которая выступала в качестве препарата сравнения.

Заключение

По результатам исследования установлено, что основными группами биологически активных веществ малины обыкновенной корневищ с корнями являются дубильные вещества, сапонины. В сырье преобладают дубильные вещества гидролизуемой группы. Сухой водный экстракт малины обыкновенной корневищ с корнями обладает антиагрегантным действием, превосходящим по силе ацетилсалициловую кислоту.

Литература (references)

1. Гуляев Д.К., Бояршинов В.Д., Белоногова В.Д. и др. Мочегонная активность подземных органов малины обыкновенной // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2022. – Т.21, №1. – С. 181-188. [Guljaev D.K., Bojarshinov V.D., Belonogova V.D. i dr. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2022. – V.21, N1. – P. 181-188. (in Russian)]
2. Гуляев Д.К., Бояршинов В.Д., Белоногова В.Д. и др. Средство, обладающее гипогликемическим действием, полученное из малины обыкновенной корневищ с корнями // Патент РФ на изобретение № 2793328. Опубликовано 31.03.2023. Бюллетень №10. [Guljaev D.K., Bojarshinov V.D., Belonogova V.D. i dr. *Sredstvo, obladajushhee gipoglikemicheskim dejstviem, poluchennoe iz maliny obyknovennoj kornevishh s kornjami*. A remedy with hypoglycemic effect obtained from raspberry ordinary rhizomes with roots // RF patent for invention No. 2793328. Published on 03/31/2023. Bulletin N10. (in Russian)]
3. Alarcon M., Fuentes E., Olate N. et al. Strawberry extract presents antiplatelet activity by inhibition of inflammatory mediator of atherosclerosis // *Platelets*. – 2015. – V.26., N3. – P. 224-229.
4. Chen Z., Tong L., Feng Y. et al. Ursane-type norriterpenes with a five-membered A-ring from *Rubus innominatus* // *Phytochemistry*. – 2015. – V.116. – P. 329-336.
5. Dudzinska D., Bednarska K., Boncler M., etc. The influence of *Rubus idaeus* and *Rubus caesius* leaf extracts on platelet aggregation in whole blood. Cross-talk of platelets and neutrophils, *Platelets*. – 2016. – V.27., N5. – P. 433-439.
6. Gabriel A.A., Vinson J.A., Donnelly P.E. Folin-Ciocalteu reagent for polyphenolic assay // *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. – 2014. – V.3, N8. – P. 147-156.
7. Hong Z., Chen W., Zhao J., etc. Hepatoprotective effects of *Rubus aleaefolius* Poir. and identification of its active constituents // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2010. – 129. – P. 267-272.
8. Li Y., Zhao J., Zheng H., etc. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease with total alkaloids in *Rubus aleaefolius* Poir through regulation of fat metabolism // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2014. – V.2014. – P. 768540.
9. Shi L., Wang J., Yunkai L. Research progress on analysis methods of procyanidins. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci.* 2021. – V.705., N1. – P. 012006.
10. Xie Y.H., Zhou L.J., Luo J.L. et al. Isolation and identification of the structure of chemical components *Rubus chingii* Hu // *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*. – 2013. – V.24. – P. 786-787.

Информация об авторах

Гуляев Дмитрий Константинович – кандидат фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: dkg2014@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: belonogovavd@yandex.ru

Крылова Ирина Дмитриевна – студентка педиатрического факультета ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: i.krylova16@yandex.ru

Юлмухаметова Гульшат Ралифовна – ассистент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: julm-gr@ua.ru

Курбанова Чынара Саидовна – ассистент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: chynara4919@gmail.com

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 15.09.2023

Принята к печати 15.12.2023