

УДК 543.645.3:582.951.4+615.015:615.262.1

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОДЕРЖАНИЯ КАПСАИЦИНА В РАЗНЫХ СОРТАХ *CAPSICUM ANNUUM* И ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ЕГО СПИРТОВЫХ ЭКСТРАКТОВ

© Ю.А. Бойко^{*1}, И.А. Кравченко^{1,2}, Р.Б. Богомольный¹, М. Аят¹

¹Одесский национальный университет им. И.И. Мечникова, ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026 (Украина)

²Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, ул. Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65126 (Украина), e-mail: yuriyalex@gmail.com

Изучена жидкостная экстракция капсаицина из стручков *Capsicum annuum* L. этиловым спиртом с количественным определением содержания капсаицина в разных сортах *Capsicum annuum* L.

Была изучена также противовоспалительная активность спиртового экстракта перца однолетнего (*Capsicum annuum* L.) при каррагинан-индуцированном воспалении и показано, что он оказывает выраженный терапевтический эффект. Кроме местных изменений в очаге воспаления, наблюдаются и системные изменения, связанные с уменьшением общего количества лейкоцитов и нормализации лейкоцитарной формулы.

Ключевые слова: перец однолетний, *Capsicum annuum* L., капсаицин, экстракт, противовоспалительная активность.

Введение

Современная фармакология имеет широкий набор химических соединений, которые используются или могут быть использованы в качестве лекарственных средств. Однако в последнее время количество принципиально новых химических соединений, внедренных в медицинскую практику как фармацевтические препараты, сравнительно невелико. В связи с этим перед фармацевтической и медицинской химией остро стоит вопрос поиска соединений-лидеров, которые бы были способны стать родительскими соединениями новых классов лекарственных веществ [1]. Одним из главных поставщиков новых биологически активных веществ (БАВ) является природное сырье [2].

Интересным растительным источником БАВ является перец однолетний (*Capsicum annuum* L.), в состав которого входят капсаициноиды – класс алкалоидов, самым известным из которых является капсаицин (рис. 1).

Капсаицин и его производные, оказывающие раздражающее действие, на практике используются для профилактики и лечения воспалительных процессов различной этиологии [3]. Следует отметить, что

Бойко Юрий Александрович – заведующий лабораторией кафедры фармацевтической химии, кандидат биологических наук, e-mail: yuriyalex@gmail.com

Кравченко Ирина Анатольевна – профессор кафедры фармацевтической химии, доктор биологических наук, e-mail: kisinmishka@yahoo.com

Богомольный Роман Борисович – студент химического факультета, e-mail: romchik92@mail.ru

Аят Мохаммед – аспирант кафедры фармацевтической химии, e-mail: Mohamed.ayat26@Yahoo.com

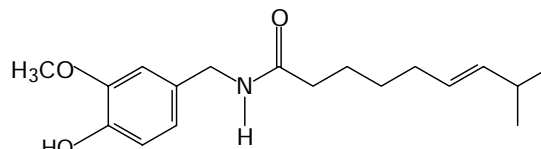


Рис. 1. Структурная формула капсаицина

* Автор, с которым следует вести переписку.

помимо противовоспалительного действия, капсаицин обладает и рядом других полезных свойств. При употреблении в пищу активирует процессы пищеварения, способствует аппетиту, вызывает увеличение выделения желудочного сока и мукозного секрета, что вместе с улучшением нейротрофической функции предупреждает язвенную болезнь желудка [4]. Препараты на основе капсаицина нашли применение при лечении мигрени и гипертонии. Капсаицин оказывает антиканцерогенное действие, блокируя процесс канцерогенеза на стадии премалигнизации [5].

Несмотря на большое количество исследований, посвященных капсаицину и его производным, еще большее количество вопросов требует дальнейшего изучения. В данной работе было рассмотрено влияние спиртовых экстрактов различных сортов *Capsicum annuum* на развитие асептического воспаления на примере каррагинан-индуцированного отека, а также было определено содержание капсаицина в различных сортах горького перца.

Экспериментальная часть

В исследовании использовались белые крысы-самцы линии «Вистар», массой 180–220 г, которые содержались на стандартном рационе вивария со свободным доступом к пище и воде. Все исследования соответствовали правилам «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» (Страсбург, 1986) и принципам Национального конгресса Украины по биоэтике (Киев, 2003 г.) [6].

Воспалительную реакцию вызывали введением 0,2 мл 0,2% водного раствора каррагинана в мягкие ткани вентральной поверхности плюсны.

Лечение осуществляли за счет погружения воспаленного участка конечности в спиртовой экстракт *Capsicum annuum* на 30 мин, один раз в сутки, начиная со следующего дня после введения раствора каррагинана и до полного выздоровления. Для опытов *in vitro* использовались 70%-ные водно-спиртовые экстракты из мексиканских сортов «Nuevo» и «Arbol», а также отечественного украинского сорта «Украинский горький». В опытах *in vivo* использовался спиртовой экстракт отечественного сорта перца.

Морфологические изменения в области воспаления оценивали с помощью измерения линейных показателей размера отека электронным штангенциркулем, изменение объема конечности определяли с помощью цифрового плетизмометра.

Подсчет эритроцитов и лейкоцитов проводили в камере Горяева, подсчет лейкоцитарной формулы осуществляли в мазках крови (окраска по Романовскому).

Концентрацию капсаицина в исследуемых экстрактах перца определяли по классической методике [7]. Заранее полученный спиртовой экстракт упаривали на роторном испарителе досуха, после чего растворяли в 5 мл хлороформ–метанольной смеси (1 : 1). Аликвоту данной смеси наносили на хроматографические пластинки Сорбфил «аналитические», типа ПТСХ-АФ-А. Разделение осуществляли в системе абсолютный метанол : уксусная кислота (49 : 1). С участка пластинки, содержащей «пятно» капсаицина ($R_f = 0,8$, определялось заранее), удаляли адсорбирующий слой и переносили в пробирку, содержащую 3 мл 0,05 М боратного буфера, pH = 9,4 и 0,5 мл насыщенного водного раствора 2,6-дихлор-4-хлоримида (3 повторности). Полученную смесь интенсивно встряхивали и оставляли на 30 мин в темном месте для развития окраски. Последующее количественное определение капсаицина проводили на фотоколориметре КФК-3 при длине волны 600 нм, с использованием калибровочных кривых.

Масс-спектрометрические исследования проводились на масс-спектрометре МХ-1321, ионизация электронным ударом, энергия ионизации – 70 эВ, температура ионного источника – 220 °С, прямой ввод.

Статистическую обработку проводили с помощью метода Стьюдента-Фишера.

Обсуждение результатов

При использовании экстрактов перца в качестве лекарственных агентов следует соблюдать фармакопейные стандарты, регламентирующие содержание активного вещества (капсаицина) в данном виде лекарственного сырья. Достаточно подробно этот вопрос рассмотрен Н.В. Поповой с соавторами [8], показавшими, что большинство украинских сортов горького перца соответствуют фармакопейным стандартам по содержанию капсаицина. Для всех используемых в ходе исследования сортов горького перца было установлено содержание капсаицина, которое составило 0,52% для сорта «Nuevo», 0,44% для сорта «Arbol» и 0,41% – для

«Украинского горького». Все исследованные сорта соответствуют фармакопейному стандарту ($\geq 0,4\%$ капсаицина в лекарственном сырье), что позволяет использовать их при создании лекарственных препаратов. Количество капсаицина в конечных спиртовых экстрактах составляло $0,101\%$ для сорта для сорта «Nuevo», $0,082\%$ – для сорта «Arbol» и $0,082\%$ – «Украинский горький». Следует отметить, что по данным М.Д. Машковского, количество капсаицина в лекарственном препарате «Настойка перца стручкового» (Tinctura Capsici) может колебаться от $0,1$ до 1% [9]. Таким образом, концентрация капсаицина в полученных нами спиртовых экстрактах перца соответствует фармакопейным лекарственным препаратам.

Для подтверждения факта анализа именно капсаицина было проведено масс-спектрометрическое исследование образца, полученного методом тонкослойной хроматографии спиртового экстракта из отечественного горького перца. Полученные данные приведены на рисунке 2.

В приведенном спектре четко прослеживаются пики молекулярных ионов с m/z 305 и 307, соответствующие капсаицину и дигидроксикапсаицину, а также пики ионов-обломков с m/z 137 и 152, образующиеся в результате распада капсаицина.

Воспалительные явления сопровождаются комплексом патоморфологических изменений, важное место среди которых принадлежит отеку. Улучшение нейротрофических функций в области воспаления под влиянием капсаицина, а также увеличение скорости рассасывания отека под действием спирта, позволили применить нам экстракты горького перца (сорт «Украинский горький») в качестве противовоспалительного агента при лечении каррагинан-индуцированного отека. В качестве критериев состояния воспалительных явлений рассматривались ширина и объем конечности в области воспаления. Изменение этих показателей свидетельствовало о динамике развития воспалительного процесса и эффективности проводимого лечения. Полученные данные приведены на рисунках 3, 4.

При использовании в качестве противовоспалительной терапии местного внешнего воздействия экстракта перца было зафиксировано достоверное уменьшение воспалительного отека, что выразалось в уменьшении ширины и объема конечности в области воспаления. Уже на 7-й день лечения ширина и объем воспаленной конечности возвращались к показателям, которые наблюдались до индуцирования воспаления. Для животных контрольной группы ширина и объем воспаленной конечности на 7-й день в 1,5 раза превышали соответствующие показатели до воспаления.

Кроме оценки внешних морфологических признаков в области воспаления была исследована лейкоцитарная формула крови, по изменениям которого также можно судить о динамике развития воспалительного процесса. Изменения в общем количестве лейкоцитов крови представлены на рисунке 5.

Изменения в лейкоцитарной формуле крови для опытной и контрольной группы животных приведены в таблице 1.

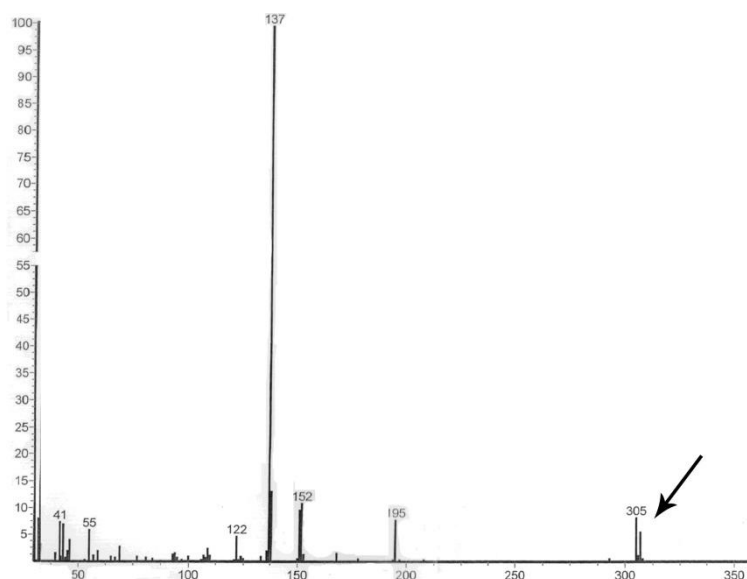


Рис. 2. Масс-спектр спиртового раствора капсаицина, выделенного из горького перца

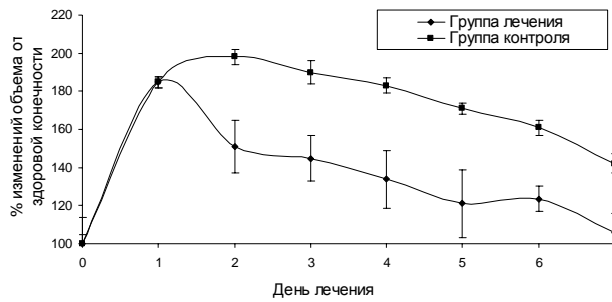


Рис. 3. Динамика изменений объема конечности в месте воспаления при лечении экстрактом горького перца

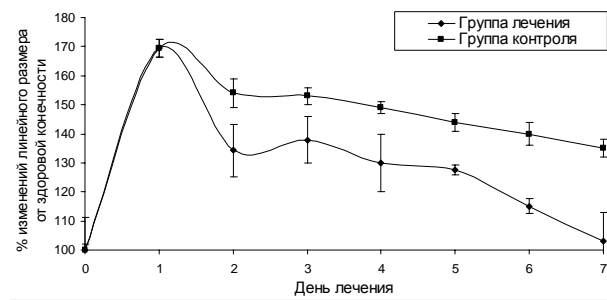


Рис. 4. Динамика изменений ширины конечности в месте воспаления при лечении экстрактом горького перца

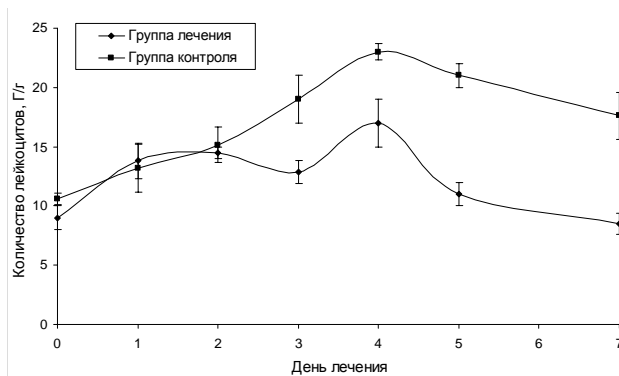


Рис. 5. Динамика изменений в общем количестве лейкоцитов крови при каррагинан-индуцированном воспалении в условиях лечения экстрактом горького перца

Таблица 1. Динамика изменений в лейкоцитарной формуле крови при каррагинан-индуцированном воспалении в условиях лечения экстрактом горького перца

День после индуцированного воспаления	Группы	Тип лейкоцитарных клеток						
		Лимфоциты	Моноциты	Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы		
						Юные	Палочко-ядерные	Сегментоядерные
До индуцирования	Контрольная	75,5±3,2	3,1±0,5	0	1,5±0,4	0	3,2±0,7	16,7±3,2
	Опытная	70,9±6,7	2,6±0,1	0	1,8±0,7	0	4,1±0,5	20,6±2,4
1	Контрольная	66±4,7	3,2±0,4	1±0,1	1,2±0,52	0	3,9±1	24,7±4,5
	Опытная	80,6±7,1	4,1±0,7	1±0,01	0	0	4±2,4	10,3±3,6
2	Контрольная	21,7±2,8	10,4±1,9	0	1,8±0,63	8,7±3,5	12±0,4	45,4±5,9
	Опытная	31±0,6	5,6±0,2	3,2±0,15	1,1±0,06	10,5±2,7	8±1,9	40,6±5,2
3	Контрольная	13,2±2,5	12,5±2,2	0	3,2±0,14	9,2±3,9	14±1,65	47,9±2,3
	Опытная	15,8±2,4	6,0±0,8	1±0,01	2,18±0,3	11±4,1	12±2,03	52,02±4,9
4	Контрольная	14,4±4,3	5,6±0,9	1±0,01	3,6±1,7	8,7±1,5	15±2,6	51,7±5,6
	Опытная	18,8±4,2	4,6±0,3	2,3±0,21	6±0,87	4±2,6*	6±1,82**	58,3±2,2
7	Контрольная	28,0±1,4	5,3±1,9	0	2,3±0,85	4±0,4	10±1,1	50,4±4,81
	Опытная	51,7±3,3**	3,3±0,61	2,8±0,31	2,9±0,7	1±0,08**	5±0,4*	33,3±3,7*

* $P \leq 0,1$; ** $P \leq 0,05$

После индуцирования каррагинанового воспаления уже в первые сутки наблюдается характерное увеличение общего количества лейкоцитов крови. Максимальное количество лейкоцитов было зафиксировано на 4-е сутки воспалительного процесса, для контрольной группы животных оно составило 23 Г/л, что в 2,3 раза превышает показатели до индуцирования воспаления. В отличие от животных контрольной группы, у животных, подвергшихся лечению экстрактом горького перца, общее количество лейкоцитов было равно 15 Г/л, что достоверно меньше, чем у животных контрольной группы. Таким образом, общие признаки воспалительного процесса в случае лечения экстрактом перца менее выражены, чем у контрольной группы. Кроме изменений в общем количестве лейкоцитов, происходят и качественные изменения лейкоцитарного состава. В контрольной группе животных хорошо выражен сдвиг нейтрофилов влево, в группе, подвергшейся

лечению, нейтрофильный сдвиг влево был значительно меньше. В то же время для опытной группы на 7-е сутки после индуцирования воспаления было зафиксировано уменьшение зрелых нейтрофильных форм и увеличение количества лимфоцитов, что соответствует восстановительному периоду. В отличие от опытной группы, в группе контроля нейтрофилы существенно преобладали над лимфоцитами.

Выводы

Использование спиртовых экстрактов перца однолетнего при каррагинановом воспалении оказывает выраженный противоотечный эффект. Кроме местных изменений в очаге воспаления, наблюдаются и системные изменения, связанные с уменьшением общего количества лейкоцитов и нормализации лейкоцитарной формулы. Одним из возможных механизмов действия экстрактов перца может быть влияние капсаицина на нейротрофику и гемодинамику в области воспаления. Таким образом, спиртовые экстракты горького перца соответствуют фармакопейным стандартам качества, обладают выраженным противовоспалительным действием и могут быть использованы при лечении местных воспалительных явлений и процессов.

Список литературы

1. Кубиньи Г. В поисках новых соединений-лидеров для создания лекарств // Российский химический журнал. 2006. Т. 50, №2. С. 5–17.
2. Buss A.D., Cox B., Waigh R.D. In: Natural products as leads for new pharmaceuticals, in Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Ed. D.J. Abraham. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2003. Pp. 847–900
3. Куркин В.А., Сулейманова Л.Р. Стандартизация сырья и препаратов перца однолетнего // Фармация. 2010. №6. С. 15–18.
4. Oyagbemi A.A., Saba A.B., Azeez O.I. Capsaicin: A novel chemopreventive molecule and its underlying molecular mechanisms of action // Ind. J. Cancer. 2010. Vol. 47, №1. Pp. 53–58.
5. Surh Y.-J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals // Nature Rev. Cancer. 2003. Vol. 3. Pp. 768–780.
6. Загально-етичні принципи експериментів на тваринах // Ендокринологія. 2003. Т. 8, №1. С. 142–145.
7. Pankar D.S., Magar N.G.. New method for the determination of the capsaicin by using multi-band thin-layer chromatography // J. Chromatogr. 1977. Vol. 144. Pp. 149–152.
8. Попова Н.В., Литвиненко В.И., Бовтенко В.А. К вопросу стандартизации настойки стручкового перца // Фармаком. 2010. №3. С. 23–29.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства: пособие для врачей. М., 1998, Т. 1. С. 351.

Поступило в редакцию 2 сентября 2013 г.

После переработки 17 октября 2013 г.

Boyko Yu.A.^{1*}, Kravchenko I.A.^{1,2}, Bogomolny R.B.¹, Aiad M.¹ DETERMINATION OF CONTENT CAPSAICIN IN THE DIFFERENT KIND OF *CAPSICUM ANNUUM* AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ITS ALCOHOLIC EXTRACTS

¹Odessa National University, Department of Pharmaceutical Chemistry, Dvoryanskaya str., 2, Odessa, 65026 (Ukraine)

²A.V. Bogatsky Physics-Chemical Institute of NAS of Ukraine, Lyustdorfskaya str., 86, Odessa, 65126 (Ukraine)

Inflammation is a very common disease process. Therefore the search for new compounds which can be used as anti-inflammatory drugs, is an important task of pharmacology and medical chemistry. Such substances may be compounds of plant origin, including capsaicinoids.

Were studied anti-inflammatory properties of alcoholic extracts of *Capsicum annuum* L. containing capsaicin on the model of carrageenan edema. We studied the effect this extracts on the width and volume of carrageenan edema, and changes in the cellular composition of the blood. We have shown the use of alcoholic extracts *Capsicum annuum* L. helps to reduce carrageenan induced inflammatory and restoration of normal blood cell composition.

Keyword: (*Capsicum annuum* L.), capsaicin, extract, anti-inflammatory activity.

References

1. Kubin'i G. *Rossiiskii khimicheskii zhurnal*, 2006, vol. 50, no. 2, pp. 5–17. (in Russ.).
2. Buss A.D., Cox B., Waigh R.D. In: Natural products as leads for new pharmaceuticals, in Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Ed. D.J. Abraham. Hoboken NJ: John Wiley & Sons, 2003. Pp. 847–900.
3. Kurkin V.A., Suleimanova L.R. *Farmatsiia*, 2010, no. 6, pp. 15–18. (in Russ.).
4. Oyagbemi A.A., Saba A.B., Azeez O.I. *Ind. J. Cancer*, 2010, vol. 47, no. 1, pp. 53–58.
5. Surh Y.-J. *Nature Rev. Cancer.*, 2003, vol. 3, pp. 768–780.
6. *Endokrynol*, 2003, vol. 8, no. 1, pp. 142–145. (in Ukr.).
7. Pankar D.S., Magar N.G. *J. Chromatogr.*, 1977, vol. 144, pp. 149–152.
8. Popova N.V., Litvinenko V.I., Bovtenko V.A. *Farmakom*, 2010, no. 3, pp. 23–29. (in Russ.).
9. Mashkovskii M.D. *Lekarstvennye sredstva (posobie dlia vrachei)*. [Drugs (manual for physicians)]. Moscow, 1998, vol. 1, pp. 351. (in Russ.).

Received September 2, 2013

Revised October 17, 2013

* Corresponding author.