



Дальневосточный медицинский журнал. 2022. № 2
Far Eastern Medical Journal. 2022. № 2

Оригинальное исследование
УДК 615.322
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-2-9>

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ ЭКСТРАКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ, ФЛАВОНОИДОВ В ЭКСТРАКТЕ ШИКШИ ЧЕРНОЙ И УСТАНОВЛЕНИЕ ЕГО ТОКСИЧНОСТИ

Наталья Васильевна Плаксен^{1✉}, Любовь Викторовна Устинова², Сергей Викторович Степанов³,
Светлана Григорьевна Пономарчук⁴, Анастасия Александровна Саликова⁵,
Ольга Михайловна Степачева⁶, Артем Юрьевич Маняхин⁷

¹⁻⁶Тихоокеанский государственный медицинский университет, Владивосток, Россия

^{1✉}natalya.plaksen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6885-004X>

²ustinova.lubov@ustinov.com

³natalya.plaksen@mail.ru

⁴ponomarchuk.60@mail.ru

⁵a.salikova1992@bk.ru

⁶stepacheva.o Olga@mail.ru

⁷Лаборатория лекарственных растений Федерального научного центра биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН, Владивосток, Россия, tau84@mail.ru

Аннотация. При разработке нового лекарственного средства растительного происхождения требуется определить его состав и безопасность. Установлено содержание суммы экстрактивных веществ и флавоноидов по методике ГФ XIV издания. При введении через зонд экстракта шикши черной в дозах от 60 мг/20 г до 110 мг/20 г острой токсичности не выявлено, LD₅₀ не установили, в связи с отсутствием летальности. Экстракт побегов шикши черной (*Empetrum nigrum* L.), согласно ГОСТ 12.1.007-76, отнесен к классу малоопасных веществ. Отклонения стандартных показателей биохимических и клинических анализов при введении экстракта шикши в максимальной дозе в течение 30 дней были в пределах нормы.

Ключевые слова: экстракт жидкий, безопасность, флавоноиды, *Empetrum nigrum*

Для цитирования: Определение содержания экстрактивных веществ, флавоноидов в экстракте шикши черной и установление его токсичности / Н.В. Плаксен, Л.В. Устинова, С.В. Степанов и др. // Дальневосточный медицинский журнал. – 2022. – № 2. – С. 51-56. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-2-9>.

THE STUDY OF COMPOSITION, ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF LIQUID EXTRACT OF HERBS OF EMPETRUM NIGRUM

Natalia V. Plaksen^{1✉}, Lyubov V. Ustinova², Sergey V. Stepanov³, Svetlana G. Ponomarchuk⁴,
Anastasia A. Salikova⁵, Olga M. Stepacheva⁶, Artem Y. Manyakhin⁷

¹⁻⁶Pacific State Medical University, Vladivostok, Russia

^{1✉}natalya.plaksen@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6885-004X>

²ustinova.lubov@ustinov.com

³natalya.plaksen@mail.ru

⁴ponomarchuk.60@mail.ru

⁵a.salikova1992@bk.ru

⁶stepacheva.o Olga@mail.ru

⁷Laboratory of medicinal plants, Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity FEB RAS, Vladivostok, Russia

Abstract. The development of a new herbal medicinal product requires determination of its composition and safety. The content of the sum of extracted substances and flavonoids was determined according to the method proposed by the State Pharmacopoeia of the XIV edition. No acute toxicity was detected when the *Empetrum nigrum* extract was injected through a probe in doses from 60 mg / 20 g to 110 mg / 20 g, LD50 was not revealed. *Empetrum nigrum* herb

extract according to GOST 12.1.007-76 is classified as low-risk substance. Abstract deviations of standard indicators of biochemical and clinical analyzes with the introduction of *Empetrum nigrum* extract at a maximum dose for 30 days were within normal limits.

Keywords: liquid extract, safety, flavonoids, *Empetrum nigrum*

For citation: The study of composition, acute and chronic toxicity of liquid extract of herbs of *empetrum nigrum* / N.V. Plaksen, L.V. Ustinova, S.V. Stepanov, et al. // Far Eastern medical journal. – 2022. – № 2. – P. 51-56. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-2-9>.

Поиск природных регуляторов алиментарно-зависимых заболеваний, протекающих с нарушением углеводного, липидного обмена, обоснован нарастанием этих патологий в популяции. Наше внимание привлекла шикша черная (*Empetrum nigrum* L.) из семейства Вересковых (*Ericaceae*), обладающая многогранностью эффектов, в том числе и коррекцией метаболических нарушений [1, 7].

Шикша черная – это ягодное растение, ее плоды съедобны и являются частью рациона коренных народов Севера, так как утоляют жажду, обладают противцинготным, мочегонным свойствами, препятствуют утомляемости. В наших предыдущих исследованиях

на модели аллоксанового диабета у экспериментальных животных подтверждена гипогликемическая активность сока надземных частей шикши черной [12].

Сведений о получении лекарственных средств из надземной части шикши черной в доступной литературе не обнаружено, что дало нам основание для разработки технологий изготовления экстракта из данного объекта и установление его безопасности.

Цель исследования: определение содержания суммы экстрактивных веществ и флавоноидов, установление токсичности (острой и хронической) экстракта побегов шикши черной.

Материалы и методы

Объект исследования – экстракт из побегов шикши черной, полученный методом реперколяции на спирте этиловом 70 %.

Для получения экстракта были использованы 6 партий побегов шикши черной, собранных в 2020 году в Камчатском крае в фазу цветения растения. Побеги представляют собой 2-3-летние веточки, покрытые темно-пурпуровой или коричнево-каштановой корой. На стеблях густо расположены мутовчатые, реже очередные, мелкие (до 5 мм длиной, 1,5 мм шириной) листочки, похожие на хвоинки, соотношение стеблей и листочков в побегах по массе 1:1 [11].

Определение содержания суммы экстрактивных веществ проводили по методу 2, изложенному в ГФ XIV издания [6].

Содержание флавоноидов в экстракте побегов шикши черной определяли методом дифференциальной спектрофотометрии на спектрофотометре UNICO 2800 UV/VIS (США) при $\lambda=410$ нм по методике, разработанной для анализа противодиабетического экстракта [15].

Стандартом для определения суммы флавоноидов выбрали рутин, максимумы поглощения комплексов экстрактов шикши черной с AlCl_3 имели близкие значения с комплексом рутина с AlCl_3 ($\lambda_{\text{max}}=410\pm 2$) (рис. 1).

Статистическая обработка результатов количественного определения биологически активных веществ в объектах исследования проводилась согласно требованиям ОФС.1.1.0013.15 ГФ XIV издания [6].

Полученный жидкий экстракт шикши черной предварительно выпаривали на ротационном испарителе UL-2000E при температуре не выше 40-50 °С для удаления экстрагента.

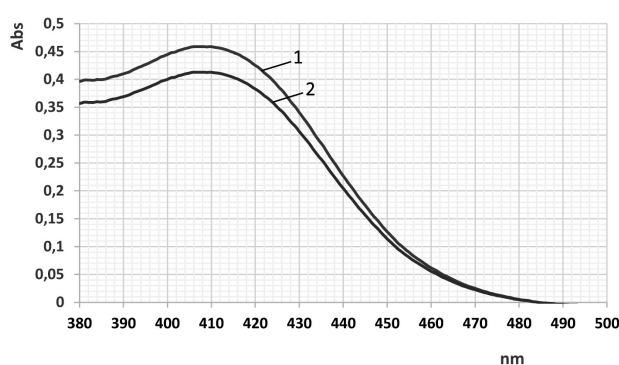


Рис. 1. Дифференциальные спектры поглощения: 1 – СО рутина с AlCl_3 ; 2 – жидкого экстракта побегов шикши черной на 70 % этиловом спирте с AlCl_3 .

Определение острой и хронической токсичности проводили на половозрелых 80 белых мышах обоего пола линии ICR (CD-1) возраста 3 месяца на базе вивария «Центра гигиены и эпидемиологии в Приморском крае». При определении острой токсичности мыши были рандомизировано разбиты на 6 групп. Во время проведения эксперимента соблюдали карантин (14 дней) и стандартные операционные процедуры (СОП) обращения с животными [3]. Питание [4], прием воды [5], световой режим, температура и влажность контролировали согласно разработанным нормативам [3, 13, 14].

Дозы исследуемого объекта для введения животным готовили путём разведения экстракта шикши черной в очищенной воде и вводили внутрижелудочно в объеме 2 мл/300 г массы тела с помощью зонда, что приближает к пероральному способу введения [10]. При этом учитывали, что максимально возможное



введение составляет 0,5 мл/20 г (мышам) с интервалом не менее 30 мин.

Согласно инструкции, в первый день после введения экстракта шикши опытные животные находились под непрерывным наблюдением в открытом поле по методике Hall, регистрировалось поведение животных (вегетативные и ориентировочные реакции), внешний вид (состояние шерстного покрова, глаз, ушных раковин, слизистых оболочек), в остальные 14 суток параметры определяли однократно в день [10].

Установление хронической токсичности требует более длительного наблюдения. Введение экстракта животным внутрижелудочно и наблюдение проводили в течение 30 суток. Интактная группа (1-я) или биологический контроль находилась на стандартной диете. Опытная группа (2-я) получала экстракт в дозе

110 мг/20 г с интервалом 30 минут. Животные биологического контроля получали идентичный объем воды очищенной. В каждой группе было по 9 особей.

Функциональное состояние внутренних органов и процесса обмена веществ оценивали по содержанию основных биохимических показателей с помощью анализатора Mindray BS – 480, гематологических показателей крови – на гематологическом анализаторе Sysmex XS-1000i.

Обработка полученных данных проводилась методом малой выборки с вычислением среднего значения и статистической ошибки среднего значения. Сравнения цифровых показателей производили по t-критерию Стьюдента при уровне значимости нулевой гипотезы ($p \leq 0,05$), для установления взаимосвязи между полученными показателями использовали выборочный коэффициент корреляции [8].

Результаты и обсуждение

Жидкий экстракт травы шикши черной представляет собой желтую жидкость со специфическим смолянистым запахом. В жидком экстракте побегов шикши черной определяли экстрактивные вещества и флавоноиды в пересчете на рутин (табл. 1).

Таблица 1 – Содержание суммы БАВ в жидком экстракте побегов шикши черной

Объект	Содержание суммы экстрактивных веществ, %	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %
Экстракт побегов шикши черной, n=6	21,70±0,11	0,46±0,002

Однократное введение экстракта побегов шикши черной мышам в дозах от минимальной 60 мг/20 г до максимальной 110 мг/20 г массы тела животного не вызывало гибели мышей.

Не выявлены отклонения в ориентации (горизонтальный и вертикальный компоненты) в открытом поле при сравнении с интактной группой. Вегетативные функции (частота и оформление фекальных масс, количество и цвет мочи), глубина и частота дыхательных движений сохранялись в пределах нормы на протяжении периода наблюдений.

Слезотечение, выделения из ушей и носа, слюнотечение или сухости слизистых не наблюдались. Тонус мускулатуры у всех мышей был умеренным, конечности в норме. Шерстный покров имел нормальный блеск, обычной густоты.

Результаты проведенных исследований позволяют отнести исследуемый экспериментальный препарат (экстракт побегов шикши) к классу малоопасных веществ [2].

Этот вывод подтверждает уровень биохимических показателей, который колебался в пределах физиологической нормы (табл. 2, 3).

Данные по влиянию экстракта на показатели, характеризующие функции почек, представлены в

таблице 3. Отклонений от группы биологического контроля не наблюдали.

Таблица 2 – Влияние длительного введения экстракта побегов шикши черной на биохимические показатели функции печени мышей (Мм)

Группы, количество мышей	Общий билирубин, ммоль/л	Холестерин, ммоль/л	АЛТ*, ед/л	АСТ*, ед/л	Триглицериды, ммоль/л
1-я группа, n=9	1,38±0,14	2,0±0,3	38,5±2,6	317,26±40,1	0,70±0,08
2-я группа, n=9	1,36±0,14	2,3±0,4	45,5±4,0	350,6±39,1	0,72±0,03

Примечание. *АЛТ – аланинаминотрансфераза, **АСТ – аспаратаминотрансфераза.

Таблица 3 – Влияние длительного введения экстракта побегов шикши черной на биохимические показатели функции почек мышей (Мм)

Группы, количество мышей	Мочевая кислота, ммоль/л	Мочевина, ммоль/л	Креатинин, ммоль/л	Общий белок, г/л	ЛДГ* ед/л
1-я группа, n=9	130,0±20,0	8,35±0,8	33,0±3,0	41,4±0,4	4010,0±390,3
2-я группа, n=9	145,6±23,0	8,36±0,9	38,3±3,5	50,2±0,4	3781,4±387,7

Примечание. *ЛДГ – лактатдегидрогеназа.

Определены особенности действия алиментарного фактора на показатели крови, так содержание гемоглобина (HGB) в группе биологического контроля – 123,0±10,1 г/л; при приеме экстракта шикши черной – 129,2±6,7 г/л, то есть без достоверных различий.

Количество эритроцитов в интактной группе $8,1 \pm 0,1 \times 10^{12}/л$; в группе, принимающей экстракт травы шикши – $8,5 \pm 0,1 \times 10^{12}/л$. Коэффициент корреляции между гемоглобином и эритроцитами

в опытной группе $r=0,88$, в интактной – $r=0,90$, т. е. сильный однонаправленный. О содержании в эритроцитах гемоглобина судят по цветовому показателю или фарб-индексу. В опытной группе цветной показатель $0,45 \pm 0,007$, в интактной группе – $0,45 \pm 0,001$. Коэффициент корреляции между гемоглобином и цветным показателем $r=0,79$ в опытной группе, в интактной – $r=0,80$.

Все остальные показатели, представленные в таблице 4, также не выходят за пределы нормы и согласуются с литературными данными [9]. Отмечается высокая однонаправленная корреляция между средним объемом эритроцитов (MCV) и средним содержанием гемоглобина в эритроците ($r=0,92$), сильная разнонаправленная связь MCV со средней концентрацией гемоглобина в эритроците ($r=-0,94$) в опытной группе.

Таблица 4 – Основные показатели «красной» крови мышей после введения экстракта побегов шикши черной в эксперименте ($M \pm m$)

Группы, количество мышей	Средний объем эритроцитов (MCV), фл	Среднее содержание гемоглобина в эритроците (MCH), пг	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (MCHC), %	Ширина распределения эритроцитов по объемам (RDW), фл
1-я группа, n=9	46,9 $\pm$ 1,5	15,1 $\pm$ 0,2	321,8 $\pm$ 4,9	30,6 $\pm$ 1,5
2-я группа, n=9	46,5 $\pm$ 0,5	15,4 $\pm$ 0,1	327,0 $\pm$ 3,9	29,2 $\pm$ 2,0

При введении экстракта побегов шикши черной установленные показатели тромбоцитов не менялись

(табл. 5). Отмечена сильная однонаправленная корреляционная связь между количеством тромбоцитов и средним объемом тромбоцитов ($r=0,75$) и разнонаправленная с распределением тромбоцитов по объему ($r=-0,69$) в опытной группе мышей, что соизмеримо с интактной группой.

Таблица 5 – Основные показатели тромбоцитов крови мышей после введения экстракта побегов шикши черной в эксперименте ($M \pm m$)

Группы, количество мышей	Тромбоциты (PLT), $10^3/\text{мм}^3$	Средний объем тромбоцитов (MPV), фл	Распределение тромбоцитов по объему (PDW), %	Тромбокрит (PCT), %
1-группа, n=9	775,2 $\pm$ 81,4	6,9 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,3	0,54 $\pm$ 0,05
2-группа, n=9	803,2 $\pm$ 61,0	6,8 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 0,5	0,51 $\pm$ 0,02

Использование грызунов категории SPF снижает вариабельность изучаемых показателей. Соотношение различных видов лейкоцитов имеет клиническое значение для оценки активности иммунной системы. Данные лейкоцитарной формулы в таблице 6 согласуются с литературными данными [9].

Таблица 6 – Анализ лейкоцитарной формулы у мышей после введения экстракта побегов шикши ($M \pm m$)

Группы, количество мышей	Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	Эозинофилы, %	Нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Базофилы, %
1-я группа, n=9	3,0 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,02	92,3 $\pm$ 4,0	0,7 $\pm$ 0,07	4,0 $\pm$ 0,03
2-я группа, n=9	3,7 $\pm$ 0,4	0	2,0 $\pm$ 0,02	93,0 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,08	4,2 $\pm$ 0,04

Выводы

1. Определена сумма экстрактивных веществ и сумма флавоноидов в пересчете на рутин в жидком экстракте побегов шикши черной.

2. При энтеральном введении лабораторным мышам CD-1 (самки и самцы) экстракта побегов шикши в дозах от 60 мг/20 г до 110 мг/20 г летальность отсутствовала, что не позволило установить LD_{50} , поэтому, согласно государственным стандартам, экстракт побегов шикши можно отнести к категории нетоксических субстанций [2].

3. Не выявлено нарушений функционирования внутренних органов (печени и почек) по биохими-

ческим показателям крови при длительном приеме экстракта побегов шикши черной.

4. Состояние иммунной и свёртывающей систем, насыщение организма кислородом находятся в пределах нормы.

Полученные данные подтверждают наличие потенциала у водно-спиртового экстракта шикши черной в качестве корректора метаболических нарушений и перспективность исследований по дальнейшему изучению активности экстракта для получения на его основе безопасного эффективного лекарственного средства.

Список источников

- Барнаулов О.Д. Сравнительная оценка влияния фитопрепаратов из растений флоры России на концентрацию инсулина и глюкозы в крови крыс с экспериментальным аллоксановым диабетом // Психофармакология и биологическая наркология. – 2008. – Т. 8, № 3-4. – С. 2484-2490.
- ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – 2 с.
- ГОСТ 33216-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами (перезд.). Введ. 2016-07-01. – М.: Стандартинформ, 2019. – 24 с.



4. ГОСТ 34566-2019. Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия. Введ. 2020-10-01. – М.: Стандартинформ, 2019. – 14 с.
5. ГОСТ Р 51232-98. Вода питьевая. Общие требования к организации и методам контроля качества. – М.: ИПК Издательство стандартов. – 1999.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (Accessed September 3, 2021).
7. Колдаев В.М., Кропотов А.В. Основные приемы статистики в медико-биологических исследованиях. – Владивосток: Медицина ДВ. – 2019. – 104 с.
8. Колдаев В.М., Кропотов А.В. Антоцианы в практической медицине // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2021. – № 3. – С. 24-28.
9. Кравченко И.Н., Хохлова О.Н., Кравченко Н.Н., Пужалин А.Н., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н. Гематологические показатели свободных от патогенной флоры крыс CD (SPRAGUE DAWLEY) и мышей CD 1 в норме // Биомедицина. – 2008. – № 2. – С. 20-30.
10. Лобанова И.Ю., Турецкова В.Ф., Зверев Я.Ф., Талалаева О.С., Лобанова И. Ю. и др. Изучение острой токсичности и антиоксидантной активности экстракта листьев осины сухого // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 9. – С. 308-312.
11. Никитин А.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений. – М.: Наука, 1982. – 182 с.
12. Плаксен Н. В., Устинова Л.В., Пономарчук С.Г. и др. Биохимические маркеры влияния сока шикши черной (*Empetrum nigrum*) на течение аллоксанового диабета // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2021. – № 3 (85). – С. 59-62.
13. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
14. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Ерёмин Н.В., Дурнев А.Д. Опыт проведения клинко-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 1: гематологические исследования) // Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения. – 2019. – Т. 9, № 3. – С. 197-206.
15. Фогт В.П., Степанова Т.А. Содержание флавоноидов в противодиабетическом экстракте // Фармация. – 2007. – № 4. – С. 24-25.

References

1. Barnaulov O.D. The comparative estimation of the influence of drugs from Russian flora plants on insuline and glucose blood levels in alloxane-diabetic rats // Psychopharmacology and biological narcology. – 2008. – Vol. 8, № 3-4. – P. 2484-2490.
2. GOST 12.1.007-76. Harmful substances. Classification and the general requirements of safety. – 2 p.
3. GOST 33216-2014 Guidelines for the maintenance and care of laboratory animals. Rules for keeping and caring for laboratory rodents and rabbits (Republished). Introduct. 2016-07-01. – М.: Standartinform, 2019. – 24 p.
4. GOST 34566-2019. Compound feed for laboratory animals. Specifications. Introduct. 2020-10-01. – М.: Standartinform, 2019. – 14 p.
5. GOST R 51232-98. Drinking water. General requirements for organization and quality control methods. – М.: PPC Izdatelstvo standartov, 1999.
6. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIV edition. URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (Date of access: September 3, 2021).
7. Koldaev V.M., Kropotov A.V. Basic methods of statistics in biomedical research. – Vladivostok: Medicine DV, 2019. – 104 p.
8. Koldaev V.M., Kropotov A.V. Anthocyanins in practical medicine // Pacific Medical Journal. – 2021. – № 3. – P. 24-28.
9. Kravchenko I.N., Khokhlova O.N., Kravchenko N.N., Puzhalin A.N., Dyachenko I.A., Murashev A.N. Hematological charactres of normal specific pathogen-free CD (SPRAGUE – DAWLEY) rats and CD-1 mice // Biomedicine. – 2008. – № 2. – P. 20-30.
10. Lobanova I.Yu., Turetskova V.F., Zverev Ya.F., Talalaeva O.S., et al. The study of acute toxicity and antioxident activity of the dry extract of leaves of *Populus tremula* L // Fundamental Research. – 2012. – № 9. – P. 308-312.
11. Nikitin A.A. Anatomical atlas of useful and some poisonous plants. – М.: Nauka, 1982. – 182 p.
12. Plaksen N.V., Ustinova L.V., Ponomarchuk S.G., et al. Biochemical markers of the influence of black shiksha (*Empetrum nigrum*) juice on the course of alloxan diabetes // Pacific Medical Journal. – 2021. – № 3 (85). – P. 59-62.
13. Preclinical manual on the experimental study of new pharmacological substances / Ed. by R.U. Khabriev. – М.: Medicine, 2005. – 832 p.



14. Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Eremina N.V., Durnev A.D. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (Part I: haematological studies) // The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medical Products. – 2019. – Vol. 9, № 3. – P. 197-206.
15. Fogt V.P., Stepanova T.A. Contents of flavonoids in antidiabetic extract // Pharmacy. – 2007. – № 4. – P. 24-25.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 21.03.2022.

The article was accepted for publication 21.03.2022.

