

Исследование биологически активных веществ *Atragene speciosa* Weinm.

Шилова И.В.

Research biologically active substances *Atragene speciosa* Weinm.

Shilova I.V.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Шилова И.В.

Из надземной части княжика сибирского *Atragene speciosa* Weinm. сем. Ranunculaceae получена фракция, обладающая выраженным ноотропным эффектом, из которой выделены 3,4-дигидроксифенилэтанол-2 и его 2-O-β-D-глюкопиранозид, а также сумма гликозидов дигидроксибутановой кислоты. В фармакологически активной фракции выявлено содержание, кроме указанных веществ, тритерпеновых гликозидов (сапогенинами которых являются хедерагенин и олеаноловая кислота), аминокислот и микроэлементов.

Впервые полученные нами данные о биологически активных веществах и их фармакологической активности дают возможность создания нового фитопрепарата ноотропного действия на основе княжика сибирского.

Ключевые слова: лекарственные растения, ноотропная активность, химический состав

From the overground part of *Atragene speciosa* Weinm. family Ranunculaceae, we obtained a fraction possessing a marked nootropic effect from which 3,4-dihydroxyphenylethanol-2, its 2-O-β-D-glucopyranoside, and a sum of glycosides of dihydroxybutane acid were isolated. In addition to the foregoing substances, in the pharmacologically active fraction we revealed the presence of triterpene glycosides (whose sapogenins are hederagenine and oleanolic acid), aminoacids and microelements.

For the first time the obtained data about the biologically active substances and their pharmacological activity give us the possibility of development of a new phytopreparation with the nootropic effect on the basis of *Atragene speciosa* Weinm.

Key words: medicinal plants, nootropic activity, chemical composition.

УДК 615.217.34:615.322

Введение

В настоящее время широкое применение в медицинской практике находят лекарственные средства растительного происхождения, обладающие малой токсичностью, мягкостью действия и редким проявлением аллергических реакций.

Перспективным растением является княжик сибирский (*Atragene speciosa* Weinm. сем. Ranunculaceae) — многолетняя кустарниковая лиана, произрастающая в равнинных и горных лесах Сибири [11]. Опыт применения данного растения в народной медицине свидетельствует о широких терапевтических возможностях: траву княжика сибирского используют для лечения сердечно-

сосудистых, гинекологических и опухолевых заболеваний, как ранозаживляющее, болеутоляющее, противоревматическое, диуретическое и общеукрепляющее средство [2, 8, 9]. В тибетской медицине надземную часть растения применяют для лечения заболеваний печени, при абсцессах легких, отеках, катаре и раке желудка [1, 3, 9].

В результате проведенных нами фармакологических испытаний экстрактов из надземной части княжика установлено выраженное антистрессорное и транквилизирующее действие, увеличение работоспособности животных в процессе адаптации к физическим нагрузкам, улучшение условно-рефлекторной деятельности после перенесенной

гипоксической травмы и в условиях экспериментальной ишемии головного мозга [13, 14].

Исследования химического состава надземной части растения показали наличие разнообразных групп биологически активных веществ (БАВ): фенолоспиртов, флавоноидов (кемпферол, кверцетин, изокверцитрин), оксикумаринов (умбеллиферон, скиммин, эскулетин, эскулин, скополетин), фенолкарбоновых кислот (кофейная и хинная), дубильных веществ, антрахинонов, тритерпеновых гликозидов β -амиринового ряда, алкалоидов дитерпенового ряда (аконитин и дельфинин), полисахаридов, каротиноидов, аминокислот и микроэлементов [7, 12, 14].

Целью настоящей работы явилось химическое исследование активной фракции княжика сибирского.

Методы

Надземную часть растения собирали в период цветения — начала плодоношения в окрестностях г. Кодинска Красноярского края, высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали до размера частиц 2—5 мм.

Обнаружение отдельных классов природных соединений проводили с помощью современных методов и приемов фитохимического анализа [4].

Для получения фармакологически активной фракции и разделения ее на индивидуальные компоненты использовали методы избирательной экстракции, адсорбционной колоночной и флэш-хроматографии на силикагеле, полиамиде в сочетании с хроматографией в тонком слое сорбента и дробной кристаллизацией.

Установление структуры выделенных соединений проводили с помощью химических и физико-химических методов, а также сравнением со стандартными образцами. Выделенные вещества идентифицировали методами УФ-спектроскопии (Perkin Elmer-402) с использованием ионизирующих и комплексообразующих реагентов, ИК- (UR-20, IF S25), ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии (Bruker DRX-500).

Исследование свободных аминокислот осуществляли с помощью аминокислотного анализатора «Biotronik LC 5001» (Германия) на колонке «Biotronik resin VIC 2710» с использованием

внутреннего стандарта. В качестве подвижной фазы применяли последовательность из пяти цитратных буферных растворов. Детектирование проводили с использованием постколоночного окрашивания раствором нингидрина при длине волны 570 нм.

В основу аналитических исследований элементного состава положен эмиссионный спектральный анализ, который осуществляли на кварцевом спектрографе ИСП-28 с микрофотометром МФ-2.

Фармакологические исследования выполнены на 64 мышах-самцах линии СВА массой тела 22—25 г. Животные 1-ой категории (конвенционные линейные мыши) были получены из коллекционного фонда лаборатории экспериментального биологического моделирования Института фармакологии ТНЦ СО РАМН (сертификат имеется).

Эксперименты проводили в осенне-зимний период. Работы в рамках экспериментальных методик выполняли с 10 ч утра и заканчивали к 15 ч. Животные содержались в виварии на обычном рационе кормления при свободном доступе к воде и пище (за исключением тех случаев, где иные условия оговариваются особо). Умерщвление животных осуществлялось передозировкой эфирного наркоза в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР.

Иммобилизационный стресс создавали подвешиванием животных за шейную складку на 22 ч [5, 10]. Через 15 мин после стресса у них изучали ориентировочно-исследовательское поведение, регистрировали эмоциональную реакцию, определяли количество лейкоцитов в периферической крови, массу селезенки, тимуса, надпочечников, количество язв на слизистой оболочке желудка и степень выраженности стресса в баллах.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали статистически с использованием параметрического критерия Фишера и непараметрического критерия Вилкоксона [6].

Результаты

Учитывая, что биологически активные вещества княжика сибирского, обладающие ноотропным действием, имеют гидрофильный характер [12, 13], экстракцию надземной части растения осуществляли метанолом и водным этанолом. После концентрирования полученных экстрактов и освобождения их от липофильных соединений с помощью хлороформа, целевой продукт получали экстракцией бутанолом-1.

Фармакологические исследования полученных фракций показали, что бутанольное извлечение метанольного экстракта проявило выраженный ноотропный эффект [12]. В качестве иллюстрации приводим результаты исследования влияния бутанольной фракции на последствия перенесенного иммобилизационного стресса (табл. 1).

С целью выявления молекулярных носителей специфической активности, полученную бутанольную фракцию подвергали детальному изучению.

С помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) и качественных реакций в исследуемой фракции обнаружили фенольные соединения, тритерпеновые сапонины, аминокислоты и неорганические компоненты.

Таблица 1

Влияние бутанольной фракции княжика сибирского на последствия перенесенного иммобилизационного стресса (M ± m; n = 16)

Группа наблюдения	Доза, мг/кг	Выраженность стресса в баллах	Количество язв в желудке	Число лейкоцитов, г/л
Контроль интактный	—	0	0	9,9 ± 0,5
Контроль стрессовый	—	27	5,3 ± 1,5* P < 0,05	8,4 ± 0,9
Бутанольная фракция княжика	8	14	2,1 ± 0,4# P < 0,05	9,1 ± 1,1
Экстракт княжика	100	15	2,5 ± 0,4# P < 0,05	8,1 ± 0,9

Примечание: * — различия достоверны в отношении интактного контроля; # — различия достоверны в отношении стрессового контроля.

Исследования аминокислотного состава показали, что фармакологически активная фракция княжика сибирского содержит семь свободных аминокислот, четыре из которых являются неза-

менимыми (треонин, валин, изолейцин, гистидин). Доминирующими аминокислотами являются пролин и изолейцин. Общее содержание аминокислот во фракции составило 0,33%.

Методом эмиссионной спектрометрии установили наличие 18 элементов (в том числе, 6 микроэлементов и 11 ультрамикроэлементов), девять из которых являются эссенциальными или условно эссенциальными микроэлементами. На основании полученных данных составлен ряд предпочтительного содержания элементов в бутанольной фракции растения:

Mg>Fe>Cu>Al>Ta>Cr>Ni>W>Mn>V>Pb>Cd>Ti>
>Sn>Mo>Zn>Co, Bi.

Фармакологически активная фракция содержит значительное количество неорганических компонентов (2,4%). Для очистки от последних бутанольную фракцию обрабатывали ацетоном. Полученную ацетоновую фракцию разделяли с помощью флэш-хроматографии на колонке с силикагелем, используя смесь хлороформ-метанол-вода (ХМВ) с увеличением градиента гидрофильности — 70:12:1 → 70:23:1 → 70:23:4 и метанол. Элюаты (< 1—4) концентрировали и подвергали фармакологическим испытаниям [12].

Результаты фармакологических опытов свидетельствуют о том, что при хроматографическом разделении суммарной активной фракции ноотропный эффект значительно уменьшается, что указывает на специфическое действие суммы биологически активных веществ бутанольной фракции.

Для выделения индивидуальных соединений применяли многократную флэш- и колоночную хроматографии на полиамиде и силикагеле. В качестве элюента использовали смесь хлороформ-метанол-вода, хлороформ-метанол, бутанол-1-этанол-вода в различных соотношениях.

Выделение фенольных соединений из элюата < 1 осуществляли методом колоночной хроматографии на полиамиде. При элюировании колонки смесью хлороформ-метанол (98:2) и (95:5) получили вещества I и II соответственно.

Идентификацию веществ проводили по физико-химическим константам, на основании качественных реакций и хроматографирования в

тонком слое силикагеля и полиамида, спектральных данных.

В УФ-спектрах оба вещества имели два максимума поглощения в области 220—230 нм и 270—285 нм с батохромным сдвигом от добавления щелочи на 10—17 нм. При добавлении натрия ацетата наблюдали батохромный сдвиг максимума длинноволновой области спектра, что свидетельствует о наличии в молекулах исследуемых соединений фенольной ОН-группы. ИК-спектры веществ обнаружили полосы поглощения при 3400 см^{-1} (—ОН), 1610 и 1530 см^{-1} (бензольное кольцо).

Вещество I — стекловидная масса желтоватого цвета состава $\text{C}_8\text{H}_{13}\text{O}_3$, $\lambda_{\text{max, MeOH}}$ 220, 280 нм. На основании хроматографического поведения, физико-химических констант, спектральных характеристик вещество I идентифицировали как 3,4-дигидроксифенилэтанол-2.

Вещество II — стекловидная масса желтоватого цвета состава $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_8$, $[\alpha]_{\text{D}, 23}^{\text{MeOH}}$ — $30,50^\circ$ (с 2,55, метанол), $\lambda_{\text{max, MeOH}}$ 225, 282 нм. При кислотном гидролизе (5%-й водный раствор серной кислоты, 100°C , 2 ч) соединение II расщепляется на вещество, тождественное веществу I, что доказано методом ТСХ. В гидролизате хроматографически установили наличие D-глюкозы. На основании физико-химических констант, хроматографических данных, УФ-, ИК-, ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР-спектров соединение II идентифицировано с 2-(3,4-дигидроксифенил)-этил-О-β-D-глюкопиранозидом.

Для исследования элюата < 2, полученного при разделении ацетоновой фракции методом флэш-хроматографии, использовали колоночную хроматографию на силикагеле. При элюировании системой бутанол-1-этанол-вода (10:2:4) получили ряд подфракций близких по структуре веществ. По данным ТСХ указанные подфракции содержат два вещества, относящихся к одной группе БАВ с Rf 0,18 и 0,27 (хлороформ-метанол-вода 63:23:3) и 0,21; 0,30 (бутанол-1-этанол-вода 10:2:4).

Кислотный гидролиз подфракций (5%-й водный раствор серной кислоты, 100°C , 6 ч) привел к получению агликона с Rf 0,27 (пластинка «Silufol UV—254», система растворителей хлороформ-метанол-вода 70:23:1, проявитель-ванилин-

фосфорный реактив) и двух углеводных компонентов, идентифицированных хроматографически как D-глюкоза и L-рамноза; щелочной гидролиз (5%-й водный раствор калия гидроксида, 100°C , 2 ч) — агликона с Rf 0,22 и D-глюкозы, идентифицированных в указанных выше условиях.

Данные хроматографического анализа, ИК-, ^1H -ЯМР-спектральные характеристики позволяют охарактеризовать соединения как гликозиды дигидроксибутановой кислоты.

В результате последующего исследования установлено, что фармакологически активная фракция, кроме указанных соединений, содержит тритерпеновые гликозиды. При кислотном гидролизе фракции (5%-й водный раствор серной кислоты, 100°C , 4 ч) получена олеаноловая кислота и хедерагенин, что указывает на принадлежность тритерпеновых гликозидов княжика сибирского к β-амириновому ряду.

Обсуждение

Из надземной части княжика сибирского *Atragene speciosa* Weinm. сем. Ranunculaceae получена фракция, обладающая выраженным ноотропным эффектом, из которой выделены 3,4-дигидроксифенилэтанол-2 и его 2-О-β-D-глюкопиранозид, а также сумма гликозидов дигидроксибутановой кислоты. В фармакологически активной фракции, кроме указанных веществ, выявлено содержание тритерпеновых гликозидов (сапогенинами которых являются хедерагенин и олеаноловая кислота), аминокислот и микроэлементов.

Впервые полученные нами данные о биологически активных веществах и их фармакологической активности дают возможность создания нового фитопрепарата ноотропного действия на основе княжика сибирского.

Автор выражает признательность и благодарность заведующему кафедрой фармацевтической и токсикологической химии СГМУ, профессору, д.ф.н. Краснову Е.А., в.н.с. НИИ фармакологии ТНЦ СО РАН, профессору, д.м.н. Суслову Н.И., заведующему лабораторией природных соединений ИрИХ СО РАН, д.х.н. Семенову А.А., с.н.с. лаборатории природных соединений ИрИХ СО РАН, к.х.н. Сырчиной А.И. за помощь в

проведении исследований и обсуждении полученных результатов.

Литература

1. Баторова О.М. Применение лекарственных растений в тибетской медицине // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока. Томск, 1986. С. 17—18.
2. Блинова К.Ф., Куваев В.Б. Лекарственные растения тибетской медицины Забайкалья // Вопросы фармакогнозии. 1965. Т. XXIII, Вып. 3. С. 52—56.
3. Буткус Б.Ю., Блинова К.Ф. Некоторые рецептурные прописи, используемые в тибетской медицине Забайкалья // Вопросы фармакогнозии. 1968. Т. XXVI, Вып. 5. С. 247—263.
4. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Под. ред. Е. Сироткиной. Томск: Изд-во Томского университета, 1987. 184 с.
5. Добряков Ю.И. Скрининговый метод оценки антистрессорного действия препаратов // Стресс и адаптация: Тез. Всесоюз. Симпоз. Кишинев, 1978. С. 172.
6. Зайцев Г.Н. Математическая статистика в экспериментальной ботанике. М.: Наука, 1984.
7. Краснов Е.А., Шилова И.В., Суслов Н.И. Исследования по разработке оригинального ноотропного фитопрепарата // Фармация в XXI веке: инновации и традиции: Тез. докл. Междунар. конф. (7—8 апреля 1999 г.). СПб., 1999. С. 167.
8. Крылов В.В. Травы жизни и их искатели. Новосибирск: Зап.-сиб. изд-во, 1972. 447 с.
9. Минаева В.Г. Лекарственные растения Сибири / Отв. ред. А.В. Куминова. Новосибирск: Наука, 1991. 428 с.
10. Суслов Н.И. Патогенетическое обоснование психофармакологических эффектов препаратов природного происхождения. Дис.... докт. мед. наук. Томск, 1995. 406 с.
11. Тимохина С.А. *Atragene L.* Княжик // Флора Сибири. Новосибирск: ВО «Наука», 1993. Т. 6. С. 155—159.
12. Шилова И.В., Краснов Е.А., Суслов Н.И. Химико-фармакологическое изучение активной фракции *Atragene speciosa* Weinm // Бюллетень СО РАМН. 2001. < 3. С. 44—49.
13. Шилова И.В., Суслов Н.И., Краснов Е.А. Адаптогенные и ноотропные свойства густого экстракта из наземной части *Atragene sibirica L.* // Растительные ресурсы. 2001. Т. 37, Вып. 3. С. 78—88.
14. Шилова И.В., Сырчина А.И., Краснов Е.А., Семенов А.А., Суслов Н.И. Химико-фармакологическое исследование активной фракции *Atragene sibirica L.* // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: Матер. Междунар. конф. (27—29 июня 2000 г.). Томск, 2000. С. 72.

Поступила в редакцию 12.02.2002 г.