

© Коллектив авторов, 2007

И. Г. Николаева¹, Л. Д. Дымшлеева², С. М. Николаев¹, Г. Г. Николаева¹

АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НООТРОПНОГО СРЕДСТВА “ПОЛИНООФИТ” И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО ФЛАВОНОИДНОГО СОСТАВА

¹ Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ;

² Бурятский государственный университет, Улан-Удэ

В эксперименте на животных установлена антиоксидантная активность ноотропного средства “Полиноофит” на модели гипобарической гипоксии. Определен флавоноидный состав полученного средства. Обнаружены флавоноиды: апигенин, гесперидин, лютеолин, нарингенин, байкалин, кверцетин, мирицетин, кемпферол и галловая кислота.

Усиление окислительных процессов при недостаточности системы антиоксидантной защиты приводит к развитию “оксидантного стресса”, который в настоящее время рассматривается как один из важных механизмов повреждения тканей организма [1]. Свободно-радикальное перекисное окисление липидов (ПОЛ) является универсальным процессом, сопровождающим большинство заболеваний и в значительной степени определяющим повреждение клеток [2]. Процессы ПОЛ активируются при ишемии различных органов, в том числе головного мозга. Это ведет к накоплению продуктов ПОЛ в тканях и повышению их концентрации в биологических жидкостях [3]. Активация процессов ПОЛ наблюдается также при гипоксии тканей и органов и, в особенности, в периоде реоксигенации [2, 4], когда на фоне частичного разрушения клеточных структур происходит резкое повышение концентрации кислорода, что особенно неблагоприятно, его токсичных активных форм [5].

В центральной нервной системе опасность развития оксидантного стресса выше, чем в других системах, что определяется значительной интенсивностью окислительного метаболизма [1]. Мозг содержит огромное количество липидов, ненасыщенные связи которых являются субстратом для перекисного окисления липидов. Активность ферментативных антиоксидантных систем в мозге — каталазы, глутатионпероксидазы — значительно ниже, чем в других тканях, что еще более повышает риск развития окислительного стресса в центральной нервной системе.

Установлено, что активация свободнорадикальных процессов при гипоксии вызывает накопление продуктов ПОЛ [6].

Нами разработано комплексное средство растительного происхождения “Полиноофит” обладающее ноотропной активностью. Ноотропные средства составляют особую группу веществ, специфический эффект которых определяется способностью их активировать высшую интегративную деятельность мозга, повышать внимание и улучшать процессы памяти. Многие ноотропные средства применяют не только с целью

непосредственного воздействия на мнестические функции, а также при снижении общего уровня жизнедеятельности человека, возникающего при многих состояниях, заболеваниях и экстремальных ситуациях: при гипоксии, ишемии, травмах мозга, интоксикациях и др.

В состав растительной композиции входят трава сушеницы топяной, корни шлемника байкальского, побеги пятилистника кустарникового, корневище кровохлебки аптечной, корни пиона уклоняющегося, плоды шиповника и другие. Компоненты сбора содержат комплекс биологически активных веществ: флавоноиды (гиперозид, кверцетин, кемпферол, изокверцитрин, байкалин, апигенин, лютеолин и др.), дубильные вещества, полисахариды, тритерпеноиды, органические кислоты, витамин С и др., обеспечивающие широкий диапазон фармакологического воздействия.

Цель настоящей работы — определить антиоксидантную активность спиртового экстракта из растительной композиции “Полиноофит”, изучить компонентный состав флавоноидов и определить галловую кислоту в ноотропном средстве.

Экспериментальная фармакологическая часть

Опыты выполнены на белых крысах линии Wistar обоего пола с исходной массой 170 – 200 г. Животным опытных групп вводили внутривенно деалкоголизированный раствор “Полиноофита” в объемах 1,0; 3,0 и 5,0 мл/кг 1 раз в сутки в течение 5 дней и 5-й раз за 1 ч до тестирования. Контрольная и интактная группы животных получали дистиллированную воду по аналогичной схеме. В качестве препарата сравнения использовали препарат Пирацетам в дозе 200 мг/кг 1 раз в сутки в течение 5 дней и 5-й раз за 1 ч до тестирования. Пирацетам относится к средствам, обладающим ноотропным действием [7].

Эксперименты проведены на модели гипобарической гипоксии. Все группы животных, кроме интактной, подвергались гипобарической гипоксии.

Гипобарическую гипоксию моделировали в проточно-вытяжной барокамере. Животных “поднимали на

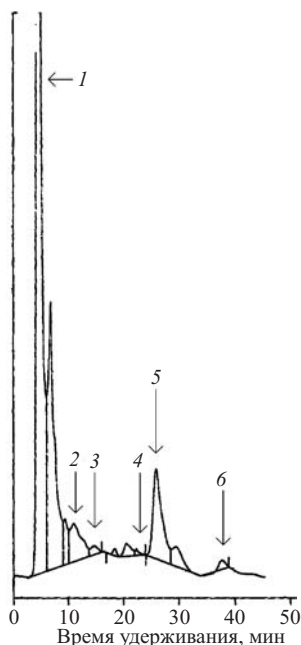


Рис. 1. Хроматограмма извлечения ноотропного сбора: 1 — апигенин; 2 — гесперидин; 3 — лютеолин; 4 — нарингенин; 5 — байкалин; 6 — кверцетин

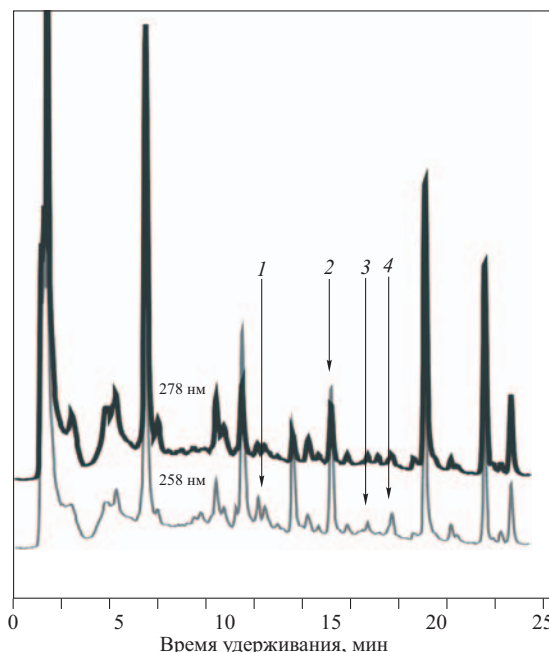


Рис. 2. Хроматограмма флавоноидов из извлечения ноотропного сбора: 1 — мирицетин; 2 — кверцетин; 3 — лютеолин; 4 — кемпферол

высоту” 11 км (198,7 – 185 мм. рт. ст.) со скоростью 50 м/с. Через 6 ч после гипоксии животных декапитировали, извлекали мозг. Образцы ткани взвешивали, гомогенизировали и центрифугировали при охлаждении.

О степени антиоксидантной эффективности экстракта судили по следующим показателям: по содержанию конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) и по активности фермента каталазы в гомогенате головного мозга крыс.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия Стьюдента [8].

Результаты исследований показали, что в постгипоксическом периоде содержание МДА в гомогенатах головного мозга увеличивается на 51 % (табл. 1) по сравнению с показателями у животных интактной группы. На фоне введения “Полинофита” в объемах 1,0; 3,0 и 5,0 мл/кг и пирацетама выявлено достовер-

ное снижение содержания МДА на 50, 66, 65 и 49 % соответственно в сравнении с контролем.

Установлено, что активация ПОЛ протекает на фоне снижения активности антиоксидантной системы защиты организма животных. Так, при гипобарической гипоксии активность каталазы снижается на 32 % по сравнению с таковой у крыс интактной группы (табл. 2). Введение “Полинофита” в объемах 1,0; 3,0 и 5,0 мл/кг и пирацетама достоверно повышает активность фермента соответственно на 56, 59, 76 и 70 % по сравнению с данными контрольной группы. Таким образом, полученные данные о снижении содержания МДА и повышении активности каталазы под действием “Полинофита” свидетельствуют об ингибирующем влиянии его на процессы перекисного окисления липидов при гипобарической гипоксии у крыс.

Экспериментальная химическая часть

Флавоноиды являются одной из самых распространенных групп фенольных соединений. Благодаря высокой биологической активности, обусловленной при-

Таблица 1
Влияние “Полинофита” на концентрацию малонового диальдегида в гомогенате мозга белых крыс

Группа	МДА, моль/г ткани
1. Интактная (n = 8)	4,7 ± 0,14
2. Контрольная (n = 8)	9,6 ± 0,39*
3. Полинофит, 1,0 мл/кг (n = 8)	4,8 ± 0,14**
4. Полинофит 3,0 мл/кг (n = 8)	3,3 ± 0,06**
5. Полинофит 5,0 мл/кг (n = 8)	3,4 ± 0,14**
6. Пирацетам, 200 мг/кг (n = 8)	4,9 ± 0,15**

Примечание: Здесь и далее * — значения достоверны по сравнению с данными у животных интактной группы при $p \leq 0,05$; ** — значения достоверны по сравнению с данными у животных контрольной группы при $p \leq 0,05$.

Таблица 2
Влияние “Полинофита” на активность каталазы в гомогенате тканей головного мозга

Группа	Каталаза, мкат/г ткани
1. Интактная	3,89 ± 0,002
2. Контрольная	2,58 ± 0,015*
3. Полинофит 1,0 мл/кг (n = 8)	4,03 ± 0,1**
4. Полинофит 3,0 мл/кг (n = 8)	4,12 ± 0,033**
5. Полинофит 5,0 мл/кг (n = 8)	4,55 ± 0,043**
6. Пирацетам 200 мг/кг	4,37 ± 0,051**

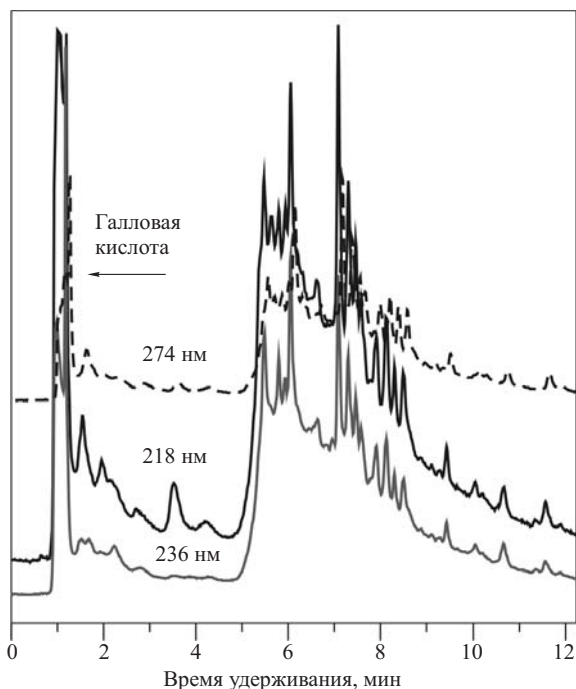


Рис. 3. Хроматограмма галловой кислоты

существом в молекуле активных фенольных гидроксильных и карбонильной групп, они подвергаются различным биохимическим изменениям и принимают участие в ряде физиологических процессов. Рекомендовано применение пищевых полифенольных антиоксидантов, в том числе и флавоноидов, для торможения свободнорадикальных реакций при злокачественном росте, облучении и старении. Было доказано, что введение растительных полифенолов, в том числе и флавоноидов, увеличивающих антиоксидантную активность тканей животных, повышает их устойчивость к действию радиации [9].

Установление компонентного состава сложных растительных смесей ВЭЖХ, как правило, дает высокую достоверность и воспроизводимость. Трудности, связанные с идентификацией пиков веществ, преодолеваются благодаря применению многоволновой фотометрической детекции и использованием достоверных образцов веществ.

Исследования по изучению флавоноидного состава средства проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы “Gilston” (Франция) с последующей компьютерной обработкой результатов ис-

следования с помощью программы “Мультихром для Windows”. В качестве неподвижной фазы использовали металлическую колонку размером $4,6 \times 250$ мм Platinum EPS C-18 000A, в качестве подвижной фазы — метанол : вода : фосфорная кислота концентрированная в соотношении 40:60:0,5.

Образцы хроматографировали в изократичном режиме. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Продолжительность анализа 45,43 мин. Детектирование проводилось с помощью УФ-детектора при длине волны 254 нм.

Для сравнения готовили серию 0,05 % растворов флавоноидных веществ в 40 % этаноле: рутина, кверцетина, лютеолина, геспередина, нарингенина, байкалина, апигенина.

Точную навеску исходного растительного сбора экстрагировали 40 % этиловым спиртом, извлечение помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки 40 % этиловым спиртом, соотношение сбора и экстрагента 1:10 (Извлечение 1).

По 20 мкл извлечения 1 хроматографировали по приведенной выше методике. Пики на хроматограммах идентифицировали по времени удерживания (t_R). Результаты исследований приведены в табл. 3 и на рис. 1.

В результате проведенных исследований обнаружены следующие биологически активные вещества: апигенин, геспердин, лютеолин, нарингенин, байкалин, кверцетин.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии были количественно определены некоторые флавоноиды и галловая кислота в извлечении 1.

Исследования проводили на жидкостном хроматографе “Милихром А-02” (ЗАО “Эконова” Новосибирск, Россия) на колонке размером 2×75 мм, упакованной сорбентом “Nucleosil, 100–5, C 18”. Определение проводили при градиентном режиме хроматографии.

В качестве стандартов использовали индивидуальные вещества: мирицетин, кверцетин, лютеолин, кемпферол, галловую кислоту.

Для количественного определения флавоноидов (мирицетина, кверцетина, лютеолина, кемпферола) в качестве подвижной фазы использовали смесь растворов А и В: раствор А — смесь водного раствора фосфата калия (KH_2PO_4 , 0,05 М, рН = 3,0) и метанола при соотношении 95:5; раствор В — метанол. Градиент раствора В от 15 до 60 % за 24 мин, при расходе

Таблица 3
Результаты качественного обнаружения веществ в извлечении ноотропного сбора с применением ВЭЖХ

Вещества	Время удерживания, t_R , мин
Апигенин	4,20
Геспердин	10,90
Лютеолин	14,70
Нарингенин	22,30
Байкалин	25,80
Кверцетин	37,65

Таблица 4
Количественное содержание некоторых веществ в извлечении ноотропного сбора

Соединение	t_R , мин	С, мкг/мл
1. Мирицетин	12,90	$24,4 \pm 1,2$
2. Кверцетин	16,30	117 ± 6
3. Лютеолин	18,20	$0,55 \pm 0,03$
4. Кемпферол	19,50	170 ± 8
5. Галловая кислота	1,55	390 ± 20

0,15 мл/мин. Температура колонки 50 °С. Элюируемые соединения детектировали при 260, 274 нм одновременно.

Для количественного определения галловой кислоты в качестве подвижной фазы использовали смесь растворов А и В: раствор А — смесь водного раствора фосфата калия (K₂HPO₄, 0,05 М, рН = 3,0) и ацетонитрила при соотношении раствор фосфата калия — ацетонитрил 95:5; раствор В — ацетонитрил. Градиент раствора В от 0 до 45 % за 13 мин, при расходе 0,2 мл в минуту. Температура колонки 40 °С. Детектирование проводили при 218, 274 нм одновременно.

По 20 мкл извлечения 1 хроматографировали по приведенным выше методикам. Вещества идентифицировали по времени удерживания (t_R). Количественное содержание веществ рассчитывали методом внешнего стандарта. В качестве внешних стандартов использовали растворы индивидуальных соединений с известной концентрацией. Чистота соединений по данным ВЭЖХ составляла не менее 95 %. Суммарная погрешность измерений не превышала 5 %.

Результаты исследований приведены в табл. 4 и на рис. 2, 3.

В результате проведенных исследований установлено количественное содержание веществ в извлечении ноотропного сбора: мирицетина, кверцетина, лютеолина, кемпферола и галловой кислоты.

Таким образом, “Полиноофит” обладает антиоксидантной активностью, подавляет процессы перекисного окисления липидов. Данное средство содержит фла-

воноиды: апигенин, гесперидин, лютеолин, нарингенин, байкалин, кверцетин, мирицетин, кемпферол и галловую кислоту. Количественное содержание некоторых веществ в спирто-водном извлечении ноотропного сбора (1:10): мирицетина 24,4 ± 1,2 мкг/мл, кверцетина 117 ± 6 мкг/мл, лютеолина 0,55 ± 0,03 мкг/мл, кемпферола 170 ± 8 мкг/мл и галловой кислоты 390 ± 20 мкг/мл. Содержание флавоноидов и галловой кислоты обуславливает антиоксидантную активность растительного средства.

Результаты получены при поддержке “Лаврентьевский конкурс молодежных проектов СО РАН” (Новосибирск, 2006 г).

ЛИТЕРАТУРА

1. И. А. Завалишин, М. Н. Захарова, *Ж. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*, **96**(2), 111 – 114 (1996).
2. J. M. McCord, *N. Engl. J. Med.*, No. 12, 159 – 163 (1985).
3. Т. Г. Джанджагава, Р. Р. Шакаришвили, *Вопр. мед. химии*, № 5, 33 – 35 (1995).
4. Ю. А. Владимиров, А. И. Арчаков, *Перекисное окисление липидов в биологических мембранах*, Москва (1972).
5. D. Jamieson, *Free Radic Biol. Med.*, No. 7, 87 – 108 (1989).
6. В. А. Косолапов, О. В. Островский, А. А. Спасов, *Бюл. экпер. биол. и мед.*, **126**(11), 519 – 521 (1998).
7. Н. Б. Николаева, Б. Р. Альперович, В. Н. Созинова, *Справочник Видаль. Лекарственные препараты в России*, Астра-Фарм Сервис, Москва (1996), сс. 529 – 530.
8. М. Л. Беленький, *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*, Наука, Ленинград (1963).
9. Н. П. Максютин, *Растительные лекарственные средства*, Киев (1985), сс. 96 – 99.

Поступила 01.03.05

ANTIOXIDANT ACTIVITY AND FLAVONOID COMPOSITION OF THE NEW NOOTROPE PREPARATION POLYNOOPHYT

I. G. Nikolaeva¹, L. D. Dymshva², S. M. Nikolaev¹, and G. G. Nikolaeva¹

¹ Institute of General and Experimental Biology, Siberian Division, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryatia, Russia;

² Buryat State University, Ulan-Ude, Buryatia, Russia

The antioxidant activity of the new nootrope preparation polynoophyt has been experimentally studied on a model of hypobaric hypoxia in animals. The flavonoid composition of polynoophyt has been determined, which includes apigenin, hesperedin, luteolin, naringenin, baicalin, quercetin, myricetin, kaempferol, and gallic acid.