

СОДЕРЖАНИЕ ВИНКАМИНА И ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕРПЕНТИН- И АЙМАЛИЦИН-ПОДОБНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ИНТРОДУЦИРОВАННОМ В БЕЛАРУСИ БАРВИНКЕ МАЛОМ

С.Н. Ромашко, Е.М. Червяковский, А.В. Янцевич*, О.В. Молчан, В.М. Юрин

Белорусский Государственный Университет, Минск, Республика Беларусь

*Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Минск, Республика Беларусь

Введение

Барвинок малый (*Vinca minor* L.) – многолетний вечнозеленый стелющийся полукустарник семейства Кутровые (*Aposynaseae*). По данным различных исследователей в данном растении идентифицировано около 40 индольных алкалоидов терпенового ряда. Среди которых: винкамин, изовинкамин, винкаминин, винкаминорин, миновин, томбозин, майдин, резерпин и другие [1–4]. Однако основным алкалоидом *Vinca minor* является винкамин. Его содержание в листьях составляет 0,05–0,13% в пересчете на сухой вес ткани и 65% от общей суммы алкалоидов [1].

Несмотря на значительное количество алкалоидов барвинка малого, фармакологическое действие известно только для двух из них, а именно – для винкамина и резерпина. Так, например, препараты, в состав которых входит винкамин, используются для лечения таких заболеваний, как артериальная гипертензия I и II степени, церебральные формы гипертонии, гипертонические кризы, неврогенная тахикардия (прежде всего у детей) и т.д.

В качестве лекарственного сырья применяется трава барвинка (*Herba Vincae minoris*), которая заготавливается на территориях Венгрии, Болгарии, Украины и других естественных для него мест произрастания европейско-средиземноморского типа ареала. Корневая система *Vinca minor* в качестве фармакологического сырья не применяется. В Беларуси данное растение является интродуцированным. Поскольку содержание алкалоидов в растениях варьирует в довольно широком диапазоне в зависимости от климатических условий, сезона года, географического места произрастания и т.д., интродукция барвинка малого могла оказать существенное влияние на накопление основного фармакологически ценного соединения – винкамина. Кроме того, известно, что факторами, влияющими на биосинтез алкалоидов в растении, являются: возраст растения, возраст и расположение листьев и т.д.

Биосинтез индольных алкалоидов терпенового ряда в *Vinca minor* до сих пор практически не изучен. Имеются только отдельные работы, описывающие начальные этапы биосинтеза. Так, например, некоторыми авторами выдвинуто предположение, что в клетках культуры *Vinca minor* может осуществляться реакция конденсации триптамина и секологанина с образованием стриктозидина – общего предшественника всех индольных алкалоидов терпенового ряда [5]. Дальнейшие ферментативные этапы превращений данных соединений в барвинке малом остаются неизвестными.

Качественный состав индольных алкалоидов, а также содержание винкамина, в различных органах данного растения, произрастающего на территории Беларуси, до настоящего времени остается неизученным. Поэтому, в данной работе был проведен подбор и оптимизация способов разделения и идентификации фармакологически-активных алкалоидов *Vinca minor*, их сравнительная оценка с алкалоидами катарантуса розового, а также анализ содержания винкамина в различных органах барвинка малого.

Методы исследования

Объектом исследования являлось растение семейства Аросупасеае рода *Vinca* L. – *Vinca minor* (барвинок малый). Объектом сравнения служило растение семейства Аросупасеае рода *Catharanthus* G. Don. – *Catharanthus roseus* (катарантус розовый).

Экстракция и очистка алкалоидов индольного ряда. Выделение алкалоидов индольного ряда из корней и листьев данных растений проводили согласно методике, описанной ранее [6] с небольшими изменениями. Сухие корни и листья измельчали, просеивали через сито с диаметром пор 1 мм. К измельченному сырью массой 2 г добавляли 50 мл 70% этилового спирта и нагревали при температуре 100°C в течение 2-х часов. Полученную суспензию центрифугировали при 10 000 g 30 мин. Супернатант упаривали на водяной бане при температуре, не превышающей 50°C, растворяли в 20 мл 50% этилового спирта и использовали для дальнейшей очистки. Экстракты подкисляли добавлением соляной кислоты до pH 1, после чего инкубировали при 25°C в течение 15 часов, затем центрифугировали. Супернатант промывали гексаном (3×20мл), а затем охлаждали до 10°C и добавляли 3%-ный раствор аммиака до pH 8. Далее алкалоиды экстрагировали хлороформом (3×30мл). Хлороформные экстракты промывали водой и выпаривали на водяной бане при температуре 40°C. Полученный сухой остаток растворяли в 1 мл метанола и использовали для анализа.

Тонкослойная хроматография. Качественный анализ состава полученных экстрактов осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). В качестве подвижной фазы использовали систему хлороформ:метанол в различных соотношениях для идентификации отдельных алкалоидов. В качестве стандартов использовали винкамин и аймалицин (Sigma, США). На пластину наносили 2 мкл 2 мМ раствора стандартных соединений. Объем вносимой пробы экстракта составлял 5 мкл.

При УФ облучении пластин фиксировали специфическую бриллиантово-синюю флуоресценцию пятен, соответствующую индивидуальным алкалоидам. Кроме того, хроматографические пластинки обрабатывались церий аммоний сульфатом (ЦАС) и реактивом Драгендорфа, в присутствии которого на пластинках обнаруживались характерные пятна, свидетельствующие о наличии алкалоидов.

Получение стандарта серпентина. Разделение суммы алкалоидов для получения стандарта серпентина из корней катарантуса розового осуществляли методом ТСХ на пластинках Silica gel 60 F_{254} (Merck, Германия). Серпентин идентифицировали по величине R_f , интенсивной флуоресценции при облучении УФ-светом, реакции с реактивом Драгендорфа и характерным отсутствием окрашивания при обработке ЦАС [7]. Элюцию серпентина с ТСХ пластинки проводили с использованием метанола, который затем отделяли от силикагеля центрифугированием и упаривали при температуре 60°C. Полученный сухой остаток индивидуального соединения взвешивали и растворяли в метаноле до концентрации 2мМ.

ВЭЖХ. Идентификацию алкалоидов осуществляли с помощью жидкостного хроматографа высокого давления Agilent 1100, США, оснащенного диодно-матричным детектором. Анализ проводили на колонке с обращенной фазой Nucleodur C18 Isis (4,6x50 мм; 1,8 мкм). В качестве мобильной фазы использовали смесь – 25 мМ ацетат аммония (раствор А) (pH 6,8) и ацетонитрил (раствор В). Градиентную элюцию проводили со скоростью 0,4 мл/мин при температуре 40°C. В процессе хроматографии состав мобильной фазы меняли согласно следующей схеме: 0–20 мин – линейный градиент от 80:20 до 20:80 (соотношение объемов раствора А и В, соответственно); 20–25 мин – изократическая элюция 20:80, промывка колонки; 25–30 мин – изократическая элюция 80:20, уравнивание колонки. Регистрацию проводили при двух длинах волн 220 и 300 нм. Для количественного определения винкамина использовали 2 мМ раствор винкамина гидрохлорида в качестве стандартного образца.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. ВЭЖХ-МС анализ проводили с использованием хроматографа Accela (США) оснащенного диодноматричным и масс-спектрометрическим (LCQ-Fleet) детекторами (Thermo Scientific LCQ-Fleet, США). Условия разделения указаны выше. Режим ионизации – химическая ионизация при атмосферном давлении со следующими параметрами источника ионизации: напряжение на конусе – 22 V,

скорость потока осушающего газа (азот), 30 A.U.; скорость потока вспомогательного газа (азот), 5 A.U.; сила тока и напряжение при разряде, 5 нА и 4,2 В; температура капилляра – 272°C; напряжение на капилляре – 22 В; температура десольвации – 350°C; диапазон сканирования, 50–1500 Да.

Результаты и обсуждение

При оптимизации условий разделения винкамина в тонком слое, было показано, что наиболее приемлемой системой разделения была следующая – хлороформ:метанол в соотношении 90:10 (система разделения № 1) (рисунок 1). Было показано, что R_f винкамина при указанных условиях разделения составляет величину 0,5.

При использовании метода ВЭЖХ было установлено, что содержание винкамина в *Vinca minor* варьирует в пределах от 1,12 – 1,83 мг/г сухой ткани в зависимости от органа растения (рисунок 2). Согласно результатам наших исследований в листьях обнаруживается наибольшее количество данного алкалоида (рисунок 1, 2), что приблизительно на 40% больше, чем в корневой системе. В абсолютных величинах содержание винкамина в листьях составляло $1,83 \pm 0,23$ мг/г сухой ткани, в то время как в корневой системе – $1,12 \pm 0,21$ мг/г сухой ткани. Полученные данные согласуются по порядку величины с результатами, полученными другими исследователями. Например, содержание винкамина в листьях барвинка малого, по различным оценкам, составляет: 0,2 мг/г сухой ткани [8], 0,8 мг/г сухой ткани [9], 1,3 мг/г сухой ткани [10], 2 мг/г сухой ткани [11]. В то время как в корне его содержание составляет – 0,48 мг/г сухой ткани [10].

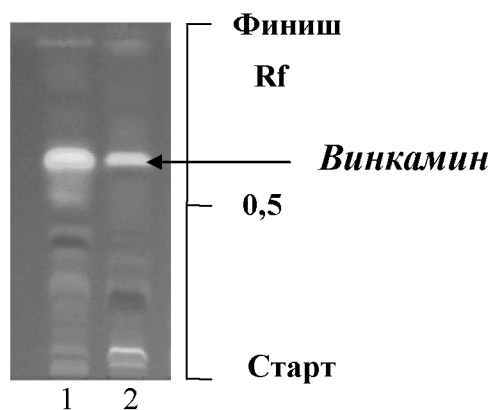


Рисунок 1 – Хроматограмма очищенных экстрактов листьев (1) и корней (2) *Vinca minor* (система разделения алкалоидов № 1)

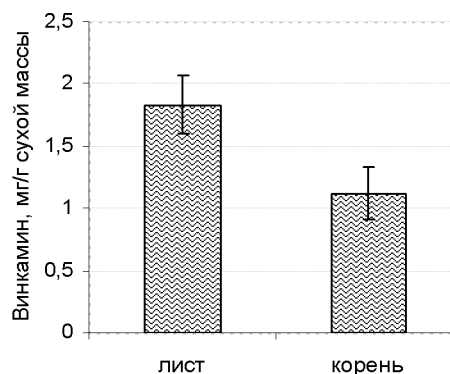


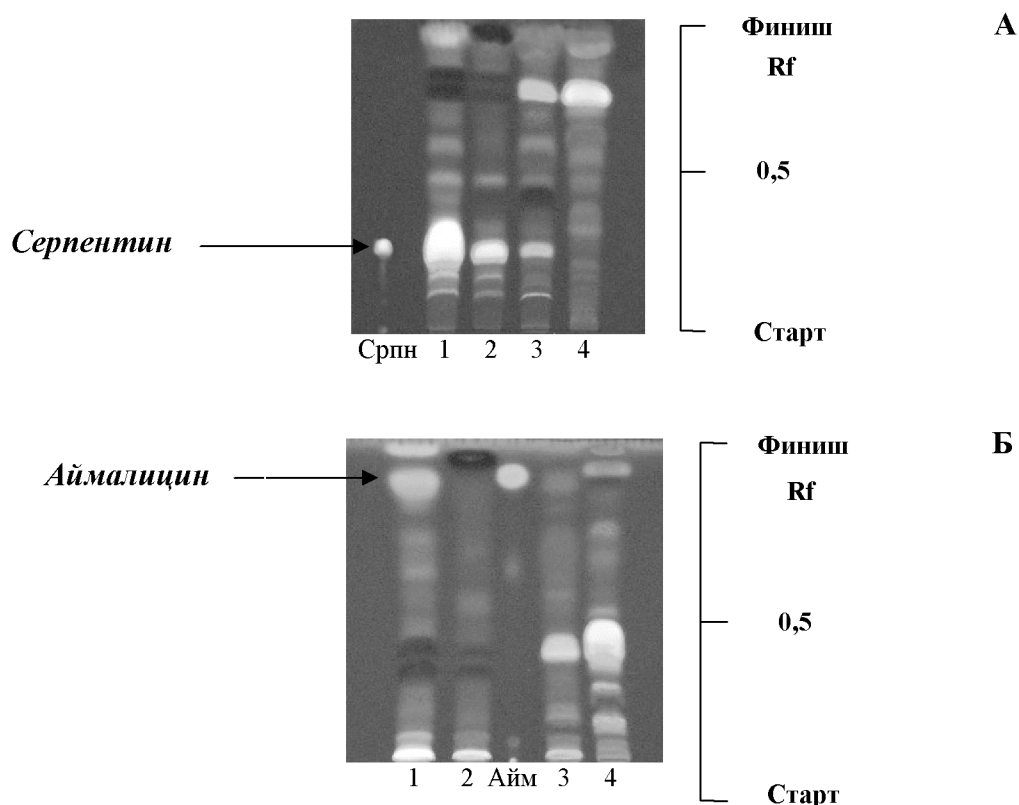
Рисунок 2 – Содержание винкамина в различных органах *Vinca minor*

Содержание винкамина может зависеть не только от его органной локализации, но и от возраста листьев. Нами показано, что в ювенильных листьях содержание винкамина составляет 1,83 мг/г сухой ткани, в то время как в зрелых листьях – 1,62 мг/г сухой ткани. Интересно отметить, что, по данным отдельных авторов, в ювенильных листьях *Catharanthus roseus* содержание виндолина и катарантина было существенно выше, чем в зрелых [12]. Однако накопление вторичных метаболитов не всегда связано с возрастом органа растения, в котором они содержатся [13]. Так, содержание фармакологически ценного индольного алкалоида брахицерина в растении *Psychotria brachyceras* одинаково (0,1–0,2%) во всех надземных вегетативных органах (зеленые стебли, ювенильные и зрелые листья). Изменение количества алкалоидов в процессе онтогенеза может быть обусловлено целым рядом причин, которые включают как генетические, так и экологические факторы, которые сложно отделить друг от друга, учитывая недостаточно изученную физиологическую роль алкалоидов в растительном организме.

Кроме терпеновых алкалоидов индольного ряда, обладающих антигипертензивной и антиаритмической активностью, обнаруженных в растении *Vinca minor*, хорошо известными являются такие алкалоиды как аймалицин и серпентин, обнаруженные, преимущественно, в корнях растений таких родов, как *Catharanthus* и *Rauwolfia*, принадлежащих к семейству *Аросупасеае*. В барвинке малом данные соединения до настоящего времени обнаружены не были. Серпентин и аймалицин обладают гипотензивной, антиаритмической и седативной активностью. Кроме того, последние исследования показали возможность применения серпентина при лечении болезни Альцгеймера и (или) миостении [15].

При хроматографическом разделении алкалоидов барвинка малого методом ТСХ и определении винкамина было обнаружено, что в экстракте корней присутствует вещество, Rf которого совпадает с Rf серпентина, выделенного из корней и листьев растения *Catharanthus roseus*. Кроме того, было установлено, что в экстракте корня барвинка малого также обнаруживается соединение, Rf которого совпадает со значением Rf аймалицина, выделенного из корней катарантуса розового. Вышеуказанные алкалоиды выявлены преимущественно только в корнях растений катарантуса розового и раувольфии змеевидной [14].

Далее были проведены оптимизация условий разделения вышеуказанных метаболитов и сравнительный анализ их содержания в корнях растений *Catharanthus roseus* и *Vinca minor* методом ТСХ. При оптимизации условий разделения в тонком слое серпентин- и аймалицин-подобных соединений использовали хлороформ и метанол. Наиболее приемлемые результаты были получены при использовании указанных растворителей в следующих соотношениях: 80:20 для идентификации серпентина (система разделения № 2), 95:0,5 для идентификации аймалицина (система разделения № 3).



1 – экстракт корня *Catharanthus roseus*; 2 – экстракт листа *Catharanthus roseus*; 3 – экстракт корня *Vinca minor*; 4 – экстракт листа *Vinca minor*; Српн – серпентин; Айм – аймалицин

Рисунок 3 – Хроматограммы очищенных экстрактов (А – система разделения алкалоидов № 2; Б – система разделения алкалоидов № 3)

На рисунке 3А представлены хроматограммы экстрактов корней и листьев катарантуса розового и барвинка малого, полученные при использовании системы разделения № 2. Как видно на рисунке, в экстрактах корней и листьев *Catharanthus roseus*, а также корня *Vinca minor* присутствуют соединения, отличающиеся сходной величиной R_f (0,28) (R_f стандарта серпентина = 0,28), интенсивной флуоресценцией при возбуждении УФ светом, характерным отсутствием окрашивания при обработке ЦАС. Указанные соединения способны также взаимодействовать с реактивом Драгендорфа, о чем свидетельствует характерное оранжевое окрашивание пятен на пластинах. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии в экстракте корня барвинка малого серпентин-подобного соединения.

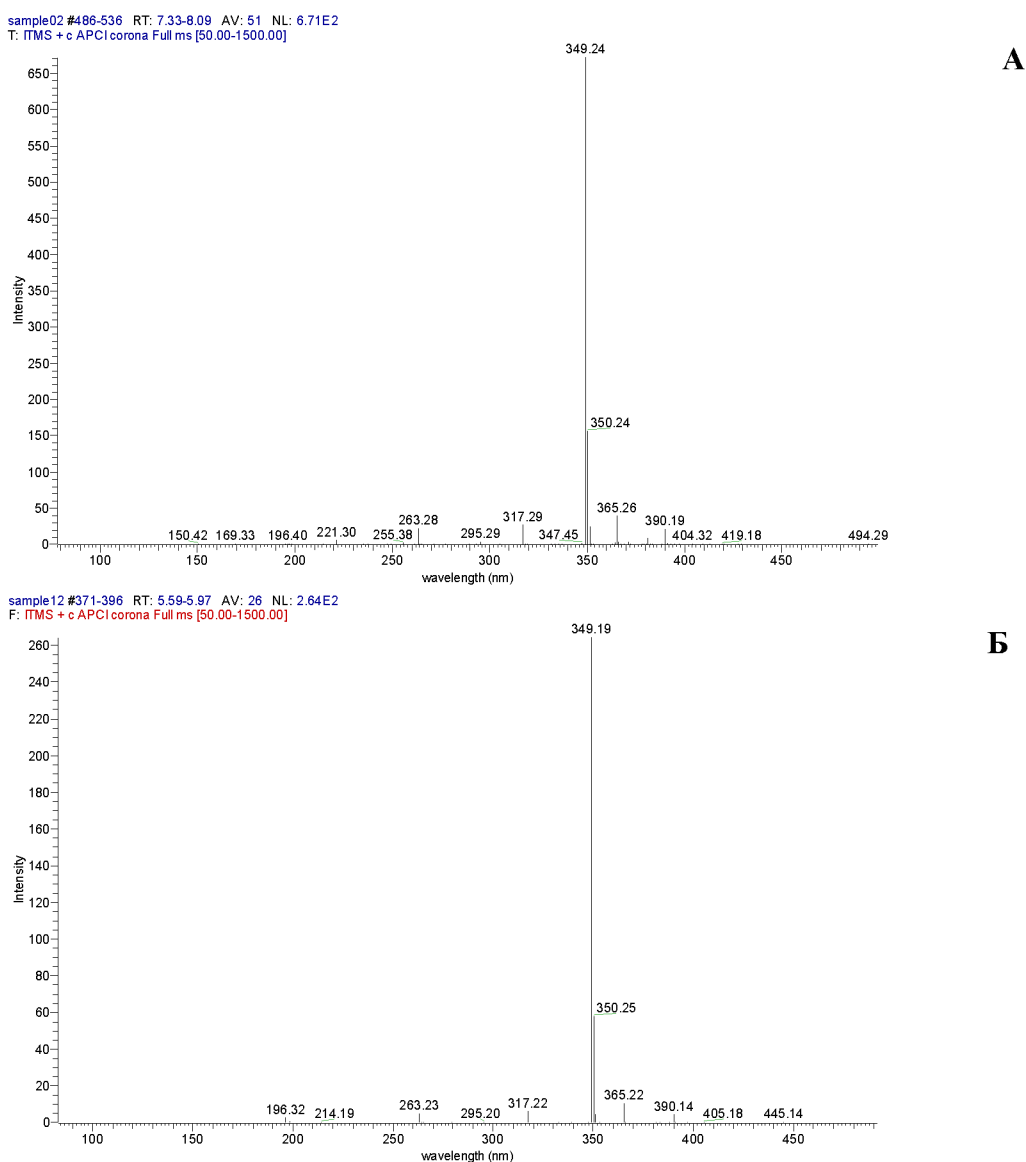
На рисунке 3Б представлены хроматограммы, полученные при разделении алкалоидов экстрактов корней и листьев катарантуса розового и барвинка малого в тонком слое, при использовании системы разделения № 3. Как видно на рисунке, в экстрактах корней обоих растений, присутствуют соединения, характеризующиеся сходной величиной R_f (0,86) (R_f стандарта аймалицина = 0,86), флуоресценцией при возбуждении УФ светом, а также специфическим яблочно-зеленым окрашиванием при обработке ЦАС [7] и наличием специфического окрашивания при взаимодействии с реактивом Драгендорфа. Однако нужно отметить, что в растении *Vinca minor* данное соединение присутствует в значительно меньшем количестве, чем в *Catharanthus roseus*.

Несмотря на то, что данные тонкослойной хроматографии позволяют сделать вполне обоснованные выводы о возможном присутствии серпентин-подобного и аймалицин-подобного соединений в составе очищенного экстракта корней барвинка малого, более точную характеристику химической природы исследуемых веществ можно получить при использовании метода масс-спектрометрии.

В результате масс-спектрометрического анализа серпентина, аймалицина, серпентин- и аймалицин- подобных соединений было установлено, что вещество, имеющее $R_f=0,28$ (серпентин- подобное соединение) из очищенного экстракта корней *Vinca minor*, в своем масс-спектре имеет несколько ионов с массовыми числами 349,19 m/z (100%), 350,25 m/z (21%), 365,22 m/z (6%) и 317,22 m/z (2%), совпадающих по значению с ионами в масс-спектре серпентина, выделенного из корней *Catharanthus roseus* (349,24 m/z (100%), 350,24 m/z (23%), 365,26 m/z (6%) и 317,29 m/z (4%)) (рисунок 4А, Б). Наиболее интенсивный пик в масс-спектрах данных соединений соответствует иону с массовым числом 349 m/z. Это значение совпадает с данными о молекулярной массе серпентина, составляющей 349,40 а.е.м. Таким образом, на основании данных масс-спектрометрического анализа, можно сделать вывод о наличии идентичного серпентину соединения в корнях *Vinca minor*.

При сравнительном анализе масс-спектра аймалицина и аймалицин-подобного соединения было установлено, что наиболее интенсивный ион в масс-спектре стандартного образца аймалицина детектируется при 353,36 m/z (100%) (рисунок 5А). В свою очередь, основной ион, обнаруживаемый в масс-спектре аймалицин-подобного соединения, выделенного из очищенного экстракта корней барвинка малого, также детектируется при 353,26 m/z (100%) (рисунок 5Б). Учитывая данные о молекулярной массе аймалицина, составляющей 352,42 а.е.м., можно предположить, что ион, детектируемый при 353,26 m/z, является молекулярным ионом аймалицин-подобного соединения. Кроме указанных характерных ионов в масс-спектрах стандарта аймалицина и аймалицин-подобного соединения, выделенного из корней барвинка малого также обнаруживались осколочные ионы. Так, в масс-спектре стандарта аймалицина детектировались следующие ионы: 355,07 m/z (4%), 351,91 m/z (3%), 321,19 m/z (1%), 271,52 m/z (1%), 221,76 m/z (1%) и другие. В то время как в масс-спектре аймалицин-подобного соединения были обнаружены следующие ионы: 354,26 m/z (21%), 351,40 m/z (10%), 349,48 m/z (1%), 242,29 m/z (8%), 124,36 m/z (4%) и прочие. На основании приведенных данных можно с большой долей вероятности утверждать, что в корнях *Vinca minor* присутствует идентичное аймалицину соединение.

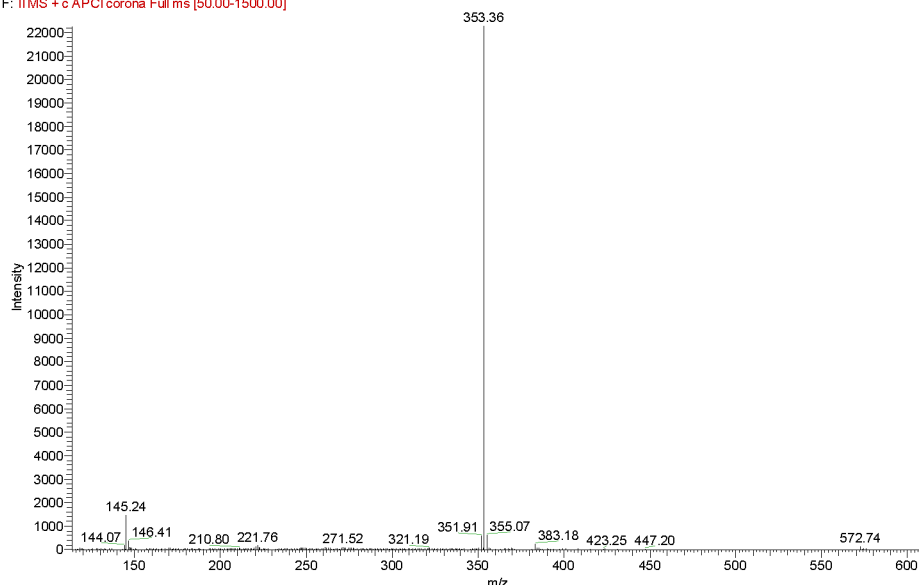
Таким образом, в растении барвинка малого, вероятно, функционирует одна из биосинтетических ветвей алкалоидов индольного ряда, характерная для растения катарантуса розового, а также раувольфии змеевидной, и ведущая к образованию серпентина, синтезирующегося из аймалицина. Поскольку данные метаболиты синтезируются путем последовательного превращения следующих соединений: триптамин + секологанин → стриктозин → 4,21-дегидрогейсоизин → катенамин → аймалицин → серпентин [14], можно также предположить наличие в составе алкалоидов индольного ряда растения *Vinca minor* указанных предшественников аймалицина и серпентина. Учитывая вышесказанное, можно заключить, что присутствие серпентин- и аймалицин-подобных соединений в комплексе с другими гипотензивными и антиаритмическими метаболитами (винкамин, резерпин) может обуславливать специфическое фармакологическое действие экстрактов корней *Vinca minor*.



А – образец, выделенный из корней *Catharanthus roseus*, Б – образец, выделенный из корней *Vinca minor*

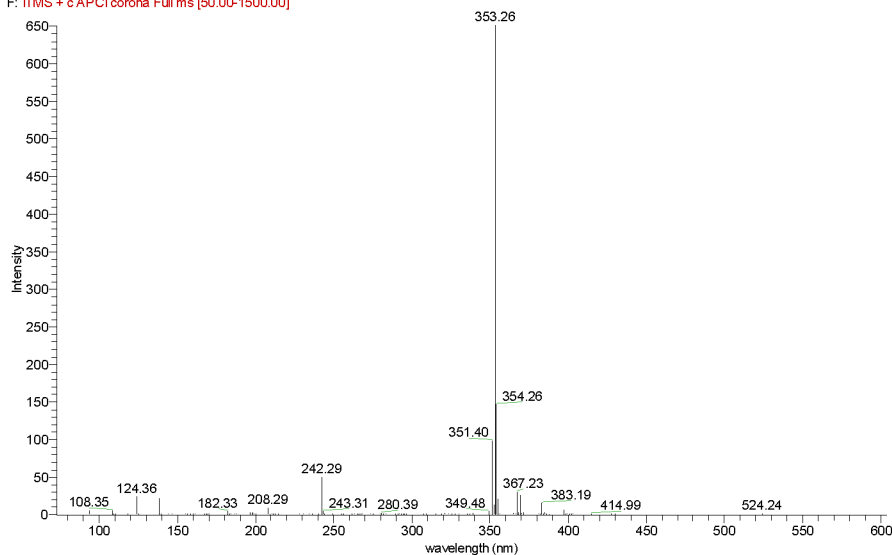
Рисунок 4 – Масс-спектр серпентина

sample05_110728195622#290-378 RT: 4.13-5.26 AV: 89 NL: 2.23E4
F: ITMS + c APCI corona Full ms [50.00-1500.00]



А

sample11 #446-482 RT: 6.73-7.27 AV: 37 NL: 6.51E2
F: ITMS + c APCI corona Full ms [50.00-1500.00]



Б

А – стандартный образец, Б – образец, выделенный из корней *Vinca minor*

Рисунок 5 – Масс-спектр аймалицина

Коллектив авторов выражает глубокую признательность зав. кафедры биохимии биологического факультета БГУ – Семаку И.В. и зав. НИЛ прикладных проблем биохимии – Курченко В.П. за помощь в содействии при постановке экспериментов.

Список литературы

1. Isolation of an alkaloid from *Vinca minor* / S. Scheindlin [et al.] // Jour. Amer. Pharm. Assoc. Sci. – 1955. – Vol. 44. – P. 330–332.
2. Trials of isolating alkaloids from the domestic species *Vinca minor* L. / K. Kostka [et al.] // Dissertationes Pharm. – 1961. – Vol. 13. – P. 37–48.
3. The structure of vincamine and vincinine (*Vinca minor*) / J. Holubek [et al.] // Tetrahedron Lett. – 1963. – Vol. 14. – P. 897–900.
4. Quantitative determination with inst paper chromatography of some alkaloids of periwinkle *Vinca minor* inst spectrophotometry / Z. Bela [et al.] // Herba Hungarica. – 1967. – Vol. 6. – P. 209–220.
5. Strictosidine isovincoside the key intermediate in the biosynthesis of mono terpenoid indole alkaloids / J. Stockigt [et al.] // Journal of the chemical society chemical communications. – 1977. – Vol. 20. – P. 646–648.

6. Uniyal, G.C. Symmetry C₁₈ column: a better choice for the analysis of indole alkaloids of *Catharanthus roseus* / G.C. Uniyal // *Phytochemical Analysis*. – 2001. – Vol. 12. – P. 206–210.
7. Effect of differentiation on the regulation of indole alkaloid production in *Catharanthus roseus* hairy roots / O.A. Moreno-Valenzuela [et al.] // *Plant Cell Reports*. – 1998. – Vol. 18. – P. 99–104.
8. Isolation of vincamine from *Vinca minor* / Sh.Sh. Karabaev [et al.] // *Chemistry of natural compounds*. – 1972. – Vol. 8 (5). – P. 674.
9. Extraction of vincamine from Periwinkle (*Vinca minor* L.): obtaining of total extract / L. Boyadzhiev [et al.] // *Comptes rendus de L'Academie bulgare des Sciences*. – 2002. – Vol. 55 (12). – P. 49–52.
10. High performance liquid chromatographic determination of alkaloids from *Vinca minor* / B. Proksa [et al.] // *Phytochemical Analysis*. – 1991. – Vol. 2. – P. 74–76.
11. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca minor* / N. Tanaka [et al.] // *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. – 1995. – Vol. 41. – P. 61–64.
12. *Vinca* drug components accumulate exclusively in leaf exudates of Madagascar periwinkle / J. Roepke [et al.] // *PNAS*. – 2010. – Vol. 107 (3). – P. 15287–15292.
13. Environmental and ontogenetic control of accumulation of brachycerine, a bioactive indole alkaloid from *Psychotria brachyceras* / T.S. Gregianini [et al.] // *Journal of chemical ecology*. – 2004. – Vol. 30 (10). – P. 2023–2030.
14. Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission / D.M. Pereira [et al.] // *Phytomedicine*. – 2010. – Vol. 8. – P. 646–652.
15. *Catharanthus* terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation / M. El-Sayed [et al.] // *Phytochemistry Reviews*. – 2007. – Vol. 6. – P. 277–305.

**CHARACTERISTICS OF VINCAMINE CONTENT
AND IDENTIFICATION OF MONOTERPENE INDOLE ALKALOIDS
IN *VINCA MINOR***

S.N. Romashko, E.M. Cherviakovsky, A.V. Yantsevich*, O.V. Molchan, V.M. Yurin

Belarusian State University, Minsk, Belarus

**Institute of bioorganic chemistry of NAS of Belarus, Minsk, Belarus*

Optimisation of techniques for separation and identification of pharmacologically important indole alkaloids extracted from dry roots and leaves of *Vinca minor* is described. Chemical nature of *V. minor* monoterpene indole alkaloids and vincamine content have been determined and analysed in different plant organs.