

ИЗУЧЕНИЕ НАКОПЛЕНИЯ ИРИДОИДОВ В ПЛОДАХ ВИТЕКСА СВЯЩЕННОГО РАЗЛИЧНЫХ МЕСТ ПРОИЗРАСТАНИЯ

Г.В. Адамов

аспирант, науч. сотрудник, лаборатория атомарно-молекулярной биорегуляции и селекции, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

О.Л. Сайбель

к.фарм.н., руководитель Центра химии и фармацевтической технологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)
E-mail: olster@mail.ru

Т.Д. Даргаева

д.фарм.н., профессор, гл. науч. сотрудник, отдел фитохимии и стандартизации, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Москва)

Л.А. Логвиненко

науч. сотрудник, лаборатория ароматических и лекарственных растений, ФГБНУ «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН» (г. Ялта, Крым)

О.М. Шевчук

д.б.н., зав. лабораторией ароматических и лекарственных растений, зам. директора по науке, ФГБНУ «Никитский ботанический сад — Национальный научный центр РАН» (г. Ялта, Крым)

Актуальность. В настоящее время поиск новых видов лекарственных растений и создание на их основе эффективных лекарственных средств остаётся одним из актуальных направлений отечественной фармацевтической науки. Перспективным объектом исследования в направлении создания отечественного лекарственного средства для коррекции нарушений женской репродуктивной системы является витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.)

Цель работы. Изучение накопления иридоидов в плодах витекса священного для выявления различий в содержании данной группы биологически активных веществ в зависимости от места произрастания растения.

Материал и методы. Объектом исследования являлись высушенные плоды витекса священного, заготовленные в Македонии, Греции, Абхазии, Республики Крым. Определение суммы иридоидов проводили методом спектрофотометрии по реакции образования комплексного соединения с реактивом Трим-Хилла. Содержание агнузида оценивали методом ВЭЖХ-УФ.

Результаты. Проведено изучение накопления иридоидов и агнузида в плодах витекса священного, заготовленных в различных местах произрастания растения. Полученные данные позволяют установить норму содержания суммы иридоидов в плодах витекса не менее 1%.

Выводы. Разработанная и валидированная методика оценки содержания суммы иридоидов может быть использована в качестве методики количественного определения при стандартизации плодов витекса священного, а подобранные условия ВЭЖХ-анализа агнузида – применены для подтверждения подлинности данного сырья. Полученные данные будут использованы при разработке нормативной документации на новый вид лекарственного растительного сырья «Витекса священного плоды».

Ключевые слова: витекса священного плоды, флавоноиды, иридоиды, агнузид.

Для цитирования: Адамов Г.В., Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Логвиненко Л.А., Шевчук О.М. Изучение накопления иридоидов в плодах витекса священного различных мест произрастания. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(7):3–8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-07-01>

В настоящее время поиск новых видов лекарственных растений и создание на их основе эффективных лекарственных средств остается одним из актуальных направлений отечественной фармацевтической науки. В данном аспекте растения рассматриваются в качестве источника получения как индивидуальных соединений, обладающих фармакологической активностью, так и суммарных фармацевтических субстанций, основой кото-

рых служит комплекс вторичных метаболитов различных групп.

Для обоснования способа получения и выбора рациональной технологии при разработке лекарственного средства растительного происхождения особое внимание уделяется характеристике химического состава нативного растительного сырья.

Перспективным объектом исследования в направлении создания отечественного лекарствен-

ного средства для коррекции нарушений женской репродуктивной системы является витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.) – многолетний древовидный кустарник семейства вербеновые (*Verbenaceae*), произрастающий от Индии до Черноморского побережья. Плоды данного растения применяются для устранения предменструального синдрома, улучшения психоэмоционального состояния женщин, нормализации менструального цикла в традиционной медицине разных стран, а также служат сырьем для получения лекарственных средств [1, 2].

Согласно данным литературы, в основе механизма действия лечебных средств на основе плодов витекса священного лежит взаимодействие его вторичных метаболитов с дофаминовыми рецепторами гипоталамо-гипофизарной системы, с опиоидными рецепторами центральной нервной системы, а также проявление непосредственно эстрогенной активности. Такое комплексное действие данного растительного сырья, обусловлено наличием биологически активных веществ различных групп: иридоидов, флавоноидов и терпеноидов [3–5], при этом доминирующими соединениями являются иридоиды.

Ц е л ь р а б о т ы – изучение накопления иридоидов в плодах витекса священного для выявления различий в содержании данной группы биологически активных веществ в зависимости от места произрастания растения.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись высушенные плоды витекса священного, заготовленные в Македонии в 2017, 2018 гг.; Греции в 2018 г.; Абхазии в 2018 г., Республики Крым (г. Ялта, дикорастущий) в 2018 г.; Республики Крым (г. Ялта, Никитский ботанический сад) в 2018 г.; а также образец ООО «Топ продукт», приобретенный в розничной торговой сети как приправа.

В работе использовали следующие реактивы и растворители: спирт этиловый 96%-ный (ГОСТ Р 5962-2013), вода очищенная (ГФ XIV, ФС 2.2.0020.18), реактив Трим-Хилла (раствор кислоты уксусной ледяной (марки Ч), 0,2%-ного раствора меди сульфата (марки Ч) и кислоты хлористоводородной концентрированной (марки Ч) в соотношении 20:2:1) [6, 7], ацетонитрил, трифторуксусная кислота, агнузид (стандартный образец), выделенный из плодов витекса священного методом колоночной хроматографии на силикагеле и

идентифицированный методом ЯМР-спектроскопии (содержание основного вещества по данным ВЭЖХ не менее 96%).

Определение оптической плотности проводили с использованием спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония).

Исследование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) выполняли на хроматографе фирмы Shimadzu, модель Prominence-I LC-2030C 3D с диодно-матричным детектором. Разделение проводили на колонке XTerra® RP18 3.5 μ m 2.1×150 mm Column (термостатирование при 30 °С). Элюирование осуществляли при скорости потока 0,3 мл/мин в градиентном режиме. Элюент А – 0,1%-ный водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент В – ацетонитрил. Режим элюирования: 0 мин – 5% (В), 20 мин – 12% (В), 30 мин – 12% (В). Детектирование выполняли при длине волны 257 нм.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с использованием программного обеспечения «Microsoft Office Excel 2019».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки содержания иридоидов в плодах использована методика, основанная на реакции избирательного взаимодействия иридоидов аукубинового ряда с реактивом Трим-Хилла и последующем измерении оптической плотности комплексного соединения, придающее раствору синее окрашивание.

При изучении УФ-спектра комплекса иридоидов плодов витекса священного с реактивом Трим-Хилла установлено, что максимум поглощения наблюдается при 597±2 нм, аналогичный максимум имеет комплекс агнузида с реактивом Трим-Хилла, поэтому в качестве аналитической предложено выбрать длину волны 597±2 нм и проводить расчет содержания суммы иридоидов в пересчете на агнузид (рис. 1).

В процессе дальнейших исследований были подобраны условия экстракции, позволяющие установить, что наибольшее извлечение иридоидов из сырья достигается при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70%-ного, экстракции на кипящей водяной бане в течение 2 ч в соотношении сырье–экстрагент (1:100). Определено, что оптимальным является проведение реакции комплексообразования в течение 20 мин при температуре 70 °С в соотношении с реактивом Трим-Хилла 2:1.

Подобранные условия положены в основу методики количественного определения суммы иридоидов в плодах витекса священного. Для оценки пригодности разработанной методики проведена ее валидация по показателям специфичность, линейность, правильность, сходимость и воспроизводимость.

Специфичность методики подтверждали путем совпадения максимумов поглощения комплексного соединения иридоидов и стандартного образца (СО) агнузида с реактивом Трим-Хилла при длине волны 597 ± 2 нм.

Линейность проверяли на пяти уровнях концентраций СО агнузида в диапазоне от 0,02 до 0,201 мг/мл. Коэффициент корреляции составил 0,9974 (рис. 2).

Для проверки правильности методики использовали метод добавок СО агнузида (табл. 1). Среднее значение процента восстановления составило 100,86 %, что отвечает критерию приемлемости.

Сходимость методики определяли при шести параллельных измерениях. Установлено, что относительное стандартное отклонение RSD (коэффициент вариации) составляет 2,053%, относительная ошибка единичного определения не превышает 2,12%.

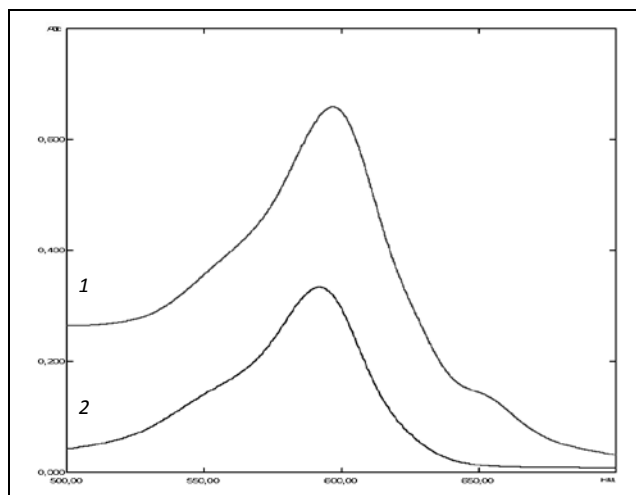


Рис. 1. УФ-спектр поглощения комплекса иридоидов плодов витекса священного (1) и агнузида (2) с реактивом Трим-Хилла

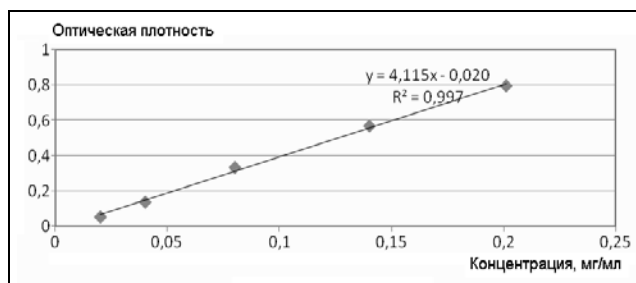


Рис. 2. График линейности СО агнузида

Таблица 1. Результаты проверки правильности методики

Содержание суммы иридоидов в исходном извлечении, мг	Добавлено агнузида, мг	Рассчитано содержание иридоидов, мг	Получено содержание суммы иридоидов, мг	Абсолютная ошибка, мг	Процент восстановления, %
0,507	0,1203	0,6273	0,6426	0,0153	102,44
0,507	0,2406	0,7476	0,7607	0,0130	101,75
0,507	0,3609	0,8679	0,8540	-0,0159	98,40

Результаты измерений показали, что данная методика имеет удовлетворительные характеристики, необходимые для ее использования в фармацевтическом анализе, и демонстрирует приемлемую специфичность, линейность, правильность, сходимость и воспроизводимость. Однако ввиду нестабильности комплекса иридоидов аукубинового ряда измерение оптической плотности испытуемого раствора необходимо проводить параллельно с измерением оптической плотности раствора СО агнузида.

Преобладающим компонентом группы иридоидов в плодах витекса священного является агнузид. Для оценки его содержания в сырье была разработана методика ВЭЖХ-анализа. В исследо-

ваниях использовали извлечение, полученное для спектрофотометрического определения иридоидов, хроматографирование проводили в условиях, подобранных экспериментальным путем, позволяющих избирательно определять агнузид в водно-спиртовом извлечении из данного сырья. Валидация методики позволила подтвердить ее по показателям специфичности (время удерживания агнузида на хроматограмме испытуемого раствора соответствует аналогичному на хроматограмме стандартного образца – примерно 30,4 мин), линейности (коэффициент корреляции 0,9999), правильности (средний коэффициент восстановления составляет не более 5%), сходимости (RSD = 0,914%, относительная ошибка единичного определения 0,96%).

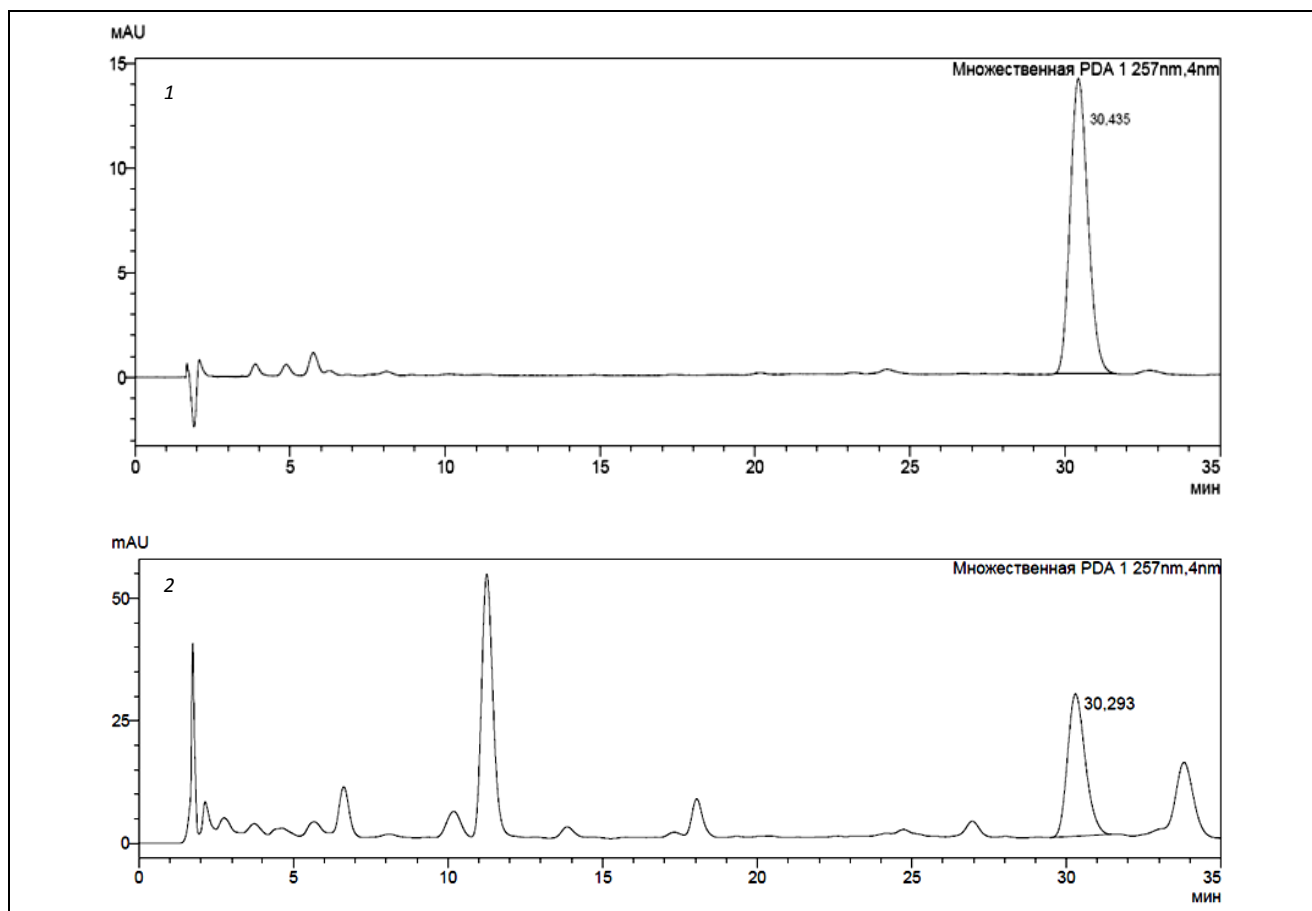


Рис. 3. ВЭЖХ-хроматограммы СО агнузида (1) и извлечения из плодов витекса священного (2)

Таблица 2. Содержание суммы иридоидов и агнузида в плодах витекса священного

Место произрастания	Год заготовки	Содержание суммы иридоидов в пересчете на агнузид, %	Содержание агнузида, %
Македония	2017	1,39±0,03	0,70±0,01
Македония	2018	1,43±0,03	0,63±0,01
Греция	2018	1,05±0,02	0,44±0,01
Абхазия	2018	0,29±0,01	0,090±0,001
Крым (г. Ялта)	2018	1,53±0,03	0,95±0,01
Крым (г. Ялта, НБС)	2018	1,69±0,04	1,31±0,01
Образец ООО «Топ продукт»	2017	1,24±0,04	0,40±0,01

В процессе дальнейших исследований с использованием разработанных методик проведен анализ содержания суммы иридоидов и агнузида в образцах плодов витекса священного, заготовленного в различных местах его произрастания. Результаты приведены в табл. 2.

Полученные данные показывают, что содержание иридоидов в сырье, заготовленном в различных местах произрастания витекса священного, находится в пределах от 0,29±0,01% до 1,69±0,04%. Наибольшее содержание иридоидов отмечено в образце сырья, собранного в Никит-

ском ботаническом саду г. Ялты. Образец, заготовленный в Абхазии, показал наименьшие результаты. При анализе причин столь низкого содержания по сравнению с другими образцами выявлено, что заготовитель после сбора хранил собранное сырье под металлической крышей на чердаке, Температура воздуха в дневные часы в месте хранения сырья достигала достаточно высоких значений, что могло привести к разрушению термолabileных соединений.

Во всех образцах содержание агнузида составляет в среднем примерно 50% от общей суммы иридоидов, что подтверждает его доминирующую долю в данной группе веществ плодов витекса священного.

Таким образом, плоды витекса священного, заготовленные на территории Республики Крым могут служить отечественным сырьем для получения лекарственных средств из данного сырья.

ВЫВОДЫ

1. В результате изучения накопления иридоидов и агнузида в плодах витекса священного, заготовленных в различных местах произрастания растения, получены данные, позволяющие установить норму содержания суммы иридоидов в плодах витекса не менее 1%.
2. Разработанная и валидированная методика оценки содержания суммы иридоидов может быть использована в качестве методики количественного определения при стандартизации плодов витекса священного, а подобранные условия ВЭЖХ-анализа агнузида – применены для подтверждения подлинности данного сырья.
3. Полученные данные будут использованы при разработке нормативной документации на

новый вид лекарственного растительного сырья «Витекса священного плоды».

Исследования выполнены в рамках реализации плана научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме № 0576-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wuttke W., Jarry H., Christoffel V., Spengler B., Seidlová-Wuttke D. Chaste tree (*Vitex agnus-castus*) – pharmacology and clinical indications. *Phytomedicine*. 2003; 10(4):348–357. DOI: 10.1078/094471103322004866.
2. Prilepskaya V.N., Ledina A.V., Tagiyeva A.V., Revazova F.S. *Vitex agnus castus*: Successful treatment of moderate to severe premenstrual syndrome. *Maturitas*. 2006; 55: S55–S63. DOI: 10.1016/j.maturitas.2006.06.017.
3. Jarry H., Spengler B., Wuttke W., Christoffel V. In vitro assays for bioactivity-guided isolation of endocrine active compounds in *Vitex agnus-castus*. *Maturitas*. 2006;(55): S26–S36. DOI: 10.1016/j.maturitas.2006.06.014.
4. Liu J., Sun Y., E. Joanna S. Burdette Deng Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chaste-berry). *Phytomedicine*. 2004; 11(1): 18–23. DOI: 10.1078/0944-7113-00331.
5. Meier B., Berger D., Hoberg E., Sticher O., Schaffner W. Pharmacological activities of *Vitex agnus-castus* extracts *in vitro*. *Phytomedicine*. 2000; 7(5):373–381. DOI: 10.1016/S0944-7113(00)80058-6.
6. Кузина В.Н., Малащенко Е.А., Эллер К.И. Стандартизация лекарственного растительного сырья, содержащего иридоиды (обзор). *Сеченовский вестник*. 2011; (3–4): 31–38 (Kuzina V.N., Malashenko E.A., Jeller K.I. Standartizacija lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ja, sodержashhego iridoidy (obzor). *Sechenovskij vestnik*. 2011; (3–4): 31–38).
7. Bowers M.D. Iridoid glycosides. Academic Press. Orlando, FL. 1991: 297–325.

Поступила 10 июня 2020 г.

STUDY OF IRIDOID ACCUMULATION IN THE VITEX AGNUS-CASTUS FRUITS DIFFERENT PLACES OF GROWTH

© Authors, 2020

G.V. Adamov

Post-graduate Student,

Federal State Budgetary Institution «All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants» (Moscow)

O.L. Saybel

Ph.D. (Pharm.), Research Scientist,

Federal State Budgetary Institution «All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants» (Moscow)

E-mail: olster@mail.ru

T.D. Dargaeva

Dr.Sc. (Pharm.),

Federal State Budgetary Institution «All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants» (Moscow)

L.A. Logvinenko

Research Scientist,

Federal State Budgetary Institution

«Nikitsky Botanical Garden- National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences» (Yalta, Crimea)

O.M. Shevchuk

Dr.Sc. (Biol.),

Federal State Budgetary Institution

«Nikitsky Botanical Garden- National Scientific Center of the Russian Academy of Sciences» (Yalta, Crimea)

Relevance. At present, the search for new types of medicinal plants and the creation on their basis of effective medicines remains one of the relevant areas of domestic pharmaceutical science. A promising research object in the direction of creating a domestic drug for the correction of female reproductive system disorders is the chaste tree (*Vitex agnus-castus* L.)

The aim of this work was to study the accumulation of iridoids in the chaste tree fruits to identify differences in the content of this group of biologically active substances depending on the location of the plant.

Material and methods. The object of the study was the dried chaste tree fruits, harvested in Macedonia, Greece, Abkhazia, and the Republic of Crimea. The determination of the amount of iridoids was carried out by spectrophotometry according to the reaction of complexation with the Trim-Hill reagent. The agnuside content was evaluated by HPLC-UV.

Results. As a result of the research, a study was made of the accumulation of iridoids and agnuside in the chaste tree fruits, harvested in various places where the plant grows. The data obtained allow us to establish a norm of the content of the amount of iridoids in the chaste tree fruits not less than 1%.

Conclusion. The developed and validated methodology for assessing the content of the amount of iridoids can be used as a quantitative determination method for standardizing the chaste tree fruits, and the selected conditions of the HPLC analysis of agnuside are used to confirm the authenticity of this raw material.

The data obtained will be used in the development of regulatory documentation for a new type of medicinal plant material «*Vitex agnus-castus* fruit».

Key words: *Vitex agnus-castus* fruits, flavonoids, iridoids, agnuside.

For citation: Adamov G.V., Saybel O.L., Dargaeva T.D., Logvinenko L.A., Shevchuk O.M. Study of iridoid accumulation in the vitex agnus-castus fruits different places of growth. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(7):3-8. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-07-01>



Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«**Всероссийский научно-исследовательский институт
лекарственных и ароматических растений**»

приглашает к сотрудничеству
фармпроизводителей и сельхозпредприятия
для совместного продвижения наших научных разработок.
Мы предлагаем лекарственные фитопрепараты к производству
и агротехнологии лекарственных и ароматических культур
для выращивания в различных регионах России

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Fax: 8(495)712-09-18

e-mail: vilarnii.ru

www.vilarnii.ru