Оригинальная статья

Количественный анализ тритерпенового лупеола и противовоспалительный потенциал экстрактов традиционных болеутоляющих лекарственных растений *Derris scandens*, *Albizia procera* и *Diospyros rhodocalyx*

Патхом Сомвонг,
Ораван Теанпхонг[1]

Кафедры фармацевтической химии и [1]фармакогнозии, Фармацевтический колледж, Университет Рангсит, Патхум Тани, Таиланд

J. Adv. Pharm. Technol. Res.

Аннотация

Derris scandens, Albizia procera и *Diospyros rhodocalyx* традиционно используются в Таиланде в качестве растительных средств для облегчения боли. Этанольные экстракты этих растений, полученные методом экстракции Сокслета, были проанализированы с помощью разработанного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодно-маршрутным детектированием. В качестве химического маркера для данного исследования был выбран лупеол, противовоспалительный тритерпен. Все экстракты вместе с этим соединением были дополнительно оценены на предмет их противовоспалительной активности с помощью анализа ингибирования 5-липоксигеназы. Количественное содержание лупеола в каждом экстракте составляло 21,44 ± 0,89-40,72 ± 0,40 мг на 100 г сырого препарата, а ингибирующая активность фермента всех протестированных экстрактов, представленная в виде полумаксимальной ингибирующей концентрации, колебалась между 63,71± 2,09 и 91,09± 1,40 мкг/мл. Данное исследование показывает, что разработанный аналитический метод эффективен для анализа тритерпенового лупеола в этих растениях, а также выявляет связь между содержанием лупеола и противовоспалительным эффектом.

Ключевые слова: *Albizia procera*, противовоспалительная активность, *Derris scandens*, *Diospyros rhodocalyx*, лупеол

ВВЕДЕНИЕ

Derris scandens (DS) (Roxb.) Benth. произрастает по всей Азии. В Таиланде он традиционно используется для лечения боли.[1]Фитохимические исследования растения показали, что его стебли содержат различные биологически активные соединения, такие как среди которых флавоноиды и терпеноиды.[2]Среди этих соединений изофлавон генистеин проявляет противовоспалительную активность.[3]Это соединение было включено в качестве маркера для химического анализа экстракта ДС в Тайскую травяную фармакопею с 2017 года.[4]Хотя было подтверждено, что генистеин обладает фармакологическими эффектами, которые способствуют традиционному использованию в качестве болеутоляющего средства, другие химические компоненты, которые могут быть выделены из стеблей ДС, также представляют интерес для исследователей, изучающих их соответствующие биоактивные свойства. Среди интересных активных принципов лупеол, пентациклический тритерпен, был исследован на предмет его потенциального использования в качестве альтернативного химического маркера при оценке качества растений. Лупеол содержится в

Адрес для переписки:

Доктор Патхом Сомвонг,
Кафедра фармацевтической химии, Фармацевтический колледж, Университет Рангсит, 52/347, Phaholyothin Road, Lak-Hok, Muang, Pathum Thani 12000, Таиланд.
E-mailpathom.s@rsu.ac.th

Отправлено: 05-Jan-2021 **Пересмотрено:** 08-Феб-2021
Принято: 24-февраля 2021 г. **Опубликовано**: 27 апреля-2021 г.

Доступ к этой статье онлайн	
Код быстрого реагирования:	**Веб-сайт:** www.japtr.org
	DOI: 10.4103/japtr.JAPTR_13_21

Это журнал с открытым доступом, и статьи распространяются на условиях лицензии Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 License, которая позволяет другим лицам переделывать, изменять и развивать работу на некоммерческой основе, при условии, что будут указаны соответствующие ссылки и новые творения будут лицензированы на идентичных условиях.

Для получения перепечатки свяжитесь с намиWKHLRPMedknow_reprints@wolterskluwer.com

Как цитировать эту статью: Somwong P, Theanphong O. Количественный анализ тритерпенового лупеола и противовоспалительный потенциал экстрактов традиционных болеутоляющих лекарственных растений *Derris scandens*, *Albizia procera* и *Diospyros rhodocalyx*. J Adv Pharm Technol Res 2021;12:147-51.

На этом фоне лупеол был предложен для изучения в настоящем исследовании, чтобы установить количественный анализ лупеола в материалах DS. Кроме того, в данном исследовании были изучены два других лекарственных растения, включая *Albizia procera* (AP) (Roxb.) Benth. и *Diospyros rhodocalyx* (DR) Kurz., которые традиционно используются в Таиланде в качестве важных ингредиентов в нескольких травяных рецептах для облегчения боли.[7,8]Согласно предыдущим сообщениям о противовоспалительной активности этих растений,[7-9]мы предположили, что активные экстракты этих растений могут содержать лупеол как один из их химических компонентов. Таким образом, для изучения содержания лупеола в этих растениях был проведен химический анализ с использованием экстракции Сокслета и высокоэффективной жидкостной хроматографии с детектированием на диодной решетке (HPLC-DAD). Кроме того, был проведен анализ ингибирования фермента 5-липоксигеназы (LOX) для оценки противовоспалительного действия растительных экстрактов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические вещества и

Стебли DS и коры AP и DR были приобретены в традиционной тайской аптеке в июле 2020 года. Они были проверены на подлинность путем сравнения с подлинными растительными материалами, хранящимися на кафедре фармакогнозии фармацевтического Университета Рангсит, Таиланд. Проверка подлинности этих сырых препаратов проводилась с использованием методов, подробно описанных в Тайской травяной фармакопее. [4]Подлинные образцы были закодированы как RSU 0089, RSU 0092 и RSU 0093, соответственно. Лупеол (чистота 99 %) был предоставлен компанией Nanjing Spring and Autumn Biological Engineering Co. Все аналитические реагенты были предоставлены Honeywell Burdick и Jackson® . Все одноразовые принадлежности, используемые для прибора ВЭЖХ, были приобретены у S. N. P. Scientific Co., Ltd.

Приготовление растворов образцов

DS, AP и DR измельчали в порошок и смешивали по отдельности. Каждый образец был точно взвешен (5,0 г) в наперстке аппарата Сокслета. Экстракцию проводили в 300 мл этанола в течение 3 ч. Кроме того, порошки этих растений были разделены на порции и смешаны в равных пропорциях для создания комбинированной формулы. Эту смесь взвешивали (15,0 г) и экстрагировали таким же образом, как и каждый неочищенный препарат. Этанольный экстракт выпаривали досуха в роторном испарителе. Концентрированный экстракт каждого образца восстанавливали небольшим количеством этанола, далее разбавляли тем же растворителем и последовательно доводили до получения раствора образца в 10 мл объемной колбе.

Приготовление стандартных растворов

Лупеол (25 мг) растворяли в метаноле и помещали в 50-литровую колбу для получения исходного стандартного раствора объемом 500 мкг/мл. Основной стандартный раствор Последовательно разбавляли метанолом для получения рабочих стандартных растворов с концентрацией 10, 20, 50, 100, 200 и 400 мкг/мл.

Аппаратура и условия хроматографирования

Хроматографический метод проводили на приборе ВЭЖХ (1260 Infinity Series, Agilent Technologies), оснащенном детектором на фотодиодной матрице (DAD). Приборы работали с использованием программного обеспечения OpenLab ChemStation. Перед анализом пробы и рабочие стандартные растворы фильтровали через нейлоновую мембрану 0,45 мкм. Каждый отфильтрованный образец (20 мкл) вводили в систему ВЭЖХ и разделяли на колонке Accucore™ XL C18 (250 мм × 4,6 мм и. д., 4 мкм) с помощью изократического элюирования подвижной фазой, состоящей из метанола и ацетонитрила в соотношении 90:10. Скорость потока подвижной фазы была установлена на 1,0 мл/мин, а в камере колонки прибора ВЭЖХ поддерживалась комнатная температура. Хроматограмму анализируемых образцов регистрировали методом DAD, а для получения данных по поглощению соединения лупеола выбирали длину волны 210 нм. Общее время анализа каждого образца на ВЭЖХ-системе составляло 12 мин.

Валидация метода

Точность и прецизионность разработанного аналитического метода были исследованы с помощью стандартной методики с добавлением известного количества лупеола (80%-120% масс.) к экстрагированным образцам смеси в трех экземплярах. Результаты рассчитывали в виде процента восстановления и относительного стандартного отклонения. Анализы проводились для изучения внутридневной и междневной прецизионности. Устойчивость аналитического метода оценивалась путем изменения пропорций подвижной фазы. Линейность, наименьшая концентрация количественного определения и наименьшая концентрация обнаружения также были исследованы в соответствии с рекомендациями, изложенными в предыдущем отчете.[10]

Количественное определение лупеола в экстрактах

Количество лупеола рассчитывали по уравнению линейной регрессии калибровочной кривой рабочих стандартных растворов. Содержание лупеола в каждом образце исследовали в трех экземплярах и представляли в виде миллиграммов на 100 г сырого препарата. Содержание приводилось вместе со значениями SD. Различия в содержании лупеола между группами образцов изучали с помощью одностороннего дисперсионного анализа (ANOVA) с *пост-хок* тестом множественных сравнений Тьюки (PSPP, GNU Project), и для статистической значимости всех тестируемых групп определяли значение $P < 0,05$.

Анализ ингибирования 5-липоксигеназы

Для оценки противовоспалительной активности растительных экстрактов, включая DS, AP, DR и смесь, был проведен тест на ингибирование 5-LOX. Лупеол, маркер количественного анализа, также был подвергнут испытанию.

Анализ проводили спектрофотометрическим методом, как описано в литературе.[11]Один миллилитр
0,1 М фосфатный буфер pH 9,0, содержащий 10 мкл фермента 5-LOX (7,9 Ед/мл) и 20 мкл серии разведений исследуемых образцов (5-300 мкг/мл), растворяли в метаноле и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Для определения активности фермента добавляли 25 микролитров 62,5 мкМ линолеата натрия. Кинетику реакции наблюдали при длине волны 234 нм с помощью микропланшетного ридера (BioTek Synergy HT). Ранние скорости реакции определяли по наклону сильной части кривой, а ингибирование активности фермента рассчитывали по результатам трех независимых экспериментов в сравнении с контролем (метанол). Результаты анализа ингибирования 5-LOX для всех исследуемых образцов были выражены
в виде значений полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}). Интенсивность ингибирования фермента испытуемыми экстрактами и лупеолом сравнивали с индометацином, нестероидным препаратом.
противовоспалительный препарат, который использовался в качестве положительного контроля. Статистическая значимость значений IC_{50}между исследуемыми образцами учитывалась при значении $P < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация метода

Все протестированные параметры валидации показали приемлемые значения, как представлено в таблице 1. Кроме того, не было обнаружено соединений, мешающих сигналу лупеола на хроматограммах экстрагированных образцов в области пика лупеола при времени удерживания 9,3 мин, как показано на рис. 1. Таким образом, метод был уточнен и эффективен для определения лупеола в этих растительных экстрактах.

Содержание лупеола в различных растительных экстрактах

Среди различных растений наибольшим выходом лупеола обладал DR (40,72± 0,40 мг/100 г), в то время как AP содержал наименьшее количество лупеола (21,44 ± 0,89 мг/100 г). Соединение лупеол было обнаружено во всех образцах растений, и его содержание было количественно определено с помощью разработанного метода ВЭЖХ-ДАД, как показано в таблице 2. В нашем исследовании наблюдалась значительная разница в содержании лупеола в экстрактах трех лекарственных растений. Односторонний ANOVA показал, что DS, AP, DR и смесь экстрактов имели значительные различия по содержанию лупеола ($P< 0,05$, $F= 151,77$, df = 3, 8). *Пост-хок* тест Тьюки также отметил, что количество лупеола среди исследуемых образцов особенно отличалось, за исключением содержания между ДС и смесью, которые не показали существенной разницы в содержании этого соединения между собой ($P = 0,885$), как показано на рисунке 2. Выход лупеола в ДС (32,79± 0,91 мг/100 г) и смеси (32,13 ± 1,78 мг/100 г) наблюдался равномерно из-за того, что количественное содержание лупеола в ДС было близко к идеальному медианному значению лупеола в трех испытуемых растениях (31,65 мг/100 г). Наблюдаемый выход лупеола в смеси, вероятно, соответствовал теоретическому выходу, который мог быть рассчитан на основе среднего содержания лупеола в каждого растения. Это свидетельствовало о том, что лупеол может быть использован в качестве практического активного маркера для смесей, в состав которых входят эти лекарственные растения. Кроме того, наши результаты указывают на то, что лупеол содержится в растениях в достаточном количестве и может быть подходящим маркером для химического анализа сырых лекарственных средств и сопутствующих материалов. Что касается опубликованного аналитического метода определения активного принципа в ДС и связанных с ним травяных формулах, то в предыдущем отчете в качестве одного из химических маркеров для обоснования растительного сырья использовался изофлавон генистеин. [12]Сравнивая сигнал активного маркера на хроматограммах ВЭЖХ в литературе с пиком тритерпена лупеола хроматограммах данного исследования, можно отметить, что лупеол, определенный разработанным нами методом с использованием изократической системы, был более узнаваем.

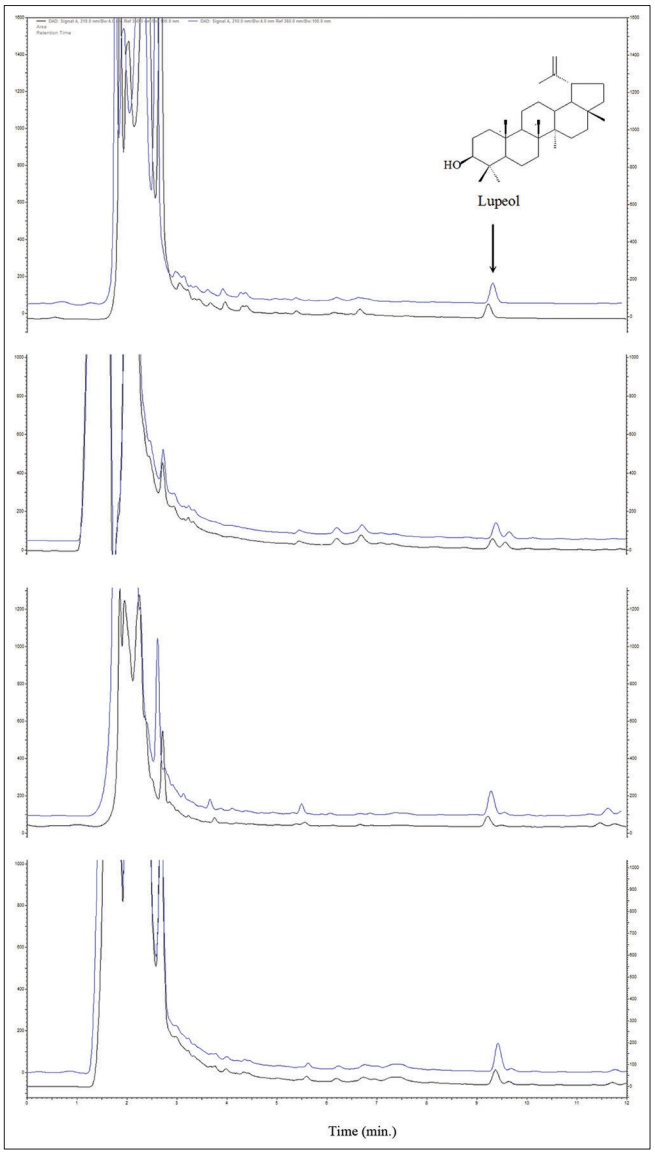

Рисунок 1. Наложение хроматограмм, показывающих пик лупеола в стандартном образце (верхняя линия) и пустом образце (нижняя линия) из различных экстрактов: *Derris scandens* (a), *Albizia procera* (b), *Diospyros rhodocalyx* (c), и смеси (d).

Таблица 1: Валидационные данные для анализа лупеола с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии

Параметры	Результаты
Линейный диапазон, мкг/мл	10-400
Коэффициент корреляции, r^2	0,9998
Прецизионность, % RSD	
Внутридневной (*n=9*)	0.64-1.21
Межсуточный (*n=9*)	0.79-1.44
Точность, % восстановления±SD	
Внутридневные (*n=3*)	
80 % уровень	96.43±1.02
100% уровень	97.00±0.62
120% уровень	92.45±0.89
Межсуточный (*n=3*)	
80 % уровень	94.77±1.33
100% уровень	95.43±1.38
120% уровень	91.86±0.73
Предел обнаружения, (мкг/мл)	1.50
Предел количественного определения, (мкг/мл)	5.00
Надежность, % RSD (метанол:ацетонитрил)	
89:11	1.07
90:10	0.37
91:9	0.18

RSD: Относительное стандартное отклонение, SD: Стандартное отклонение

Таблица 2: Содержание лупеола и противовоспалительная активность экстрактов

Образец	Содержание (мг/100 г)	$IC_{(50)}$ (мкг/мл)
DS	32.79±0.91	73.41±1.10
AP	21.44±0.89	91.09±1.40
ДР	40.72±0.40	71.06±1.95
Смесь	32.13±1.78	63.71±2.09
Лупеол	-	69.26±1.39
Индометацин	-	62.21±1.07

Среднее±SD, *n=3*. SD: стандартное отклонение, IC_{50}: полумаксимальная ингибирующая концентрация, DS: *Derris scandens*, AP: *Albizia procera*, DR: *Diospyros rhodocalyx*

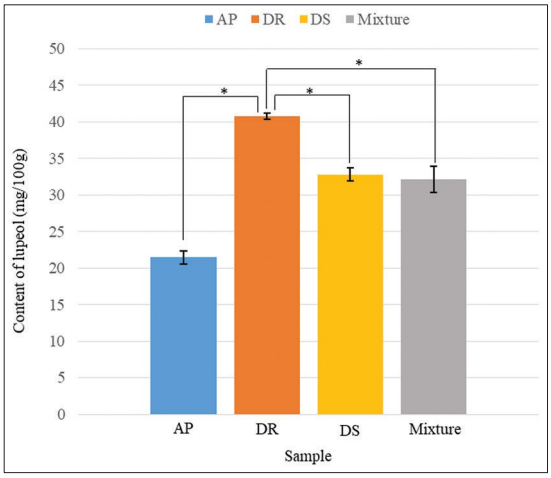

Рисунок 2: Сравнение содержания лупеола в различных экстрактах. Значительные различия: $P < 0.05$ (*)

Таким образом, он может быть эффективно использован в качестве аналитического инструмента для контроля качества материалов DS, AP и DR. Однако вариации содержания лупеола в анализируемых образцах могут быть связаны с различными источниками лекарственных растений. Эти факторы могут влиять на выход активных соединений в растительном сырье. В связи с этим следует продолжить изучение различий в содержании химических маркеров в разных источниках лекарственных растений.

Противовоспалительная активность растительных экстрактов

Экстракты сырых препаратов, включая DS, AP и DR показали ингибирующую активность со значениями IC_{50} 73,41± 1,10, 91,09± 1,40 и 71,06± 1,95 мкг/мл, соответственно, как суммированы в таблице 2. Таким образом, по ингибирующей активности ферментов они располагались в следующем порядке: DR > DS > AP.

DR имел самое высокое содержание лупеола; он также обладал сильным ингибирующим эффектом по сравнению с DS и AP. С другой стороны, самая низкая активность наблюдалась у AP, содержание лупеола в котором было ниже, чем в остальных. Наблюдения показали, что противовоспалительная сила этих экстрактов и содержание в них лупеола имеют взаимосвязь и что наблюдаемая активность прямо пропорциональна содержанию лупеола. При сравнении активности образцов DS, AP и DR со смесью, содержащей DS, AP и DR, равномерно распределенных в формуле, смесь обладала самой сильной ингибирующей фермент активностью с показателем IC_{50} 63,71± 2,09 мкг/мл. Его ингибирующий эффект был также выше, чем у лупеола (69,26 ± 1,39 мкг/мл). Кроме того, статистическая разница в активности между образцом смеси и соединением лупеола была значительно заметна (P< 0,05). Кроме того, ингибирующее действие фермента между смесью и положительным контролем индометацином (62,21± 1,07 мкг/мл) наблюдалось аналогично при P< 0,05. Таким образом, положительная корреляция между содержанием лупеола и противовоспалительным эффектом, продемонстрированным в образцах DS, AP и DR, не была связана с образцом смеси. Несмотря на то, что содержание лупеола в смеси было аналогично содержанию в образце DS и ниже, чем в образце DR, противовоспалительная активность смеси была выше по сравнению с другими образцами и соединением лупеола. Полученные данные позволили предположить, что способность смеси ингибировать ферменты связана другими противовоспалительными веществами, которые могут входить в состав химических компонентов DS, AP и DR. Фитохимические исследования DS и AP показали, что эти растения содержат большое количество биологически активных веществ, таких как генистеин, дайдзеин и флавоноловые гликозиды. [3,8]Эти флавоноиды, как сообщается, соответствуют противовоспалительным свойствам как *в* фармакологических исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*.[3,8,9]Однако другие пентациклические тритерпены, такие как бетулин и бетулиновая кислота, которые были обнаружены в DR, проявляют замечательное свойство противовоспалительного действия.[7,13]Таким образом, эти фитокомпоненты могут быть ответственны за ингибирующий ферментный эффект формулы смеси и объяснить, почему ее противовоспалительное действие

активность была сильнее, чем у лупеола и сопоставимого положительного контроля в этом исследовании. Наше исследование , что данная смесь является наиболее эффективной формулой для противовоспалительного растительного рецепта. Тем не менее, следует рассмотреть и провести исчерпывающее исследование фармакологии и фитохимического анализа других перспективных противовоспалительных средств в составе смеси.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании представлен эффективный аналитический инструмент для количественного определения лупеола в экстрагированных травяных образцах. Такой инструмент может применяться в качестве альтернативного метода анализа химических маркеров при оценке качества этих растительных материалов. Данное исследование является первым отчетом, в котором подтверждено наличие противовоспалительного тритерпена лупеола в DS, AP, DR и формуле смеси. Также был изучен потенциал их экстрактов для проведения дальнейших углубленных исследований противовоспалительных свойств.

Благодарности

Авторы благодарят Научно-исследовательский институт университета Рангсит за предоставление необходимых условий.

Финансовая поддержка и спонсорство

Данное исследование было проведено при финансовой поддержке Научно-исследовательского института Университета Рангсит.

Конфликты интересов

Конфликты интересов отсутствуют.

ССЫЛКИ

1. Puttarak P, Sawangjit R, Chaiyakunapruk N. Эффективность и безопасность *Derris scandens* (Roxb.) Benth. для лечения боли в опорно-двигательном аппарате: Систематический обзор и мета-анализ рандомизированных контролируемых исследований испытания. J Ethnopharmacol 2016;194:316-23.
2. Hussain H, Al-Harrasi A, Krohn K, Kouam SF, Abbas G, Shah A, *et al*. Фитохимическое исследование и антимикробная активность *Derris scandens*. J King Saud Univ Sci 2015;27:375-8.
3. Laupattarakasem P, Houghton PJ, Hoult JR. Противовоспалительные изофлавоноиды из стеблей *Derris scandens*. Planta Med 2004;70:496-501.
4. Департамент медицинских наук, Министерство здравоохранения. Тайская травяная фармакопея 2017. Бангкок: Федерация сельскохозяйственных кооперативов Таиланда, Ltd; 2017.
5. Fernández MA, de las Heras B, Garcia MD, Sáenz MT, Villar A. Новое понимание механизма действия противовоспалительного тритерпена лупеола. J Pharm Pharmacol 2001;53:1533-9.
6. Салим М. Лупеол, новый противовоспалительный и противораковый диетический тритерпен. Cancer Lett 2009;285:109-15.
7. Othong R, Trakulsrichai S, Wananukul W. *Diospyros rhodocalyx* (Tako-Na), тайский народный препарат, ассоциируется с гипокалиемией и генерализованной мышечной слабостью: A case series. Clin Toxicol (Phila) 2017;55:986-90.
8. Srivastava V, Kumar Verma S, Panwar S, Deep P, Verma S. Краткий обзор фитофармакологических данных об *Albizia procera*. Asian J Pharm Pharmacol 2020;6:144-9.
9. Sangeetha M, Chamundeeswari D, Saravana Babu C, Rose C, Gopal V. Ослабление окислительного стресса у крыс с артритом с помощью этанольного экстракта коры *Albizia procera* benth через модуляцию экспрессии воспалительных цитокинов. J Ethnopharmacol 2020;250:112435.
10. Agrawal SS, Yallatikar T, Gurjar P. Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method development and validation for allyl isothiocyanate estimation in phytosomes of *Brassica nigra* extract. J Adv Pharm Technol Res 2019;10:126-31.
11. Ashour ML, El-Readi M, Youns M, Mulyaningsih S, Sporer F, Efferth T, *et al*. Химический состав и биологическая активность эфирного масла, полученного из *Bupleurum marginatum* (Apiaceae). J Pharm Pharmacol 2009;61:1079-87.
12. Ayameang O, Rattarom R, Mekjaruskul C, Caichompoo W. Противовоспалительная активность и количественный анализ основных соединений смесей формулы *Derris scandens* (DZSS). Pharmacogn J 2020;12:828-34.
13. Hordyjewska A, Ostapiuk A, Horecka A, Kurzepa J. Бетулин и бетулиновая кислота: Производные тритерпеноидов с мощным биологическим потенциалом. Phytochem Rev 2019;18:929-51.