

## ЭКСТРАКТ ИЗ ТРАВЫ ЛЮЦЕРНЫ ПОСЕВНОЙ (MEDICAGO SATIVA L.) – ПЕРСПЕКТИВНЫЙ КОРРЕКТОР БЕЛКОВОГО ОБМЕНА

ЕРЕМЕНКО Р.Ф., КОВАЛЕВ С.В., МАЛОШТАН Л.Н., КОВАЛЕВ В.Н.

Национальный фармацевтический университет, Украина

### Резюме.

В данной статье представлены результаты фитохимических и фармакологических исследований потенциального корректора белкового обмена Экстракта из травы люцерны посевной (*Medicago sativa* L.) (ЭТЛП). Фитохимические исследования позволили установить, что ЭТЛП содержит вещества фенольной природы, а именно – гидроксикоричные кислоты: п-кумаровая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая; флавоноиды: кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризоэриол; изофлавоноиды: даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А. Суммарное содержание фенольных соединений в сухом ЭТЛП составляет  $10,41 \pm 0,43\%$ . Наличие этих веществ и определенных ранее 16 аминокислот, в том числе 9 незаменимых, в составе ЭТЛП обосновывают цель фармакологического исследования – изучение влияния ЭТЛП в сравнении с калия оротатом на содержание РНК и ДНК в тканях печени и икроножной мышцы крыс, органах, наиболее нуждающихся в постоянном обновлении белкового баланса. Установлено, что ЭТЛП в дозе 25 мг/кг лучше в 1,1-2,3 раза препарата сравнения калия оротата в дозе 180 мг/кг способствует увеличению содержания ДНК и РНК в тканях печени и икроножной мышцы. Последнее свидетельствует о способности ЭТЛП за счет донорства белковых компонентов (аминокислот и белка) и фенольных соединений, обладающих, как известно антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами, лучше референс-препарата калия оротата индуцировать белоксинтетические процессы и корректировать белковый обмен. *Ключевые слова:* люцерна посевная (*Medicago sativa* L.), семейство бобовые (*Fabaceae*), белки, аминокислоты, фенольные вещества, белковый обмен, ЭТЛП, корректор белкового обмена, ДНК и РНК.

### Abstract.

This article presents the results of the phytochemical and pharmacological studies of protein metabolism potential corrector – extract of alfalfa (*Medicago sativa* L.) grass (EGMS). The phytochemical studies revealed that EGMS contains phenolic substances, namely hydroxycinnamic acids: p-coumaric, ferulic, chlorogenic, neochlorogenic; flavonoids: kaempferol, quercetin, apigenin, luteolin, chrysoeriol; isoflavonoids: daidzein, formononetin, genistein and biochanin A. The total content of phenolic compounds in dry EGMS is  $10,41 \pm 0,43\%$ . The presence of these substances and the previously defined 16 amino acids, including 9 essential ones, in the composition of EGMS justifies the purpose of the pharmacological study - the study of the influence of EGMS compared with potassium orotate on the RNA and DNA content in the liver and gastrocnemius muscle tissues of rats, the organs which most of all need the constant protein balance renovation. It has been found out that EGMS in a dose of 25 mg / kg promotes the increase of the content of DNA and RNA in the liver and gastrocnemius muscle tissues 1,1-2,3 times better than the comparison drug potassium orotate in a dose of 180 mg / kg. The last statement testifies to the ability of EGMS at the expense of the protein components donation (amino acids and protein) and phenolic compounds, known for having antioxidant and membrane stabilizing properties, to induce proteinsynthetic processes and correct protein metabolism better than the reference drug potassium orotate.

*Key words:* alfalfa (*Medicago sativa* L.), the legume family (*Fabaceae*), proteins, amino acids, phenolic substances, protein metabolism, EGMS, corrector of protein metabolism, DNA and RNA.

Известно, что люцерна посевная (*Medicago sativa* L.) семейства бобовых (*Fabaceae*) содержит большое количество белка, аминокислоты (лизин, фенилаланин, изолейцин, метионин, валин, лейцин, треонин,

триптофан, серин, глицин, гистидин, аспарагиновую и глутаминовую кислоты, тирозин, аргинин, аланин [1, 2]), β-каротин, хлорофилл, витамины группы Д, группы В (В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>12</sub>), группы Е, ряд протеолитических ферментов, которые

расщепляют белки и изофлавоноиды [3], за счет чего проявляет широкий спектр фармакологического действия: способствует заживлению эрозий, язв, открытых ран, понижает уровень холестерина и липидов в крови, поддерживает баланс кишечной микрофлоры. Рекомендуются при физическом переутомлении, а также при атеросклерозе, авитаминозе, кроме этого, проявляет противовоспалительное действие, которое обуславливает ее применение при циститах, простатитах, артритах, ревматизме. Действует как анаболик и детоксикант. Используется для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваний сосудов головного мозга, сахарного диабета, гипертонической болезни, гастрита [4]. Благодаря этому люцерна посевная является перспективным источником получения новых лекарственных средств и биологически активных добавок.

Следовательно, в комплексном лечении многих патологических стрессовых состояний необходимо использовать лекарственные средства-корректоры белкового обмена, которые были бы донорами белка и возобновляли, таким образом, белковый баланс в организме. При таких состояниях необходимо адекватное поступление в организм извне структурных компонентов – аминокислот и других биологически активных веществ-корректоров белкового обмена. Источником таких веществ, на наш взгляд, может быть люцерна посевная (*Medicago sativa*) семейства бобовых (*Fabaceae*).

Целью данной работы является обобщение данных о результатах фитохимических и фармакологических исследований экстракта из травы люцерны посевной как потенциального донора белков и аминокислот и перспективного корректора белкового обмена.

## Методы

Траву люцерны посевной исчерпывающе экстрагировали 70% этиловым спиртом, сочетая при этом способ мацерации с последующей термической экстракцией при 85-90°C. Водно-спиртовой экстракт упаривали под вакуумом до густого остатка и оставляли на 10-12 часов при температуре 5-10°C. Темно-зеленый смолистый осадок отделяли фильтрованием. Осадок заливали 300 мл горячей воды и после охлаждения фильтровали. Фильтрат объединяли с водным раствором, выпаривали до 700 мл, добавля-

ли 1,5 л 96% этилового спирта при энергичном взбалтывании и после отстаивания отфильтровывали. Очищенный водный раствор последовательно обрабатывали хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом.

Этилацетатный экстракт упаривали под вакуумом до густого остатка, сгущенный экстракт высушивали на полиамиде и полученный порошок наносили на слой полиамида, сформированный в хлороформе. Хроматографическую колонку элюировали хлороформом и смесью хлороформ – этанол в различных соотношениях. Контроль за разделением осуществляли хроматографией на бумаге в системах н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), 15% уксусная кислота и н-бензол – этилацетат – уксусная кислота – вода (50:50:1:1, формамид – этанол 1:3).

Однородные фракции объединяли, упаривали досуха и кристаллизовали из этанола или метанола. Фракции, содержащие смесь веществ, рехроматографировали на колонках полиамида и полученные вещества дополнительно очищали перекристаллизацией из водного спирта или метанола.

Водное извлечение (ЭТЛП) хроматографировали с помощью бумажной хроматографии с достоверными образцами гидроксикоричных кислот в системах растворителей: I – н-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2) и II – 2% - уксусная кислота с последующей обработкой хроматограмм парами аммиака и диазореактивом. В результате были обнаружены такие гидроксикоричные кислоты, как: хлорогеновая, неохлорогеновая, п-кумаровая, феруловая кислоты. Данные вещества выделены в индивидуальном состоянии методом препаративной бумажной хроматографии и идентифицированы на основании физико-химических особенностей, УФ-спектроскопии и сравнении с достоверными образцами.

Фенольный комплекс из травы люцерны посевной получали следующим образом. Измельченное воздушно-сухое сырье траву люцерны посевной загружают в реактор с паровой рубашкой и мешалкой, заливают горячей водой, температура которой должна быть не менее 70°C, и экстрагируют на протяжении 1,5 часов при периодическом перемешивании, затем фильтруют. Повторную экстракцию проводят, как и предыдущую, но на протяжении 30 минут. Полученные экстракты объединяют и упаривают в вакууме при температуре 90-100°C до получе-

ния сухого порошка. Получают 222,75 г готового продукта. Получен сухой экстракт травы люцерны посевной (ЭТЛП) и определены его физико-химические свойства. С целью объективной стандартизации экстракта из травы люцерны посевной для количественного определения содержания фенольных соединений был использован метод спектрофотометрии в УФ-области. В УФ-спектре лекарственных форм отмечается максимум поглощения фенольных соединений в области 270-272 нм. Этот максимум был использован при разработке методик определения количественного содержания фенольных соединений в перерасчете на галловую кислоту, спектры, поглощения которых совпадают [5, 6]. Проводили хроматографические и химические исследования ЭТЛП. Количественное содержание флавоноидов, гидроксикоричных кислот проводили спектрофотометрическим методом, полифенольных соединений – с помощью перманганатометрии – по ГФ XI издания. Оптическую частоту измеряли в кюветках с толщиной слоя 10 мм с помощью спектрофотометра СФ-46 при соответствующей длине волны. С помощью автоматического аминокислотного анализатора в траве люцерны посевной установили наличие 16 аминокислот, в том числе 9 незаменимых [5, 6].

Учитывая состав биологически активных веществ ЭТЛП целесообразно было исследовать его влияние на содержание нуклеиновых кислот РНК и ДНК в органах, которые больше всего зависят от содержания белка, – печени и поперечнополосатых мышцах, в частности в икроножной мышце [7, 8].

Изучение влияния ЭТЛП на уровень ДНК и РНК проведено на 24 белых нелинейных крысах массой 180-200 г. с соблюдением требований комиссии по биоэтике НФаУ и «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Киев, 2001), которые согласовываются с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (Страсбург, 1986) [9]. Животных рандомизировали по группам по 8 голов следующим образом: 1 – интактный контроль (ИК); 2 – опытная, которым вводили ЭТЛП в дозе 25 мг/кг; 3 – опытная, которым вводили калия оротат (КО) производства ЗАО НПЦ «Борщаговский ХФЗ» (г. Киев), в дозе 180 мг/кг. Исследуемый ЭТЛП и препарат сравнения вводили внутривентрикулярно в дозах,

которые отмечены выше, в течение 28 суток [9]. По окончании опыта всех животных взвешивали, наркотизировали тиопенталом натрия (в дозе 50 мг/кг) и выводили из эксперимента путем декапитации. Определяли массу и массовый коэффициент (МК) печени, икроножной мышцы и содержание в них ДНК и РНК спектрофотометрическим методом [10, 11]. Результаты обрабатывали статистически с использованием параметрических и непараметрических методов с помощью программы «Statistica 6.0» [12].

### Результаты и обсуждение

Полученный сухой экстракт (ЭТЛП) представляет собой порошок от светло-коричневого до темно-коричневого цвета с приятным специфическим запахом, горьким вкусом, хорошо растворим в воде, водных растворах спирта, плохо растворим в этаноле, не растворим в органических растворителях эфире, хлороформе, бензоле.

В результате хроматографического и химического исследований ЭТЛП установлено наличие в нем таких групп фенольных соединений как гидроксикоричные кислоты, кумарины, эуфлавоноиды, изофлавоноиды и дубильные вещества конденсированной природы. При разделении продуктов кислотного гидролиза фенольного комплекса на колонке полиамидного сорбента с использованием в качестве растворителя хлороформа и его смеси со спиртом были выделены вещества фенольной природы – гидроксикоричные кислоты: п-кумаровая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая; эуфлавоноиды: кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризоэриол; изофлавоноиды: даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А [6].

Суммарное содержание фенольных соединений в траве люцерны посевной составляет 3,49%, из них гидроксикоричных кислот –  $1,37 \pm 0,03\%$ , флавоноидов –  $0,71 \pm 0,03\%$  и полифенолов –  $1,41 \pm 0,05\%$ . Содержание фенольных соединений в сухом экстракте (ЭТЛП) составляет  $10,41 \pm 0,43\%$ .

Нуклеиновые кислоты рибонуклеиновая (РНК) и дезоксирибонуклеиновая (ДНК) являются высокомолекулярными соединениями, которые выполняют уникальную функцию по сохранению и передаче наследственной информации, принимая участие в механизмах ее реализации путем программирования матричного

синтеза всех белков индивидуального организма. Сначала под контролем ДНК синтезируется РНК в ядре клетки, а затем РНК поступает в цитоплазму, где выполняет роль матрицы в синтезе белка [7, 8].

Анализ полученных результатов, представленных в таблицах 1 и 2, свидетельствует о том, что ЭТЛП в дозе 25 мг/кг лучше препарата сравнения КО в дозе 180 мг/кг индуцирует белковый обмен в группе опытных крыс, способствуя увеличению содержания ДНК и РНК в тканях печени и икроножной мышцы.

Под влиянием препарата сравнения калия оротата в дозе 180 мг/кг масса и массовый коэффициент икроножной мышцы увеличивается по сравнению с группой ИК в 1,2 раза, а под действием ЭТЛП в дозе 25 мг/кг – в 1,3 раза (табл. 1). Однако достоверные относительно группы ИК изменения массы и массового коэффициента икроножной мышцы наблюдаются только под влиянием ЭТЛП в дозе 25 мг/кг и их значения превышают значения препарата сравнения КО на 11% (табл. 1). Достоверно относительно группы ИК и на одном уровне повышается масса и массовый коэффициент печени под влиянием референс-препарата КО в дозе 180 мг/кг на 15%, а под влиянием ЭТЛП в дозе 25 мг/кг – на 14% (табл. 1).

По данным таблицы 2 видно, что ЭТЛП в дозе 25 мг/кг способствует достоверному относительно группы ИК увеличению уровня ДНК и РНК в печени на 124% и на 24,5 % соответственно, а в икроножной мышце – на 82% и на 72% соответственно. Под влиянием препарата сравнения КО в дозе 180 мг/кг достоверно относительно группы ИК повышается только содержание РНК на 22% в печени и на 31% - в икроножной мышце, а содержание ДНК увеличивается недостоверно в печени – на 63% и в икроножной мышце – на 45% (табл. 2).

Таким образом, ЭТЛП в дозе 25 мг/кг лучше в 1,1-2,3 раза препарата сравнения калия оротата в дозе 180 мг/кг способствует увеличению содержания ДНК и РНК в таких органах, как печень и икроножная мышца, что свидетельствует о способности ЭТЛП лучше по сравнению с референс-препаратом калия оротата индуцировать белоксинтетические процессы и корректировать белковый обмен.

### Заключение

Фитохимические исследования позволили установить, что экстракт из травы люцерны посевной (ЭТЛП) (*Medicago sativa* L.) содержит ве-

Таблица 1 – Влияние экстракта травы люцерны посевной и референс-препарата калия оротат на массу и массовый коэффициент печени и икроножной мышцы

Условия опыта	Масса печени, г	Массовый коэффициент печени, %	Масса икроножной мышцы, г	Массовый коэффициент икроножной мышцы, %
Интактный контроль (ИК)	5,95±0,22	3,18±0,07	1,11±0,02	0,56±0,04
ЭТЛП, 25 мг/кг	6,78±0,08*	3,43±0,09*	1,44±0,03*	0,73±0,02*
Калия оротат (КО), 180 мг/кг	6,86±0,17*	3,60±0,13*	1,30±0,02	0,68±0,03

Примечания: \* – отклонение показателя достоверно относительно группы ИК, p≤0,05.

Таблица 2 – Влияние экстракта травы люцерны посевной и референс-препарата калия оротат на содержание ДНК и РНК в тканях печени и икроножной мышцы

Условия опыта	Печень		Икроножная мышца	
	ДНК, мкг/100 мг	РНК, мкг/100 мг	ДНК, мкг/100 мг	РНК, мкг/100 мг
Интактный контроль (ИК)	21,59±0,63	61,12±2,61	4,39±0,65	13,01±1,09
ЭТЛП, 25 мг/кг	48,37±6,99*	76,09±1,58*	7,98±0,79*	22,42±0,82*
Калия оротат (КО), 180 мг/кг	35,16±7,09	74,48±2,08*	6,36±0,72	17,05±0,71*

Примечания: \* – отклонение показателя достоверно относительно группы ИК, p≤0,05.



щества фенольной природы, а именно – гидроксикоричные кислоты: п-кумаровая, феруловая, хлорогеновая, неохлорогеновая; флавоноиды: кемпферол, кверцетин, апигенин, лютеолин, хризоеириол; изофлавоноиды: даидзеин, формонетин, генистеин и биоханин А. Суммарное содержание фенольных соединений в сухом ЭТЛП составляет  $10,41 \pm 0,43\%$ .

По результатам фармакологического исследования установлено, что достоверные относительно группы ИК изменения массы и массового коэффициента икроножной мышцы наблюдаются только под влиянием ЭТЛП в дозе 25 мг/кг и их значения превышают значения препарата сравнения КО в дозе 180 мг/кг на 11%. ЭТЛП в дозе 25 мг/кг и референсный калия оротат в дозе 180 мг/кг равномерно и достоверно относительно группы ИК способствуют росту массы и массового коэффициента печени на 14% и 15% соответственно. В работе показано, что ЭТЛП в дозе 25 мг/кг лучше в 1,1-2,3 раза препарата сравнения калия оротата в дозе 180 мг/кг способствует увеличению содержания ДНК и РНК в таких органах, наиболее нуждающихся в постоянном обновлении белкового баланса, как печень и икроножная мышца. Последнее свидетельствует о способности ЭТЛП за счет донорства белковых компонентов (аминокислот и белка) и фенольных соединений, обладающих, как известно антиоксидантными и мембраностабилизирующими свойствами, лучше референс-препарата калия оротата индуцировать белоксинтетические процессы и корректировать белковый обмен.

### Литература

1. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1.

- Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts / A. Stochmal [et al.] // *J. Agric Food Chem.* – 2001 Feb. – Vol. 49, N 2. – P. 753-758.
2. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 2. Tricin and chrysoeriol glycosides from aerial parts / A. Stochmal [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2001 Nov. – Vol. 49, N 11. – P. 5310-5314.
3. Пат. 27307 Україна, мпк А 61 К 36/48, А 61 К 135/00. Спосіб одержання засобу з анаболічною активністю / С. В. Ковальов [та ін.]. – № а 200706670 ; заявл. 14.06.07 ; опубл. 25.10.07. – 2 с.
4. Timbekova, A. E. Chemistry and biological activity of triterpenoid glycosides from *Medicago sativa* / A. E. Timbekova, M. I. Isaev, N. K. Abubakirov // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1996. – V. 405. – P. 171-182.
5. Ковальов, С. В. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С. В. Ковальов [та ін.] // *Фармацевтичний часопис.* – 2008. – № 2 (6). – С. 27-30.
6. Ковальов, С. В. Хімічне дослідження ліпофільної фракції трави люцерни посівної / С. В. Ковальов // *Вісник фармації.* – 2008. – № 4 (56). – С. 21-24.
7. Загайко, А. Л. Функціональна біохімія : навч. посіб. для студ. вищ. фармац. навч. закл. і фармац. ф-тів вищ. мед. навч. закл. IV рівня акредитації / А. Л. Загайко, Л. М. Вороніна, М. В. Волощенко. – Х. : НФАУ, 2010. – 220 с.
8. Патология белкового обмена / М. М. Миннебаев [и др.]. – Казань, 2006. – 20 с.
9. Доклінічні дослідження лікарських засобів / за ред. член-кор. АМН України О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2001. – 528 с.
10. Спириин, А. С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот / А. С. Спириин // *Биохимия.* – 1958. – Т. 23, вып. 5. – С. 656-662.
11. Експериментальне вивчення нових анаболічних засобів : метод. рек. / Л. В. Яковлева [та ін.]. – Київ, 2007. – 32 с.
12. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. – М. : Практика, 1998. – 459 с.

Поступила 07.04.2014 г.

Принята в печать 09.06.2014 г.

### Сведения об авторах:

Еременко Р.Ф. – к.б.н., доцент кафедры физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, Украина;

Ковалев С.В. – д.ф.н., доцент кафедры нутрициологии и фармацевтической броматологии Национального фармацевтического университета, Украина;

Малоштан Л.Н. – д.б.н., профессор, зав. кафедрой физиологии и анатомии человека Национального фармацевтического университета, Украина;

Ковалев В.Н. – д.ф.н., заслуженный деятель науки и техники Украины, профессор кафедры фармакогнозии Национального фармацевтического университета, Украина.

Адрес для корреспонденции: 61002, Украина, г. Харьков, ул. Мельникова, 12, Национальный фармацевтический университет, кафедра физиологии и анатомии человека. E-mail: fuatovna@ Rambler.ru – Еременко Римма Фуатовна.