

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>  
УДК 615.322



Оригинальная статья/Research article

## Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.)

Г. В. Адамов<sup>1\*</sup>, Е. С. Мельников<sup>2</sup>, И. А. Лупанова<sup>1</sup>, А. И. Радимич<sup>1</sup>, О. Л. Сайбель<sup>1</sup>

1 – ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР), 117216, Россия, г. Москва, ул. Грина, д. 7, стр. 1  
2 – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

\*Контактное лицо: Адамов Григорий Васильевич. E-mail: [grig.adamov@mail.ru](mailto:grig.adamov@mail.ru)

ORCID: Г. В. Адамов – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>; Е. С. Мельников – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>; И. А. Лупанова – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; А. И. Радимич – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; О. Л. Сайбель – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>.

Статья поступила: 07.05.2020. Статья принята в печать: 16.07.2020. Статья опубликована: 28.08.2020

### Резюме

**Введение.** Плоды Витекса священного являются перспективным источником получения фармацевтической субстанции для создания на её основе отечественного лекарственного средства для коррекции негативных проявлений предменструального синдрома и нарушений менструального цикла.

**Цель.** Изучить химический состав водно-этанольного экстракта плодов Витекса священного. Установить дофаминергическую активность различных фракций экстракта, разделенных по признаку липофильности для выявления наиболее активной фракции вторичных метаболитов.

**Материалы и методы.** Исследование качественного состава водно-этанольного извлечения проводили методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС. Идентификацию компонентов экстракта проводили путём сопоставления времен удерживания на хроматограммах испытуемого и стандартного образцов. Суммарный экстракт и фракции, полученные обработкой последовательно органическими растворителями различной полярности кубового остатка водно-спиртового извлечения из исследуемого сырья, были проанализированы с применением тирозингидроксилазной биотест-системы *in vitro*. В качестве препарата сравнения использовали Циклодинон®, капли для приема внутрь, действующим веществом которого является Прутняка обыкновенного плодов экстракт (*Vitex agni casti fructuum extract*).

**Результаты и обсуждение.** В исследуемом экстракте подтверждено наличие соединений: протокатеховая кислота, каftarовая кислота, хлорогеновая кислота, *l*-гидроксibenзойная кислота, агнузид, мизодендрон, 6'-*O*-*p*-гидроксibenзоилмусаенозидная кислота, лютеолин-7-глюкозид, 3,5-дифеолхинная кислота, витексин, лютеолин, апигенин, кастидин, артеметин, маслиниковая кислота, корозоловая кислота, линоленовая кислота, впервые идентифицированы цикориевая, кааftarовая и изохлорогеновая А кислоты. Полученный в лабораторных условиях жидкий экстракт продемонстрировал сопоставимую активность с коммерческим препаратом, на этом же уровне находились и этилацетатная фракция, и агнузид.

**Заключение.** Описаны результаты ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС/МС анализа экстракта плодов Витекса священного. Приведены времена удерживания, максимумы поглощения в УФ области, характерные ионы масс-спектры большинства идентифицированных соединений. После фракционирования по принципу липофильности установлено, что ни одна из фракций экстракта не демонстрирует большую активность, чем суммарный экстракт. Это доказывает синергическое действие компонентов на дофаминовую нейромедиаторную систему и показывает целесообразность использования суммарного экстракта плодов Витекса священного. Агнузид в опытах *in vitro* демонстрирует высокую дофаминергическую активность, что допускает возможность стандартизации экстракта и лекарственного растительного сырья по содержанию агнузида.

**Ключевые слова:** Витекс священный, агнузид, ВЭЖХ-МС/МС, дофаминергическое действие.

**Конфликт интересов:** конфликта интересов нет.

**Вклад авторов.** Авторы Г. В. Адамов, И. А. Лупанова, О. Л. Сайбель придумали и разработали эксперимент. Авторы Г. В. Адамов, Е. С. Мельников, А. И. Радимич провели химическое изучение плодов Витекса священного. И. А. Лупанова анализировала дофаминергические свойства с помощью тирозингидроксилазной биотест-системы и обработала полученные результаты. Все авторы участвовали в написании текста статьи и обсуждении результатов.

**Для цитирования:** Адамов Г. В., Мельников Е. С., Лупанова И. А., Радимич А. И., Сайбель О. Л. Изучение химического состава и дофаминергической активности плодов Витекса священного (*Vitex agnus-castus* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):143–149. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>

## Investigation of the Chemical Composition and Dopaminergic Activity of the *Vitex Agnus-castus* Fruits

Grigoriy V. Adamov<sup>1\*</sup>, Evgenij S. Melnikov<sup>2</sup>, Irina A. Lupanova<sup>1</sup>, Andrej I. Radimich<sup>1</sup>, Ol'ga L. Saybel<sup>1</sup>

1 – All-Russian research Institute of medicinal and aromatic plants, Russia, 7/1, Green str., Moscow, 117216, Russia

2 – I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University), 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

\*Corresponding author: Grigoriy V. Adamov. E-mail: [grig.adamov@mail.ru](mailto:grig.adamov@mail.ru)

ORCID: Grigoriy V. Adamov – <https://orcid.org/0000-0001-7347-175X>; Evgenij S. Melnikov – <https://orcid.org/0000-0002-8993-4808>; Irina A. Lupanova – <https://orcid.org/0000-0001-8183-2877>; Andrej I. Radimich – <https://orcid.org/0000-0002-1139-8902>; Ol'ga L. Saybel – <https://orcid.org/0000-0001-8059-5064>.

Received: 07.05.2020. Revised: 16.07.2020. Published: 28.08.2020

### Abstract

**Introduction.** *Vitex agnus-castus* is an important plant in medicine. Extract from its fruits is used as part of drugs for the treatment of premenstrual syndrome.

© Адамов Г. В., Мельников Е. С., Лупанова И. А., Радимич А. И., Сайбель О. Л., 2020

© Adamov G. V., Melnikov E. S., Lupanova I. A., Radimich A. I., Saybel O. L., 2020

**Aim.** To study the chemical composition of water-ethanol extract from Vitex fruits, to establish the dopaminergic activity of various extract fractions separated by lipophilicity, as that of its dominant iridoid-agnuside

**Materials and methods.** The composition of water-ethanol extraction was studied using HPLC-UV and HPLC-MS/MS methods. Identification of the extract components was performed by comparing the retention times on the chromatograms of the test and standard samples. The extract and its fractions were analyzed *in vitro* using the tyrosine hydroxylase biotest system. Cycloclonone® (oral drops, Vitex agni casti fructuum extract) was used as a reference drug.

**Results and discussion.** Protocatechuic acid, chlorogenic acid, p-hydroxybenzoic acid, agnuside, mizodendron, 6'-O-p-hydroxybenzoylmusaenoside acid, luteolin-7-glucoside, 5-O-caffeoylquinic acid, vitexin, luteolin, apigenin, maslinic acid, corosolic acid and linolenic acid were identified. The liquid extract obtained in the laboratory showed the same activity as Cycloclonone®, ethyl acetate fraction, and agnuside.

**Conclusion.** This work is the most extensive study of the vitex fruit in relation to the nomenclature of identified compounds. The total extract was shown to be more active than any of its fractions proving the synergistic effect of the extract components on the dopamine neurotransmitter system. This observation justifies the feasibility of using the total extract of the vitex fruit. *In vitro* agnuside demonstrates high dopaminergic activity. This makes it possible to standardize the extract and medicinal plant materials according to the agnuside content.

**Keywords:** Vitex agnus-castus, agnuside, HPLC-MS/MS, dopaminergic effect.

**Conflict of interest:** no conflict of interest.

**Contribution of the authors.** Authors Grigorij V. Adamov, Irina A. Lupanova, Ol'ga L. Saybel the experiment was developed by the authors Grigorij V. Adamov, Evgenij S. Melnikov, Andrej I. Radimich analyzed the chemical composition of the fruit of the Vitex agnus-castus. Irina A. Lupanova investigated dopaminergic properties using the tyrosine hydroxylase biotest-system and processed the results. All authors participated in writing the text of the article and discussing the results.

**For citation:** Adamov G. V., Melnikov E. S., Lupanova I. A., Radimich A. I., Saybel O. L. Investigation of the chemical composition and dopaminergic activity of the Vitex agnus-castus fruits. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(3):143-149. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-143-149>

## ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные средства растительного происхождения наряду с синтетическими препаратами широко используются для профилактики и лечения различных заболеваний. Зачастую уступая по эффективности, но при этом обладая меньшей токсичностью и минимальным проявлением побочных реакций, лекарственные растительные средства служат препаратами выбора для устранения симптоматических проявлений, а также и при хроническом течении в комплексной терапии патологических процессов.

Так, в гинекологической практике растительные препараты используются при нивелировании нежелательных проявлений предменструального синдрома (ПМС), коррекции нарушений менструального цикла, профилактики метаболических нарушений в климактерическом периоде и др. [1]. В них часто входит экстракт плодов Витекса священного. На территории РФ зарегистрирован препарат Циклодинон®, выпускающийся в форме таблеток и раствора для приема внутрь, также применяются многочисленные БАД (биологически активные добавки), наиболее популярны из которых мастокапс и мастофит.

Витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.) представляет собой многолетний древовидный кустарник семейства Вербеновые (*Verbenaceae*), произрастающий от Индии до черноморского побережья. Плоды данного растения широко используется в традиционной медицине разных стран для устранения симптомов ПМС, улучшения психоэмоционального состояния женщин,

нормализации менструального цикла, а также служат лекарственным растительным сырьём для получения официальных лекарственных средств.

В настоящее время на отечественном фармацевтическом рынке зарегистрирован препарат Циклодинон®, активной фармацевтической субстанцией которого является сухой экстракт плодов Витекса. Опубликованные результаты клинических исследований свидетельствуют об эффективности и безопасности применения данного лекарственного средства для устранения симптомов ПМС, включая предменструальную мастодинию [2, 3].

Согласно данным литературы в основе механизма действия экстракта плодов Витекса лежит взаимодействие его вторичных метаболитов с дофаминовыми рецепторами гипоталамо-гипофизарной системы. Наряду с этим в опытах *in vitro* показано, что фармакологический эффект фракций данного растительного сырья обусловлен взаимодействием с опиоидными рецепторами центральной нервной системы, а также непосредственно эстрогенной активностью, т. е. обладает комплексным действием [4–6].

Таким образом, в рамках расширения номенклатуры отечественных лекарственных препаратов целесообразным является создание лекарственного средства на основе суммы биологически активных веществ плодов Витекса священного, доминирующим компонентом которого служат метаболиты, обладающие дофаминергической активностью.

В связи с этим целью настоящего исследования является выявление группы вторичных метаболитов, обладающих наибольшей дофаминергической актив-

ностью для разработки способа получения и обоснования методик стандартизации отечественной фармацевтической субстанции на основе плодов Витекса священного.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили высушенные спелые плоды Витекса священного, произрастающего в Македонии (2018 год заготовки).

В работе были использованы реактивы: спирт этиловый (96 %, ГОСТ Р 5962-2013, Россия), ацетонитрил (for LC-MS, Biosolve Chimie SARL, Франция), трифторуксусная кислота (ТФУ) (99 %, Panreac, Испания), вода очищенная 18,2 МОм·см, хлороформ (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия), этилацетат (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия), изопропанол (х.ч., ООО «ТД «ХИММЕД», Россия).

Использованные в исследовании стандартные образцы: хлорогеновая кислота, *n*-гидроксибензойная кислота, лютеолин-7-глюкозид, витексин, цикориевая кислота, лютеолин, апигенин – получены методом препаративной колоночной хроматографии. Стандартизация образцов проводилась методами ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-МС и ПМР (протонный магнитный резонанс) методом нормализации. Их чистота составляла не менее 90 %. Образец агнузида был стандартизован методом ядерно-магнитного резонансной спектроскопии, чистота составляет более 96 %.

Для фитохимического исследования использовали извлечение, полученное путём экстракции измельченного растительного сырья спиртом этиловым 70 % в соотношении 1:150 на водяной бане при температуре  $60 \pm 5$  °С в течение 60 мин. Извлечение фильтровали через бумажный складчатый фильтр «Синяя лента», отбрасывая первые 20 мл, и использовали для исследования методом ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ проводили на оборудовании ВЭЖХ-МС/МС LCMS-8040 – система жидкостной хроматографии Nexera с тройным квадрупольным масс-спектрометром, диодно-матричным спектрофотометрическим детектором Prominence SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.3). Хроматографическое разделение проводилось на колонке Luna 5 мкм C18 100Å 250 × 4,6 мм в градиентном режиме элюирования. Элюент «А» – 0,1 % об. водный раствор трифторуксусной кислоты, элюент «В» – ацетонитрил. Начальная объемная доля элюента «В» составляла 10 %, с 3 по 20 мин повышалась до 25 %, на 30 минуте достигала 40 %, на 40 минуте – 60 %, с 55 по 60 минуту составляет 100 %, затем до 62 минуты система возвращалась к начальным условиям и уравновешивалась до 65 минуты. Скорость элюирования – 1 мл/мин, термостатирование колонки при 30 °С, объем вводимой пробы – 10 мкл.

Идентификацию компонентов экстракта осуществляли по данным УФ-спектров, масс-спектров пиков веществ, их сопоставлению с данными характеристиками ранее выделенных индивидуальных соединений, а также с данными литературы. Для некоторых веществ были подобраны условия детектирования в отличающемся высокой селективностью режиме мониторинга множественных реакций (multiple reaction monitoring – MRM).

Получение фракций биологически активных веществ (БАВ) различной липофильности осуществляли путём трёхкратной экстракции измельченного растительного сырья спиртом этиловым 70 % в соотношении 1:10 на водяной бане при температуре  $60 \pm 5$  °С, концентрирования извлечения до водного остатка и последовательной жидкостной экстракции петролейным эфиром 70/100, хлороформом, насыщенным водой этилацетатом, насыщенным водой спиртом бутиловым (трехкратная экстракция каждым растворителем в соотношении 1:1). Все полученные фракции упаривали до густого состояния на роторном испарителе модели IKA RV 10 при температуре не выше 40 °С, затем досушивали в вакуумном шкафу при той же температуре.

Исследование дофаминергической активности фракций БАВ проводили с использованием специфической тирозингидроксилазной (ТГ) биотест-системы *in vitro*, позволяющей избирательно выявлять вещества, обладающие непосредственным сродством к дофаминергической нейромедиаторной системе [7]. Ее специфичность обусловлена наличием одинаковых участков «узнавания» у дофаминовых рецепторов и тирозингидроксилазы, обеспечивающих избирательное связывание с лигандами, проявляющееся в условиях данного опыта снижением активности последней. Данная ферментная биотест-система входит в состав уникальной научной установки из группы «Биологические коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС) ФГБНУ ВИЛАР».

Тирозингидроксилазу получали из гомогената лейкоцитов крови кроликов породы шиншилла, содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБНУ ВИЛАР. Оценку скорости тирозингидроксилазной реакции, обусловленной окислением 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (ДМПН<sub>4</sub>) в ДМПН<sub>2</sub>, сопряженным с превращением субстрата реакции L-тирозина в L-ДОФА. pH среды 6,2 проводили методом прямой спектрофотометрии на биохимическом анализаторе CLIMA MC-15 (RAL, Испания) при 335 нм, обусловленной окислением 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерина (ДМПН<sub>4</sub>) в ДМПН<sub>2</sub>, сопряженным с превращением субстрата реакции L-тирозина в L-ДОФА. pH среды 6,2.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 10,0 (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распре-

делением, приближающимся к нормальному, использовался t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости P при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлена хроматограмма водно-спиртового экстракта плодов Витекса священного. При этом детектирование осуществляли при длине волны 254 нм, поскольку в этой области спектра поглощает большинство фенольных соединений.

Для определения молекулярной массы веществ в составе экстракта анализировали соответствующие интересующим пикам на хроматограмме масс-спектры, полученные в режимах сканирование полного ионного тока при положительной и отрицательной ионизации. В случае, если значения  $m/z$  соответствуют молекулярному иону, значение  $m/z$  при отрицательной ионизации должно быть на 2 единицы меньше значения  $m/z$  при положительной ионизации, так как основным направлением формирования молекулярных ионов при ионизации электрораспылением являются процессы протонирования или депротонирования молекул. Иными словами, в масс-спектрах искали  $m/z$ , соответствующие  $[M + H]^+$  и  $[M - H]^-$ . Однако не все компоненты экстракта одинаково хорошо ионизируются в обоих режимах, в связи с чем требовались дополнительные критерии обнаружения молекулярных ионов. Особенностью ионизации электрораспылением является возможность формирования аддуктов

и кластеров веществ и компонентов подвижной фазы. Например, в режиме положительной ионизации помимо  $[M + H]^+$  обычно наблюдаются  $m/z [M + 18]^+$  – присоединение катиона аммония,  $[M + 23]^+$  – присоединение катиона натрия и др. Обнаружение этих аддуктов в масс-спектрах значительно повышает достоверность идентификации веществ по молекулярной массе.

В режиме отрицательной ионизации крайне характерно присоединение к депротонированному молекулярному иону ТФУ, в связи с чем в масс-спектре возникают ионы со значением  $m/z [M - H + ТФУ]^-$ , что на 114 единиц больше, чем  $[M - H]^-$ . Таким образом, обнаружение в масс-спектре, полученном при отрицательной ионизации, пары пиков со значениями  $m/z$ , отличающимися на 114 единиц практически гарантирует достоверное определение молекулярной массы.

В результате анализа полученных данных было идентифицировано в исследуемом извлечении 22 соединения (таблица 1).

Таким образом, комплекс БАВ представлен соединениями, относящимися к группам фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, иридоидов и терпеноидов.

В составе экстракта обнаружено 3 изомера лютеолин-глюкозида, благодаря использованию стандарта по времени удерживания удалось идентифицировать лютеолин-7-глюкозид. Использование витексина также позволило исключить при идентификации пика № 11 аналогичный по УФ и масс-спектру изовитексин.

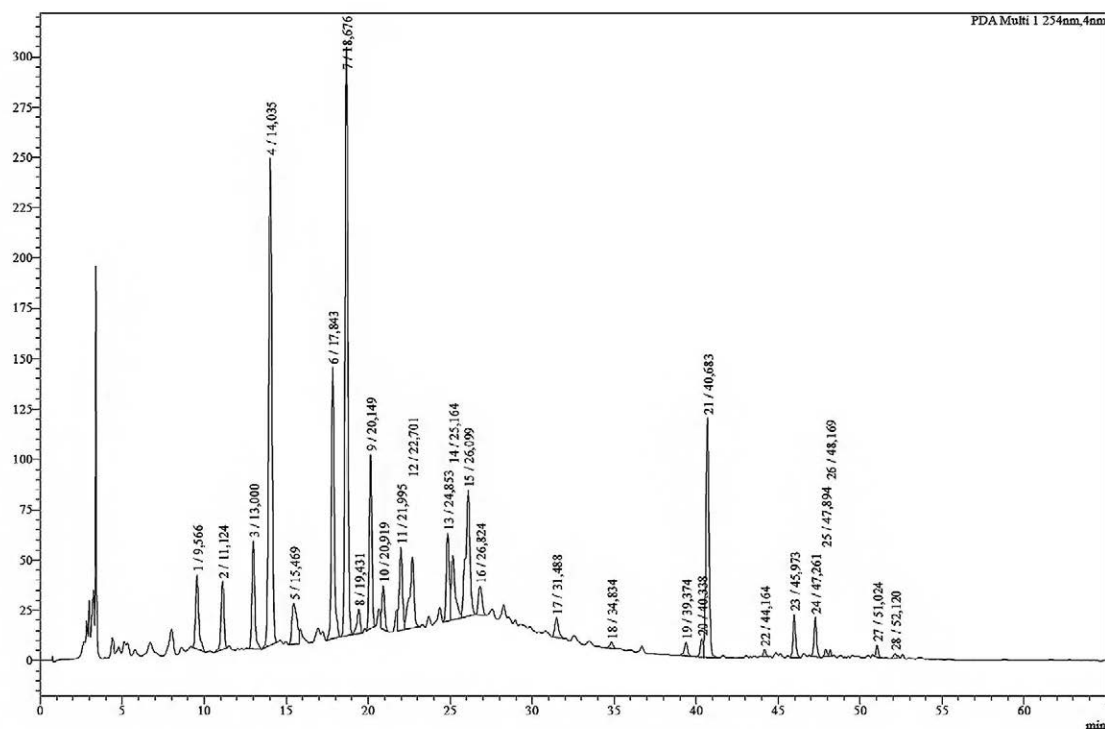


Рисунок 1. ВЭЖХ-УФ хроматограмма водно-спиртового извлечения плодов Витекса священного (254 нм)

Figure 1. HPLC-UV chromatogram of water-alcohol extraction of Vitex agnus-castus fruit (254 nm)

Таблица 1. Характеристика соединений, идентифицированных в плодах витекса священного

Table 1. Characterization of compounds identified in Vitex agnus-castus fruit

	Название Name	Время удерживания, (мин) Retention Time (min)	Молярная масса (Da) Molar mass (Da)	Механизм образования иона The mechanism of ion formation	Основные ионы, (m/z) Basic ions, (m/z)		Максимум поглощения в УФ области, (нм) UV absorption maximum, (nm)	Ранее обнаружено Previously discovered
					положительная ионизация positive ionization	отрицательная ионизация negative ionization		
1	Протокатеховая (3,4-дигидроксibenзойная) кислота Protocatechuic (3,4-dihydroxybenzoic) acid	9,56	154	[M + H] <sup>+</sup>	155		260, 294	[8]
2	Кафтаровая кислота Kaftaric acid	11,12	312	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	313	311	258	–
3	Хлорогеновая кислота <sup>1,3</sup> Chlorogenic acid <sup>1,3</sup>	13,00	354	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	355	353, 467	326	[9]
4	p-гидроксibenзойная кислота <sup>1</sup> p-hydroxybenzoic acid <sup>1</sup>	14,03	138	[M + H] <sup>+</sup>	139	–	250	[8]
5	Лютеолин глюкозид <sup>2</sup> Luteolin Glucoside <sup>2</sup>	17,84	448	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	449	447, 561	349	[10]
6	Агнузид <sup>1</sup> Agnuzide <sup>1</sup>	18,67	466	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	449	447	248	[11]
7	Мизодендрон <sup>2</sup> Misodendron <sup>2</sup>	19,43	342	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	343, 325	341, 455		[12]
8	6'-О-p-гидроксibenзоилмусаено- зидная кислота 6'-O-p- hydroxybenzoylmusaenoside acid	20,14	496	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	497	495, 609	250	[12]
9	Лютеолин-7-глюкозид <sup>1</sup> Luteolin-7-glucoside <sup>1</sup>	21,99	448	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	449	447, 561, 545	346	[10]
10	Изохлорогеновая кислота А <sup>1</sup> Isochlorogenic acid А <sup>1</sup>	24,85	516	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	517, 499	515, 629	328	–
11	Витексин <sup>1</sup> Vitexin <sup>1</sup>	25,16	432	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup>	433, 386	431	–	[13]
12	Цикориевая кислота <sup>1</sup> Chicory acid <sup>1</sup>	26,09	474	[M + H] <sup>+</sup> , [M – H] <sup>-</sup> , [M – H + TФУ] <sup>-</sup>	475	473, 587	329	–
13	Лютеолин <sup>1,2</sup> Luteolin <sup>1,2</sup>	31,48	286	[M + H] <sup>+</sup>	287	–	330	[14]
14	Апигенин <sup>1</sup> Apigenin <sup>1</sup>	34,83	270	[M + H] <sup>+</sup>	271	–	336	[14]
15	Пендулетин/эупаторин Penduletin/eupatorin	39,37	344	[M + H] <sup>+</sup>	345	–	339	[13, 14]
16	Пендулетин/эупаторин Penduletin/eupatorin	40,33	344	[M + H] <sup>+</sup>	345	–	339	[13, 14]
17	Кастичин Casticin	40,68	374	[M + H] <sup>+</sup>	375	–	348	[15]
18	Артеметин Artemetin	44,16	388	[M + H] <sup>+</sup>	389	–	–	[8]
19	Гидрокси-тетраметоксифлаво <sup>2</sup> Hydroxy-tetramethoxyflavone <sup>2</sup>	45,97	358	[M + H] <sup>+</sup>	359	–	358	[16]
20	Маслянико <sup>1</sup> Butyric acid	47,89	472	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	473, 455, 437, 409,	507	–	[14]
21	Корозоло <sup>1</sup> Corosol Acid	48,16	472	[M + H] <sup>+</sup> , [M + H – H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 2H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup> , [M + H – 4H <sub>2</sub> O] <sup>+</sup>	473, 455, 437, 409,	507	–	[14]
22	Линоленовая кислота <sup>2</sup> Linolenic acid <sup>2</sup>	52,12	280	[M – H] <sup>-</sup>	–	279	–	[5]

**Примечание:** <sup>1</sup> Идентификация дополнительно проведена по времени удерживания в соответствии со стандартным образцом.

<sup>2</sup> Идентификация дополнительно проведена с помощью детектирования в режиме MRM.

**Note:** <sup>1</sup> Identification verified additionally using standard substance retention time.

<sup>2</sup> Identification verified additionally using MRM detection.

В основе механизма фармакологического действия суммарных экстрактов витекса лежит влияние на дофаминергическую нейромедиаторную систему. Снижение секреции дофамина в женском организме, например в условиях хронического стресса, может приводить к повышению содержания пролактина в крови, что в свою очередь способствует возникновению пролиферативных изменений в молочной железе и вызывает мастодению, а также выступает причиной недостаточности лютеиновой фазы и, как следствие, бесплодия. Взаимодействуя с дофаминовыми рецепторами вторичные метаболиты витекса позволяют снижать уровень пролактина в крови и тем самым способствуют устранению её негативных проявлений.

В связи с этим именно оценка дофаминергических свойств выбрана нами для скрининговых исследований для выявления наиболее активных фракций БАВ плодов Витекса священного.

Для установления группы веществ, обладающей дофаминергической активностью, нами были получены фракции БАВ различной липофильности и определена их активность *in vitro*. Специфическая ферментная биотест-система *in vitro* на основе тирозингидроксилазы позволяет специфически выявлять вещества, обладающие непосредственным сродством к дофаминергической нейромедиаторной системе [7]. Это обусловлено тем, что в тирозингидроксилазе и дофаминовых рецепторах имеются одинаковые места «узнавания», обеспечивающие избирательное связывание со специфическими лигандами. Поэтому тирозингидроксилаза может использоваться в качестве модели «узнающих» сайтов дофаминовых рецепторов для выявления дофаминергических БАВ. В течение многих лет ТГ считалась нейроспецифическим ферментом. Но в 1985 году было проведено исследование, в результате которого ТГ была обнаружена в белых клетках крови [17]. По своим кинетическим характеристикам ТГ клеток крови близка к ТГ гипоталамуса мозга. Поэтому ТГ клеток крови может быть использована в качестве основы для теста, позволяющего выявлять дофаминергические вещества *in vitro*.

В качестве препарата сравнения был выбран Циклодинон®, также был исследован иридоид агнузид (чистота не менее 96 %) – доминирующий компонент плодов витекса, выделенный нами ранее из данного сырья.

Предварительно изучив форму зависимости скорости реакции от концентрации вещества в пробе, нами было установлено, что зависимость скорости ферментативных реакций *in vitro* от концентрации изучаемых образцов описывается кривой с максимумом, который соответствует оптимальной его концентрации в пробе. Поэтому сравнительное изучение активности фермента в присутствии объектов исследования проводили при оптимальных концентрациях (3,3 и 6,6 мкг/мл).

В таблице 2 представлены результаты определения активности тирозингидроксилазы, все определения проводились в трех повторностях.

**Таблица 2. Влияние фракций экстракта плодов Витекса священного на ингибирование тирозингидроксилазы *in vitro***

**Table 2. The effect of fractions of the extract of vitex fruit on tyrosinehydroxylase inhibition *in vitro***

Наименование образца Sample Name	Скорость реакции, М ± m The reaction rate, M ± m	
	нмоль/мин на 10 мкл гомогената nmol/min per 10 µl of homogenate	%
Контроль Control	6,1 ± 0,29	100
Дофамин, 10 мкМ Dopamine, 10 µM	1,2 ± 0,05*	20
Суммарный экстракт Total extract	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	3,8 ± 0,17*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,4 ± 0,20*
Петролейная фракция Petroleum fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,9 ± 0,21*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,8 ± 0,21*
Хлороформная фракция Chloroform fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	6,7 ± 0,30
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	6,1 ± 0,29
Бутанольная фракция Butanol fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	5,2 ± 0,24*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,9 ± 0,22*
Этилацетатная фракция Ethyl acetate fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,8 ± 0,22*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,1 ± 0,19*
Водная фракция Water fraction	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	6,0 ± 0,29
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	6,0 ± 0,28
Агнузид Agnuzid	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	3,9 ± 0,19*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,4 ± 0,21*
Циклодинон® Cyclodinone®	3,3 мкг/мл 3.3 µg/ml	4,3 ± 0,20*
	6,6 мкг/мл 6.6 µg/ml	4,8 ± 0,22*

**Примечание:** \* Статистическая значимость отличий от контроля при P ≤ 0,05.

M – средняя арифметическая величина.

m – ошибка средней арифметической.

**Note:** \* Level of statistical significance at P ≤ 0.05.

M – arithmetic mean.

m – arithmetic mean error.

Как видно из таблицы 2, дофамин, природный ретроингибитор тирозингидроксилазы и агонист дофаминовых рецепторов, *in vitro* значительно тормозил скорость реакции. Образцы суммарного экстракта, бутанольной, этилацетатной, петролейной

фракций, агнузид 96 %, а также препарат сравнения Циклодинон® оказывали угнетающее действие на активность тирозингидроксилазы. Однако количественно эффекты всех образцов были значительно слабее эффекта дофамина.

Так, в присутствии образца этилацетатной фракции в концентрации 3,3 мкг/мл скорость реакции составляла 68 % от скорости реакции в контроле, в присутствии образца петролейной фракции в большей концентрации – 80 %, в присутствии агнузида (3,3 мкг/мл) – 64 %, в присутствии суммарного экстракта (3,3 мкг/мл) – 61 %. Стоит отметить, что в большей концентрации препарат сравнения Циклодинон® ингибировал фермент слабее: 70 % в присутствии образца в концентрации 6,6 мкг/мл против 79 % при концентрации 3,3 мкг/мл. Аналогичную тенденцию, обратный дозозависимый эффект, продемонстрировал и полученный нами суммарный экстракт.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что суммарный экстракт плодов витекса и препарат Циклодинон® обладают сопоставимой дофаминергической активностью в условиях проведенного эксперимента. Среди фракций БАВ наибольшую активность показала этилацетатная. Согласно проведенному хроматографическому исследованию, в состав данной фракции входят протокатеховая кислота, хлорогеновая кислота, *n*-гидроксibenзойная кислота, лютеолин-7-гликозид и его изомер, агнузид, 6'-*O*-*p*-гидроксibenзоилмусаенозидная кислота, витексин, апигенин. В целом, этилацетатная фракция является самой представительной по номенклатуре фенольных соединений.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований было установлено, что состав вторичных метаболитов плодов Витекса священного представлен фенолкарбоновыми кислотами, флавоноидами, иридоидами и терпеноидами.

Дофаминергическая активность суммарного экстракта плодов витекса сопоставима с таковой у препарата сравнения Циклодинон®. Полученные данные подтверждает рациональность использования суммарного экстракта в качестве фармацевтической субстанции.

Скрининговая оценка биологической активности фракций различной полярности показала, что наибольшее дофаминергическое действие оказывает этилацетатная фракция, в которой находятся идентифицированные иридоиды и многие флавоноиды.

Дофаминергическая активность агнузида аналогична препарату сравнения и суммарному экстракту, что обуславливает возможность стандартизации по содержанию иридоидов группы аукубина, тогда как в настоящее время стандартизация плодов Витекса священного проводится по содержанию кастигина – доминирующего флавоноида плодов витекса, не оказывающего дофаминергических свойств.

## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Wuttke V., Zaydlova-Wuttke D., Yarri G., Artymuk, N. The role of the Vitex agnus castus in gynecological endocrinology. *Zdrov'e zhenshchiny = Health of woman*. 2016;10:24–27. (In Ukraine).
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;55:55–63. 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;55:526–536. Doi: 0.1016/j.maturitas.2006.06.014.
4. 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;55:526–536. Doi: 0.1016/j.maturitas.2006.06.014.
5. Liu J., Burdette J. E., Sun Y., Deng S., Schlecht S. M., Zheng W., Nikolic D., Mahady G., van Breemen R. B., Fong H. S., Pezzuto J. M., Bolton J. L., Farnsworth N. R. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of Vitex agnus-castus L. (chaste-berry). *Phytomedicine*. 2004;11(1):18–23.
6. 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.
7. Mineeva-Vyalykh M. F. A Direct spectrophotometric method for estimation of the rate of tyrosine hydroxylase reaction (Russian). *Voprosy medicinskoj himii = Biomeditsinskaya Khimiya*. 1976;22(2):274–279. (In Russ.).
8. Choudhary M. I., Jalil S., Nawaz S. A., Khan K. M., Tareen R. B. Antiinflammatory and lipoxigenase inhibitory compounds from vitex agnus-castus. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2009;23(9):336–1339. Doi: 10.1002/ptr.2639.
9. Şarer E., Gökbulut, A. Determination of caffeic and chlorogenic acids in the leaves and fruits of Vitex agnus-castus. *Turk J. Pharm. Sci*. 2008;5(3):167–174.
10. Mari A., Montoro P., D'Urso G., Macchia M., Pizza C., Piacente S. Metabolic profiling of Vitex agnus castus leaves, fruits and sprouts: analysis by LC/ESI/(QqQ) MS and (HR) LC/ESI/(Orbitrap)/MSn. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2015;102:215–221. Doi: 10.1016/j.jpba.2014.09.018.
11. Hoberg E., Meier B., Sticher O. An analytical high performance liquid chromatographic method for the determination of agnuside and *p*-hydroxybenzoic acid contents in Agni-casti fructus. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2000;11(5):327–329. Doi: 10.1002/1099-1565(200009/10)11:5<327::AID-PCA523>3.0.CO;2-0.
12. Kuruüzüm-Uz A., Ströck K., Demirezer L. Ö., Zeeck, A. Glucosides from Vitex agnus-castus. *Phytochemistry*. 2003;63(8):959–964. Doi: 10.1016/S0031-9422(03)00285-1.
13. Hajdú Z., Hohmann J., Forgo P., Martinek T., Dervarics M., Zupkó I., Falkay G., Cossuta D., Máthé I. Diterpenoids and flavonoids from the fruits of Vitex agnus-castus and antioxidant activity of the fruit extracts and their constituents. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*. 2007;21(4):391–394. Doi: 10.1002/ptr.2021.
14. Chen S. N., Friesen J. B., Webster D., Nikoli, D., van Breemen R. B., Wang Z. J., Pauli G. F. Phytoconstituents from Vitex agnus-castus fruits. *Fitoterapia*. 2011;82(4):528–533. Doi: 10.1016/j.fitote.2010.12.003.
15. Liu J., Burdette J. E., Xu H., Gu C., Van Breemen R. B., Bhat K. P., Booth N., Constantinou A. I., Pezzuto J. M., Fong H. S., Farnsworth N. R., Bolton J. L. Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2001;49(5):2472–2479. Doi: 10.1021/jf0014157.
16. Makhmoor T., Choudhary M. I. Radical scavenging potential of compounds isolated from Vitex agnus-castus. *Turkish Journal of Chemistry*. 2010;34(1):119–126.
17. Mineeva M. F. Tyrosinehydroxylase of leukocytes from blood. *Byulleten'eksperimental'noj biologii i mediciny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 1987;104(7):99–101. (In Russ.).