

УДК 615.322



ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ЯКОРЦЕВ СТЕЛЮЩИХСЯ

А. Аффф, Ю.Н. Карпенко, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова,
Е.И. Молохова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева

ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2

E-mail: dkg2014@mail.ru

Получено 09.09.2019

Рецензия (1) 04.11.2019

Рецензия (2) 26.12.2019

Принята к печати 28.12.2019

Якорцы стелющиеся, или якорцы наземные – *Tribulus terrestris* L., семейство парнолистниковые – *Zygophyllaceae*, однолетнее травянистое растение, произрастающее в умеренном и тропическом климате, имеет богатый химический состав биологически активных веществ и химических элементов.

Цель работы – фитохимическое исследование якорцев стелющихся, произрастающих в разных географических зонах.

Материалы и методы. Объектами исследования являлись образцы травы якорцев стелющихся, собранные в различных условиях обитания. Образцы сырья были высушены воздушно-теневым способом. Определение сапонинов в сырье проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС). Изучение качественного и количественного состава элементов проводили на рентгенофлуоресцентном спектрометре.

Результаты. Проведено исследование сапонинов методом ВЭЖХ-МС/МС, по результатам которого, во всех исследуемых образцах обнаружены диосцин и протодиосцин, времена удерживания которых совпадают с временами удерживания стандартов диосцина и протодиосцина. Установлено, что в образцах якорцев стелющихся травы среди макроэлементов в наибольшем количестве накапливаются калий и кальций, на их долю приходится около 90% от общего содержания элементов в растении. Выявлено, что распределение макро и микроэлементов в растении существенно различается в зависимости от места и условий произрастания.

Заключение. Максимальное содержание диосцина наблюдали в образцах, заготовленных в Молдове, а минимальное – в образцах из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Наибольшее количество протодиосцина обнаружено в образцах из Крыма, а минимальное – в образцах из Молдовы. Проведенное исследование элементного состава якорцев стелющихся травы показало, что места обитания (географические зоны), в которых осуществлялся сбор исследованных образцов сырья, влияют на накопление элементов растением. С учетом полученных данных составлены ряды биологического поглощения для образцов из каждого места произрастания.

Ключевые слова: якорцы стелющиеся, *Tribulus terrestris*, ВЭЖХ-МС/МС, элементный состав, фитохимия

PHYTOCHEMICAL STUDY OF *TRIBULUS TERRESTRIS* L.

A. Affaf, Yu.N. Karpenko, D.K. Gulyaev, V.D. Belonogova,
E.I. Molokhova, O.L. Blinova, A.A. Gileva

Perm State Pharmaceutical Academy
2, Poleyaya Str., Perm, Russia 614990

E-mail: dkg2014@mail.ru

Received 09 September 2019

Review (1) 04 November 2019

Review (2) 26 December 2019

Accepted: 28 December 2019

Tribulus terrestris L., an annual herb belonging to the *Zygophyllaceae* family and growing in moderate and tropical climates, has a rich chemical composition of biologically active substances and chemical elements.

The aim of the work is a phytochemical study of *Tribulus terrestris* L. growing in different geographical zones.

Для цитирования: А. Аффф, Ю.Н. Карпенко, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, Е.И. Молохова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева. Фитохимическое исследование травы якорцев стелющихся. *Фармация и фармакология*. 2019;7(6):279-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-279-290

© А. Аффф, Ю.Н. Карпенко, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, Е.И. Молохова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева, 2019

For citation: A. Affaf, Yu.N. Karpenko, D.K. Gulyaev, V.D. Belonogova, E.I. Molokhova, O.L. Blinova, A.A. Gileva. Phytochemical study of *Tribulus Terrestris* L. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(6): 279-290. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-279-290

Materials and methods. The objects of study were herb specimens of *Tribulus terrestris* L. collected in different habitats. The samples of the raw materials were shade-dried. The determination of saponins in the raw materials, was carried out by high performance liquid chromatography with a mass spectrometric detection (HPLC-MS / MS). The study of the qualitative and quantitative composition of the elements was carried out on an X-ray fluorescence spectrometer.

Results. The saponins had been studied by HPLC-MS/MS, according to which in all the studied samples, dioscin and protodioscin were found. Their retention times coincided with the retention times of dioscin and protodioscin standards. It has been established that among the macroelements of *Tribulus terrestris* L., potassium and calcium are mostly accumulated. They account for about 90% of the total content of the elements in the plant. It has been revealed that the distribution of macro- and microelements in the plant, varies significantly depending on their place and growing conditions.

Conclusion. The maximum dioscin content was observed in the samples harvested in Moldova, and the minimum – in the samples from the nursery garden of the All-Russian Scientific Research Institute of medicinal and aromatic plants. The largest amount of protodioscin was found out in the samples from the Crimea, and the minimum – in the samples from Moldova. The carried out study of the elements content of *Tribulus terrestris* L. showed that the habitats (geographical zones) in which the studied samples of raw materials had been were collected, affect the accumulation of the elements by the plant. Based on the data obtained, biological absorption series have been compiled for the samples from each habitat.

Keywords: *Tribulus terrestris* L., high performance liquid chromatography with a mass spectrometric detection, HPLC-MS/MS, elements content, phytochemistry

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время большое внимание уделяется комплексным препаратам, содержащим витамины, аминокислоты и микроэлементы. Установлено, что марганец (Mn) и молибден (Mo) потенцируют действие сердечных гликозидов, Mn потенцирует действие аскорбиновой кислоты и каротиноидов, содержащихся в лекарственных растениях. Кроме того, микроэлементы, содержащиеся в растениях, лучше усваиваются организмом человека, так как они находятся в растительном сырье в «биологических» концентрациях [1, 2].

Якорцы стелющиеся (*Tribulus terrestris* L., семейство парнолистниковые – *Zygophyllaceae*) представляет собой однолетнее травянистое растение. Растение имеет стержневую корневую систему с сетью волокнистых боковых корней. Листья парно-перистосложные. Цветки диаметром 1–1,2 см расположены в пазухах листьев. Чашечка состоит из 5 длиннозаостренных, снаружи прижатоволосистых чашелистиков длиной 4–5 мм, шириной 1–1,3 мм [3–5].

Произрастают в умеренном и тропическом климате в Южной Европе, Южной Азии, Африке, северной Австралии. В Российской Федерации якорцы стелющиеся произрастают в европейской части, на Северном Кавказе, в Западной и Восточной Сибири, Крыму. Растут в сухих, песчаных и каменистых степях на глинисто-иловатых, солончаковых, супесчаных почвах, влажных лугах, по долинам рек, как сорное в посевах, у дорог [6]. Сырьевая база обеспечена дикорастущими растениями.

Одной из основных групп биологически активных веществ якорцев стелющихся травы являются стероидные сапонины, представленные диосцином, протодиосцином, трибестином, прототрибестином, метилпрототрибестином, метилпротодиосцином, псевдопротодиосцином, трибулозином и другими соединениями [7–10]. В сырье содержатся флавоноиды, в основном производные кверцетина, астрагалин, 3-рутинозид, 3-генциобиозид кемпферола,

3-генциобиозид изорамнетина, трибулозид, рутин, кемпферол, кверцетин, 3-О-рамнозид кверцетина [7, 11–13].

В корнях, надземной части, плодах, цветках – гекогенин, в корнях, надземной части – неотигогенин, в корнях и цветках – β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин; в надземной части, цветках – рускогенин.

Каротиноиды: в листьях – α -каротин; фенолкарбоновые кислоты: в плодах – феруловая, *p*-гидроксибензойная; алкалоиды: трибулусамид С, трибулусерин, трибулусин, гармин, гарман; другие компоненты включают органические кислоты, аминокислоты; из органических кислот: бензойная, ваниловая, феруловая, янтарная кислоты. Основными аминокислотами являются аланин и треонин, кроме того, содержатся кумарин, эмодин и физион [6, 14–17].

Извлечения из травы якорцев стелющихся обладают гипохолестеринемическим, стимулирующим функцию половых желез, противовоспалительным, гепатопротекторным, антигипертензивным, иммуномодулирующим и антиоксидантным действием, усиливают перистальтику кишечника, обладают свойствами афродизиака [18].

Якорцы стелющиеся широко применяются в народной медицине многих стран [19]. В народной медицине Болгарии используются для лечения импотенции [19]. В народной медицине Ирана – в качестве мочегонного, слабительного, для припарок, при лечении сифилиса [20]. В Непале – при мочеполовых инфекциях [21]. В индийской медицине – при радикулите, воспалении органов малого таза и крестца, сухом кашле и расстройствах дыхания [22]. В традиционной китайской медицине – для лечения глаз, отёков, вздутия живота, патологических болей и сексуальной дисфункции. Якорцы описываются как очень ценное лекарственное средство в Shern-Nong фармакопее [19].

В исследовании, проведённом в Египте в 2015 году в группе мужчин старшей возрастной группы, страдающих возрастным андрогенным дефицитом, применение экстракта якорцев стелющихся показало

статистически значимую разницу в увеличении уровня тестостерона [23]. Исследование в Иране в 2016 году на человеческих сперматозоидах показало улучшение различных параметров мужской спермы [24]. Другое исследование в Бразилии в 2016 году, на 65 мужчинах, показало значительное увеличение её качества [25]. Рандомизированное, двойное, слепое, плацебо-контролируемое исследование подтвердило высокую эффективность применения якорцев стелющихся для лечения сексуальной дисфункции у женщин [26].

В 2016 году ученые из Ирана показали, что этанольный экстракт якорцев эффективно снижал уровень глюкозы, по сравнению с плацебо у женщин больных диабетом 2 типа [27]. Механизм гипогликемического действия, по всей видимости, связан с ингибированием активности α -глюкозидазы в тонком кишечнике [28, 29]. Так же был найден легкий ингибирующий α -амилазу эффект [28].

Стероидные сапонины якорцев обладают противогрибковой активностью в отношении флуконазол-устойчивых грибков рода *Candida* [30]. Другие исследования *in vitro* так же показали, как противогрибковые так и антибактериальные свойства этого растения [31].

Исследования *in vitro* клеток сердца и целых сердец животных, показало, что вещества из якорцев стелющихся обладают защитным эффектом на ткани сердца [32]; а также нейропротекторным действием стероидных сапонинов [33]. На основе стероидных сапонинов фураностанолового типа болгарскими учеными создан препарат Трибестан, обладающий гиполипидемическим и гипохолестеринемическим действием [34].

Из травы якорцев стелющихся грузинскими учеными ранее был получен новогаленовый препарат – Трибуспонин (сумма стероидных сапонинов), снижающий уровень холестерина в крови и увеличивающий лецитин/холестериновый коэффициент [35].

В Российской Федерации зарегистрирован препарат «Трибуспонин», таблетки по 0,1 г, как антисклеротическое средство; экстракт входит в состав комплексных препаратов «Фитовит», «Спеман», «Спеман форте». ЗАО «Эвалар» выпускается БАД «Эффекс трибулус» для лечения эректильной дисфункции и повышения потенции.

Учитывая широкое распространение и применение растения в научной и народной медицине, представляет интерес исследование химического состава образцов сырья якорцев стелющихся, собранных в различных условиях обитания.

ЦЕЛЬ – исследование образцов сырья якорцев стелющихся, заготовленных в разных географических зонах.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Трава якорцев стелющихся, собранная в различ-

ных географических зонах: Сирийская арабская республика, окрестности города Дамаск; Республика Молдова, окрестности города Кишинев; Ботанический сад ВИЛАР; полуостров Крым, вершина горы Кушкая (таблица 1). Образцы были заготовлены в фазу цветения – плодоношения и представляли собой всю надземную часть растения вместе с корнем. Первичная обработка сырья состояла в удалении корня, побуревших частей растения. Сушка – воздушно-теневая, сырьё соответствовало требованиям ВФС №42-827-79 «Herba tribuli terrestris» по показателям «подлинность» и «доброкачественность».

Методика определения сапонинов

Количественное определение сапонинов в траве якорцев стелющихся проводили методом ВЭЖХ-МС/МС с помощью жидкостного тройного квадрупольного хроматомакс-спектрометра LCMS-8050 (Shimadzu) при следующих условиях:

- хроматографическая колонка: Luna 5u C18(2) (2,1×150 mm 3,5-Micron);
- температура термостата колонки: 40°C;
- элюент: 0,1% раствор муравьиной кислоты – ацетонитрил;
- режим элюирования: градиентный;
- скорость потока подвижной фазы: 0,4 мл/мин.

Условия масс-спектрометрического детектирования представлены в табл. 2.

Подготовка образцов

Около 0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 100 мл, добавляли 25 мл метанола (х.ч.). Далее проводили экстракцию содержимого колбы на ультразвуковой бане в течение 30 минут при температуре 30±1°C. 1 мл полученного извлечения переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали в течение 5 минут при 10000 об/мин.

50 мкл супернатанта помещали в вials объемом 2 мл, добавляли 950 мкл метанола и перемешивали. Объем анализируемой пробы составил 5 мкл.

Идентификацию и количественное определение сапонинов в извлечениях из растительного сырья проводили с использованием стандартных образцов диосцина и протодиосцина (Sigma-Aldrich, Германия). Навески стандартных образцов (около 1 мг) растворяли в 1 мл метанола. Полученные растворы использовали для приготовления метанольных растворов с концентрацией 1000 нг/мл каждого из стандартов.

Детектирование образующихся ионов проводили в режиме MRM (мониторинга множественных реакций). Ионные переходы для диосцина составили 869,50→415,00; для протодиосцина 1031,5→415,0 [36].

Определение проводили в трехкратной повторности.

Таблица 1 – Зоны заготовки образцов сырья якорцев стелющихся

№	Место сбора	Дата сбора
1	Сирийская арабская республика, окрестности города Дамаск	Июнь 2018
2	Российская Федерация Республика Крым, бухта Ласпи, вершина горы Кушкая	Июль 2017
3	Республика Молдова, окрестности города Кишинев	Июнь 2017
4	Ботанический сад ФГБНУ «ВИЛАР», г. Москва	Июль 2016

Таблица 2 – Условия масс-спектрометрического анализа

Интерфейс	DUIS (электроспрей + химическая ионизация)
Поток газа-распылителя	3 L/min
Поток нагревающего газа	10 L/min
Поток осушающего газа	10 L/min
Температура интерфейса	300°C
Температура DL	200°C
Температура Heat Block	400°C
Расход газа-осушителя	10 л/мин
Напряжение на капилляре	4000 В
Полярность источника ионизации	Положительная
Энергия соударительной ячейки	30 эВ

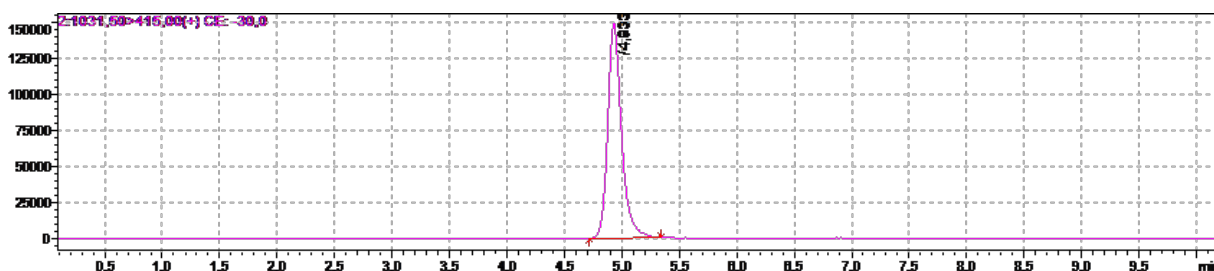


Рисунок 1 – Хроматограмма раствора стандартного образца протодиосцина (концентрация 1333 нг/мл).

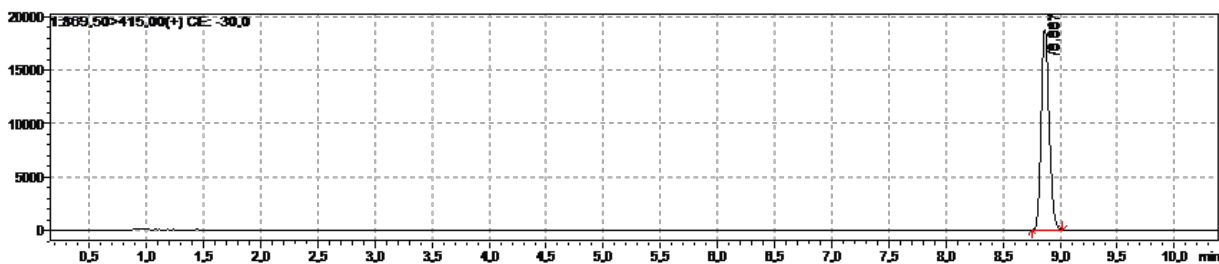


Рисунок 2 – Хроматограмма раствора стандартного образца диосцина (концентрация 900 нг/мл).

Методика определения элементного состава

Изучение элементного состава проводили с использованием рентгено-флуоресцентного метода, рекомендованного для исследования элементного состава лекарственного сырья ГФ XIV [37].

Подготовка образцов

Около 10 г сухой травы якорцев стелющихся измельчали до порошкообразного состояния, помещали в тигель и сжигали на плитке в вытяжном шкафу до прекращения дымления. Тигель поме-

щали в муфельную печь при температуре $500 \pm 1^\circ\text{C}$, выдерживали там около 2 ч, до полного озоления и отсутствия черной угольной массы. После полного охлаждения в вытяжном шкафу в тигель добавляли азотную кислоту 50% и выпаривали её на плитке с закрытой спиралью, избегая разбрызгивания. Затем помещали в муфельную печь при температуре $500 \pm 1^\circ\text{C}$ на 2 ч [38].

После охлаждения тигля, в зольном остатке проводили определение качественного и количественного состава элементов на рентгенофлуоресцентном спек-

тронетре QUANT'X компании Thermo Scientific [39]. Определение проводили в трехкратной повторности.

Статистическая обработка результатов

Обработка хроматографической информации осуществлялась с помощью программного обеспечения «LabSolutions» (Shimadzu).

Для проведения статистического анализа полученных результатов использовали язык статистического программирования R CRAN. Обработка результатов проводилась с использованием системы Microsoft Excel. Для сравнения анализа результатов использовали критерий Стьюдента с оценкой достоверности отличий ($p < 0,05$).

Визуализацию результатов проводили с помощью неметрического многомерного шкалирования. Для построения шкалирования применено расстояние Брэя (также известного как мера Сьёренсена) [40, 41], выполнено центрирование и прокрустово вращение до минимизации стресс-функции.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На рисунках 1–2 представлены хроматограммы растворов стандартных образцов диосцина и протодиосцина в метаноле.

Времена удерживания протодиосцина и диосцина составили соответственно $4,93 \pm 0,03$ и $8,86 \pm 0,03$ мин.

Хроматограммы извлечений из исследуемых образцов растительного сырья представлены на рисунке 3 (А-Г).

Идентификацию диосцина и протодиосцина на хроматограммах проводили по временам удерживания в сравнении со стандартными образцами. Дополнительные пики, наблюдаемые на хроматограммах извлечений, соответствующие соэкстрактивным соединениям, хорошо отделены и не мешают определению целевых аналитов. Для количественной оценки сапонинов в растительном сырье использовали метод внешнего стандарта.

Результаты исследований показали, что во всех исследуемых образцах содержатся диосцин и протодиосцин. Максимальное содержание диосцина наблюдается в образцах сырья, заготовленных в Крыму – $1,90 \pm 0,02$ ($p < 0,05$), а минимальное – в образцах из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Между содержанием диосцина в образцах, заготовленных в Крыму и Сирии статистически значимых различий не обнаружено. Наибольшее количество протодиосцина также обнаружено в образцах из Крыма – $15,59 \pm 0,28$ ($p < 0,05$), а минимальное – в образцах из Молдовы (табл. 3).

Следующим этапом работы было определение элементного состава якорцев стелющихся травы различных регионов произрастания на содержание ключевых элементов, необходимых для жизнедеятельности растения и оказывающих влияние на

процессы, происходящие в организме человека (таблица 4).

Данные статистической обработки результатов анализа представлены в табл. 5.

На рис. 7 представлено взаимное расположение проб в сокращенном пространстве признаков и вклад каждого из исследованных элементов в главные координаты.

На рис. 7 видно, что пробы, характеризующие каждую географическую зону, локализованы компактно, особенно проба из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Наименее сходными являются пробы Сирии и ФГБНУ ВИЛАР, тогда как пробы Крыма и Молдовы, напротив, относительно близки.

В результате элементного анализа образцов якорцев стелющихся травы установлено, что среди макроэлементов во всех исследуемых образцах в наибольшем количестве накапливаются калий и кальций, на их долю приходится около 90% от общего содержания элементов в растении. В траве якорцев стелющихся присутствуют, в том числе, эссенциальные элементы, такие как железо, медь, цинк, марганец, хром, молибден.

Распределение макро и микроэлементов в растении существенно различается в зависимости от места и условий произрастания. Так, например, содержание титана в образцах сырья, заготовленных в питомнике ФГБНУ ВИЛАР в 5–6 раз выше, чем в остальных образцах (табл. 4). Большое содержание титана, в данных образцах связано с условиями произрастания растения (культивируемое в питомнике ВИЛАР). Минимальное накопление титана наблюдается в образцах из Сирии. Цинка оказалось больше в образцах, собранных на полуострове Крым, а его минимальное содержание – в образцах из питомника ФГБНУ ВИЛАР. Марганца было больше всего обнаружено в образцах из питомника ФГБНУ ВИЛАР, а в образцах из Сирии установлено его минимальное содержание.

Марганец участвует в обмене веществ, улучшает физиологические процессы в организме. Принимает участие в окислительных процессах, в восстановлении нитратов при осуществлении фотосинтеза, а также в антагонизме между марганцем и другими химическими элементами [42]. Из этого следует вывод о том, что интенсивность обменных процессов выше в растениях, культивируемых в питомнике ФГБНУ «ВИЛАР». Высокая интенсивность обменных процессов говорит о благоприятных для растения условиях.

Данные, приводимые другими исследователями [42], показали наличие определенной зависимости между содержанием железа и марганца. При снижении содержания марганца в растении накапливается избыточное количество активного закисного железа [42]. Похожая зависимость наблюдается и в некоторых исследованных образцах.

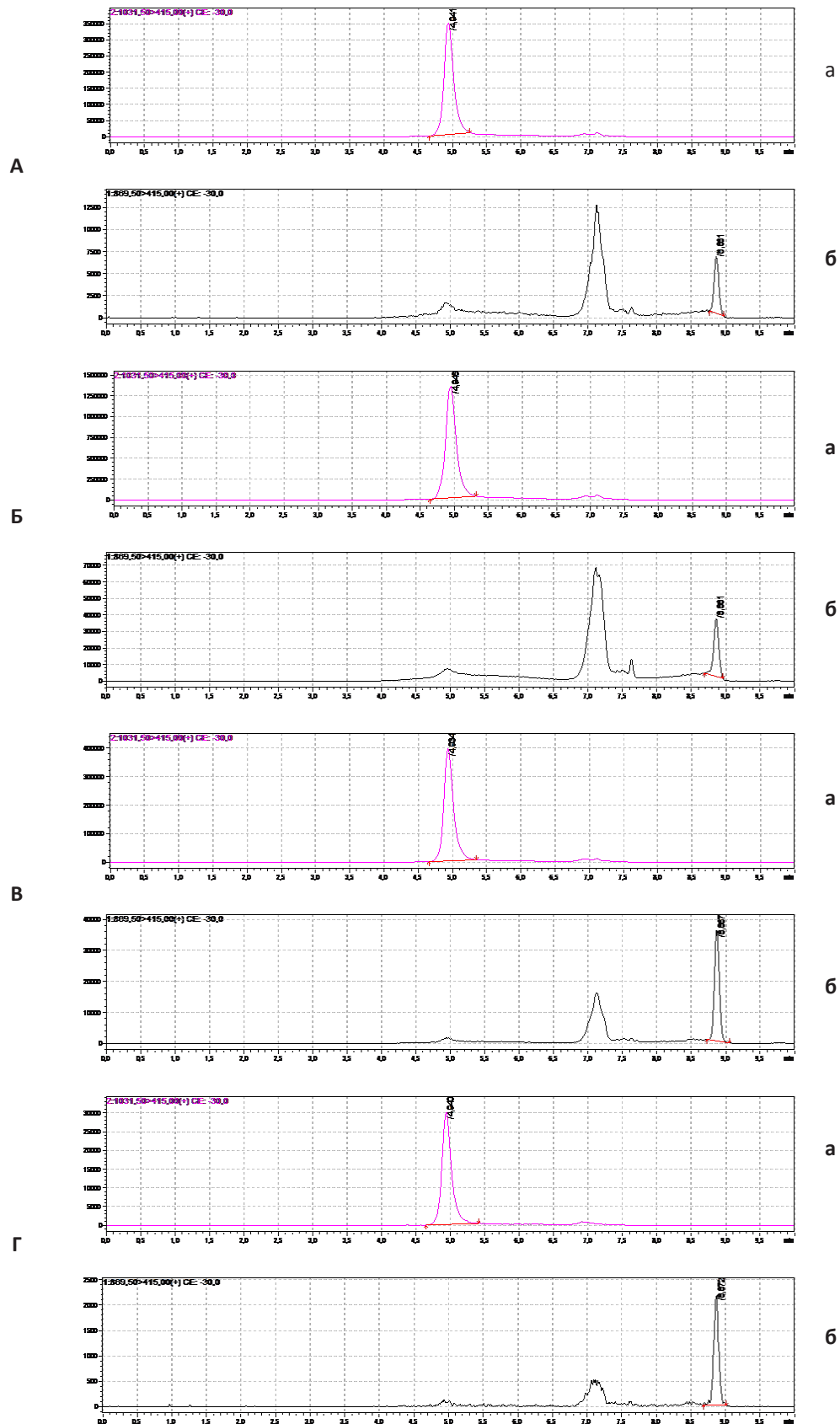


Рисунок 3 – Хроматограммы извлечений из образцов сырья, собранных в Молдове (А), Крыму (Б), Сирии (В) и питомнике ВИЛАР (Г)

Примечание. а – детектирование на ионных переходах протоdiosцина (1031,5→415,0), б – диосцина (869,50→415,00).

Таблица 3 – Результаты количественного определения диосцина и протодиосцина в образцах растительного сырья методом ВЭЖХ-МС/МС

Образцы	Содержание диосцина, мг (в 1 г сырья) X ср. ± SD	Содержание протодиосцина, мг (в 1 г сырья) X ср. ± SD
Молдова (2017 г)	0,265±0,011*	3,17±0,13*
Крым (2017 г)	1,90±0,02	15,59±0,28*
Сирия (2018 г)	1,67±0,04*	3,80±0,11*
ВИЛАР (2016 г)	0,097±0,02*	1,435±0,38*

Примечание: * – достоверность различий p<0,05

Таблица 4 – Элементный состав образцов сырья якорцев стелющихся травы

№ п/п	Элемент	% от общего содержания элементов в образцах, в пересчете на воздушно-сухое сырье			
		Сирия (2018)	Крым (2017)	Молдова (2017)	ВИЛАР (2016)
Макроэлементы					
1	Na	7,70±0,15	3,20±0,26	3,5±0,6	4,30±0,211
2	K	50,71±0,56	64,65±0,39	63,97±0,30	36,27±0,42
3	Mg	0,47±0,09	0,498±0,056	0,58±0,042	0,31±0,01
4	P	0,69±0,10	0,878±0,098	0,88±0,08	0,35±0,04
5	S	1,43±0,13	1,099±0,124	1,08±0,20	1,02±0,11
6	Ca	37,83±0,54	27,22±0,23	26,98±0,21	46,59±0,35
Микроэлементы					
7	Cu	0,0323±0,001	0,0163±0,004	0,018±0,001	0,018±0,002
8	Zn	0,0685±0,008	0,0959±0,007	0,074±0,003	0,054±0,011
9	Al	0,600±0,079	0,628±0,048	0,736±0,045	1,555±0,124
10	Si	0,458±0,058	0,656±0,072	0,957±0,043	0,908±0,062
11	Ti	0,056±0,001	0,134±0,007	0,143±0,008	0,630±0,075
12	Cr	0	0	0,008±0,002	0,016±0,001
13	Mn	0,046±0,010	0,065±0,004	0,067±0,008	0,215±0,008
14	Fe	0,356±0,088	0,880±0,07	0,962±0,054	0,474±0,045
15	Co	0	0	0	0
16	Ni	0,004±0,002	0	0	0,011±0,001
17	Pb	0	0	0	0,011±0,003
18	Mo	0	0	0	0
19	Sn	0	0	0	0
20	Ba	0	0	0	0

Таблица 5 – Статистическая обработка результатов анализа элементного состава

	Df	Sums of Sqs	Mean Sqs	FM model	R2	Pr (>F)
Group	3	0,158631	0,052877	951,25	0,9972	0,001
Residuals	8	0,000445	0,000056	0,0028		
Total	11	0,159075	1			

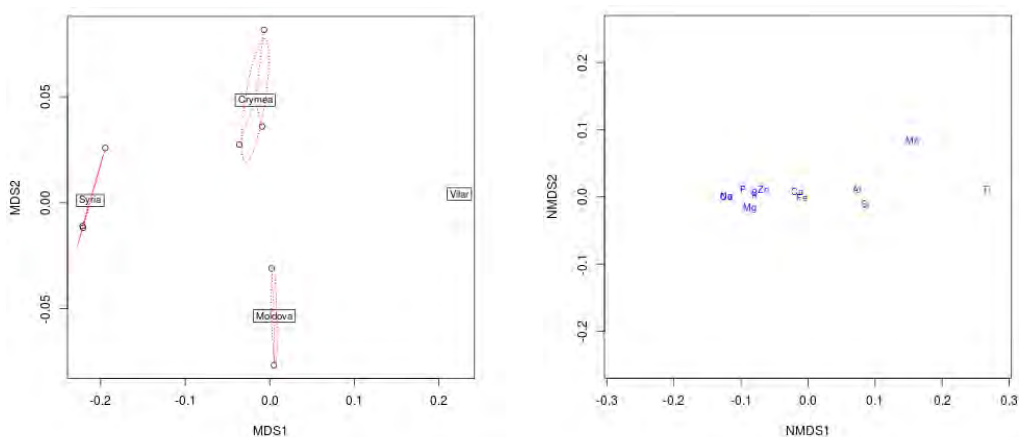


Рисунок 7 – Взаимное расположение проб и вклад каждого из исследованных элементов в главные координаты.

Органические соединения, имеющие в составе железо, нужны растению для обеспечения протекания биохимических процессов, происходящих при дыхании и фотосинтезе. Соединения, имеющие в структуре железо, выступают переносчиками электронов в биохимических процессах, поскольку являются составной частью ферментов дигидрогеназ и цитохромов. Железо принимает участие в процессе биосинтеза хлорофилла, поэтому при ограниченном его поступлении могут возникать тяжелые заболевания растений, в частности хлороз [42, 43].

В исследуемых образцах наблюдается следующая картина по накоплению железа. Его содержание оказалось выше в образцах, собранных в Молдове. В меньшем количестве железо присутствует в образцах, собранных в Сирии.

Кремний в максимальных количествах был обнаружен в образцах из питомника ФГБНУ ВИЛАР, а в образцах из Сирии – в минимальном.

Алюминия в образцах из ФГБНУ ВИЛАР оказалось в 2 раза больше по сравнению с другими образцами. В организме человека алюминий участвует в построении эпителиальной и соединительной ткани, в регенерации костей, в минеральном обмене и др. [1, 44]. Стоит отметить также, что высокое содержание алюминия может оказывать негативное действие на организм человека, поскольку при избыточном его поступлении может проявляться воздействие на центральную нервную систему, прогрессирование болезни Альцгеймера и депрессии [1].

Согласно ОФС.1.5.3.0009.15. «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», предельно допустимая концентрация (ПДК) свинца 6,0 мг/кг. Установлено, что в образцах из Сирии, Крыма и Молдовы свинец не был обнаружен. Содержание свинца в образцах, заготовленных в питомнике ФГБНУ ВИЛАР не превышало предельно допустимую концентрацию.

На основании полученных результатов был составлен ряд биологического поглощения химических элементов для якорцев стелющихся травы:

Образцы, заготовленные в Сирии: $K > Ca > Na > S > P > Al > Mg > Si > Fe > Zn > Ti > Mn > Cu > Ni$.

Образцы, заготовленные на полуострове Крым: $K > Ca > Na > S > Fe > P > Si > Al > Mg > Ti > Zn > Mn > Cu$.

Образцы, заготовленные в Молдове: $K > Ca > Na > S > Fe > Si > P > Al > Mg > Ti > Zn > Mn > Cu > Cr$.

Образцы, заготовленные в питомнике ФГБНУ ВИЛАР:

$Ca > K > Na > Al > S > Si > Ti > Fe > P > Mg > Mn > Zn > Cu > Cr > Pb > Cu$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что растения якорцев стелющихся из разных географических регионов содержат сапонины, различающиеся по составу [45, 46]. В доступной литературе встречается информация о сапонилах, выделенных из якорцев, произрастающих в Китае, Индии, Новой Зеландии, Южной Африке, Болгарии, Грузии и Молдавии [46]. По мнению Szakiel и

др. [47] структура сапонинов и их количественное содержание в этом растении зависит от нескольких факторов: климата, освещенности, наличия влаги и состава почвы, а также некоторых других локальных региональных характеристик. Кроме того, в большинстве выполненных ранее исследований, не сообщается о стадии (фазе) роста растений или о том, когда и каким образом заготовлено сырье. Указывается также, что способ экстракции стероидных сапонинов, очевидно, влияет на результаты их определения в сырье якорцев [45]. Поэтому данные об отсутствии, например, диосцина в некоторых анализировавшихся другими исследовательскими группами образцах [48] позволяют предположить, что фаза развития растений якорцев стелющихся и конкретная методика экстракции стероидных сапонинов оказывают существенное влияние на результаты.

Исследования, выполненные нами, позволяют заключить, что в фазу цветения – плодоношения во всех образцах вне зависимости от зоны заготовки образцов содержатся диосцин и протодиосцин. При этом содержание протодиосцина в некоторых образцах кратно выше содержания диосцина.

В научной литературе, посвященной исследованию травы якорцев стелющихся, представлены сведения о различных методах, использовавшихся для оценки содержания стероидных сапонинов, в том числе диосцина и протодиосцина, в этом лекарственном растительном сырье [46, 48].

По мнению А.Н. Ставрианиди с соавторами [45] «наилучшим способом детектирования (по информативности, селективности и чувствительности) для определения сапонинов считается ионизация электроаспылением в сочетании с тандемной масс-спектрометрией».

Разработанная нами методика с использованием ВЭЖХ-МС/МС позволяет достоверно оценивать качество сырья (травы) якорцев стелющихся по содержанию в нем диосцина и протодиосцина с использованием метода внешнего стандарта.

Важным компонентом химического состава травы якорцев некоторыми исследователями считается характерный набор её макро- и микроэлементов [49–51].

R. Selvaraju с соавторами указывают, что трава якорцев стелющихся является хорошим источником Na, K, Ca, Mg и Fe. Однако в цветках может накапливаться существенная концентрация некоторых тяжелых металлов [49]. Они также показали, что содержание минеральных веществ в якорцах варьирует в зависимости от состава почвы, на которой произрастали растения. Полученные нами результаты позволяют также заключить, что Na, K и Ca являются преобладающими элементами в траве якорцев.

Исследование A.Ghani и др. установило, что якорцы накапливают Cu^{2+} до 0,044 % (сухой вес), Ni^{3+} – 0,239%, Zn^{2+} – 0,434%, Co^{2+} – 0,161%, Cr^{3+} – 0,241%, Cd^{2+} – 0,384%, Fe^{2+} – 0,349%, Mn^{3+} – 0,527%, Pb^{2+} – 0,494%, Mg^{2+} – 0,541% [50]. Способность этого растения в зависимости от состава почвы накапливать кадмий и свинец позволяет считать, что контроль

сырья якорцев на содержание тяжёлых металлов необходим.

I. Daur и соавторы [51] выяснили, что накопление минеральных элементов в якорцах связано, как со стрессовыми условиями в местах произрастания растений, так и с их содержанием и доступностью в почве. Ряды биологического поглощения макро- и микроэлементов, которые могут быть составлены на основе результатов, полученных для образцов якорцев стелющихся, собранных этими исследователями в Саудовской Аравии и Пакистане – $K > N > Mg > Ca > P > Na$; $Mn > Fe > Zn > Ni$ позволяют в сравнении с полученными нами данными говорить о влиянии места (зоны) произрастания на минеральный состав сырья этого растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ-МС/МС во всех исследуемых образцах обнаружены диосцин и протодиосцин. Максимальное содержание диосцина наблюдали в образцах

сырья якорцев стелющихся, заготовленных в Молдове, а минимальное – в образцах из питомника ФГБУ ВИЛАР. Наибольшее количество протодиосцина установлено в образцах сырья якорцев собранных в Крыму, а минимальное – в образцах из Молдовы. Полученные данные и методика оценки качества сырья использованы при составлении проекта фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава», направленной в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Проведенное исследование элементного состава якорцев стелющихся травы показало, что места обитания (географические зоны), в которых осуществлялся сбор исследованных образцов сырья, влияют на накопление элементов растением. С учетом полученных данных составлены ряды биологического поглощения для образцов каждого места произрастания. Все исследуемые образцы сырья соответствовали требованиям ОФС.1.5.3.0009.15 ГФ по содержанию тяжелых металлов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Кожин А.А. Владимирский Б.М. Микроэлементозы в патологии человека экологической этиологии // Экология человека. – 2013. – С. 56–63.
2. Кононова С.В., Кузин В.Б., Ловцова Л.В., Зуева И.А., Ганенков А.А. Фармакологические и клинико-экономические аспекты применения лекарственных препаратов железа (обзор) // Медицинский альманах. – 2010. – №3. – С. 197–201.
3. Мазнев Н. И. Энциклопедия лекарственных растений. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: Мартин, 2004. – 494 с.
4. William L. Halvorson. Factsheet for Tribulus terrestris L. // Southwest Biological Science Center Sonoran Desert Field Station University of Arizona. – 2003. – 29 p.
5. Nikolova A., Vassilev A.A Study on Tribulus Terrestris L. Anatomy and Ecological Adaptation – Tribulus Terrestris L. // Biotechnology & Biotechnological Equipment. – 2011. – Vol. 25. – P. 2369–2372.
6. Атлас лекарственных растений России. – М.: ВИЛАР, 2006. – 376 с.
7. Adaikan G.P., Gauthaman K., Prasad N.V. History of herbal medicines with an insight on the pharmacological properties of Tribulus terrestris // The aging male. – 2009. – P. 163–169. <https://doi.org/10.1080/tam.4.3.163.169>.
8. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 3. Семейства Fabaceae – Apiaceae. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2010. – С. 102–105.
9. Dincher D., Janda B., Evstatieva L., Oleszek W., Aslani M.R., Kostova I. Distribution of steroidal saponins in Tribulus terrestris from different geographical regions // Phytochemistry. – 2008. – №69. – P. 176–186. <https://DOI:10.1016/j.phytochem.2007.07.003>.
10. Shishovska M., Arsova-Saradinovska Z., Memeti S. A Simple Method for Determination of Protodioscin in Tribulus terrestris L. and Pharmaceuticals by High Performance Liquid Chromatography Using Diode-Array Detection // Journal of Chemical Engineering Research Updates. – 2015. – V. 2. – P. 12–21.
11. Худенко П.Е., Терешина Н.С., Морохина С.Л. Определение флавоноидов в траве якорцев стелющихся методом ВЭЖХ // Фармация. – 2016. Т. 65. – № 5. – С. 19–22.
12. Ashwani K. Comparative and quantitative determination of quercetin and other flavonoids in North Indian population of Tribulus terrestris Linn. by HPLC // International Journal of Pharma and Bio Sciences. – 2012. – 3(4). – P. 69–79. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1197078>.
13. Noori M., Dehshiri M.M., Zolfaghari M. R. Tribulus Terrestris L. (Zygophyllaceae) Flavonoid Compounds // International Journal of Modern Botany. – 2012. – №2. – P. 35–39. <https://doi.org/10.5923/j.ijmb.20120203.01>.
14. Умарова Г.К. Липиды травы якорцев стелющихся, произрастающих в Узбекистане // Фармация. – 2015. – №6. – С. 19–21.
15. Mamdouh N. Samy, Mokhtar M. Bishr, Ahmed A. Ahmed, Hanaa M. Sayed and Mohamed S. Kamel. Pharmacognostical Studies on Flower of Tribulus terrestris L // Journal of pharmacognosy and phytochemistry zdb. – 2013. – Vol. 1, Issue 5 – P.18–22.
16. Wenyi Zhu., Yijie Du., Hong Meng., Yinmao Dong., Li Li. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of Tribulus terrestris // Chemistry Central Journal. – 2017. – №11. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0289-x>.
17. Farooq Azam, Samia Munier, Maliha Battoo, Bashir Ahmad, Ghazanfar Abbas. A review on advancements in ethnomedicine and phytochemistry of Tribulus terrestris – a plant with multiple health benefits // International Journal of Biosciences. – 2019. – Vol. 14. – №1. – P. 21–37.
18. Shahid M., Riz M., Talpur M.M.A., Pirzada T. Phytopharmacology of Tribulus terrestris // Journal of biological regulators homeostatic agents. – V. 30, №3. – P. 785–788.
19. Chhatre S., Nesari T., Somani G., Kanchan D., Sathaye S. Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris // Pharmacognosy Reviews. – 2014. – V. 8, №15. – P. 45–51. DOI: 10.4103/0973-7847.125530.
20. Mahmoud Bahmani, Babak Baharvand-Ahmadi, Pegah Tajeddini, Mahmoud Rafieian-Kopaei, Nasrollah Naghdi. Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones // Journal of Renal Injury Prevention. – 2016. – V. 5, №. 3. – P. 129–133. DOI:10.15171/jrip.2016.27.
21. Anant Gopal Singh, Akhilesh Kumar, Divya Darshan Tewari. An ethnobotanical survey of medicinal plants used in Terai forest of western Nepal // Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine. – 2012. – V. 8. – P. 19. DOI: 10.1186/1746-4269-8-19.
22. Kevalia J., Patel B. Identification of fruits of Tribulus terrestris Linn. and Pedalium murex Linn.: A pharmacognostical approach // Ayu. – 2011. – V. 32, №4. – С. 550–553. DOI:10.4103/0974-8520.96132.

23. Roaiah M.F., El Khayat Y.I., El Din S.F., Abd El Salam M.A. Pilot Study on the Effect of Botanical Medicine (Tribulus terrestris) on Serum Testosterone Level and Erectile Function in Aging Males With Partial Androgen Deficiency (PADAM) // Journal of Sex & Marital Therapy. – 2015. – P. 1–5. DOI: 10.1080/0092623X.2015.1033579
24. Khaleghi S., Bakhtiari M., Asadmobini A., Esmaeili F. Tribulus terrestris Extract Improves Human Sperm Parameters In Vitro // Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine. – 2016. – P. 2–5. DOI:10.1177/2156587216668110
25. Salgado R.M., Marques-Silva M.H., Gonçalves E., Mathias A.C., Aguiar J.G. Effect of oral administration of Tribulus terrestris extract on semen quality and body fat index of infertile men // Andrologia. – 2016. DOI:10.1111/and.12655
26. Akhtari E., Raisi F., Keshavarz M., Hosseini H., Sohrabvand F. Tribulus terrestris for treatment of sexual dysfunction in women: randomized double-blind placebo – controlled study // Daru: Journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences. – 2014. – V. 22. – P. 40. DOI:10.1186/2008-2231-22-40
27. Nasrin Babadai Samani, Azam Jokar, Mahmood Soveid, Mojtaba Heydari, Seyed Hamdollah Mosavat. Efficacy of Tribulus Terrestris Extract on the Serum Glucose and Lipids of Women with Diabetes Mellitus // Iranian Journal of Medical Sciences. – 2016. – V. 41, № 3. – P. 5.
28. Pinar Ercan, Sedef Nehir El. Inhibitory effects of chickpea and Tribulus terrestris on lipase, α -amylase and α -glucosidase // Food Chemistry. – 2016. – V. 205. – С. 163–169. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.03.012
29. Ghareeb D.A., Amani M. D. ElAhwany, Sherif M. El-Mallawany, Ashraf A. Saif. In vitro screening for anti-acetylcholinesterase, antioxidant, anti-glucosidase, anti-inflammatory and anti-bacterial effect of three traditional medicinal plants // Biotechnology, Biotechnological Equipment. – 2014. – V. 28, №6. – P. 1155–1164. DOI: 10.1080/13102818.2014.969877
30. Jun-Dong Zhang, Yong-Bing Cao, Zheng Xu, Hui-Hua Sun, Mao-Mao An. In vitro and in vivo antifungal activities of the eight steroid saponins from Tribulus terrestris L. with potent activity against fluconazole-resistant fungal pathogens // Biological & Pharmaceutical Bulletin. – 2005. – V. 28, №12. – P. 2211–2215.
31. Soleimanpour S., Sedighinia F.S., Afshar A.S., Zarif R., Ghazvini K. Antibacterial activity of Tribulus terrestris and its synergistic effect with Capsella bursa-pastoris and Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in-vitro study // Avicenna Journal of Phytomedicine. – 2017. – V. 5, №3. – S. 210–217.
32. Sun W., Li H., Yang Sh.-J. A triterpene saponin from Tribulus terrestris attenuates apoptosis in cardiocyte via activating PKC signalling transduction pathway // Journal of Asian Natural Products Research. – 2017. – V. 10, №1–2. – S. 39–48. DOI:10.1080/10286020701275846
33. Liu X.-M., Huang Q.-F., Zhang Y.-L., Lou J.-L., Liu H.-Sh. Effects of Tribulus terrestris L. saponin on apoptosis of cortical neurons induced by hypoxia-reoxygenation in rats // Journal of Chinese Integrative Medicine. – 2008. – V. 6, №1. – P. 45–50.
34. Горпиченко И.И., Гурженко Ю.Н. Применение препарата Трибестан в андрологической практике // Здоровье мужчины. – 2010. – № 1. – С. 28–32.
35. Искендеров Г.Б., Гусейнгулиева К.Ф. Изучение стероидных гликозидов якорцев стелющихся, произрастающих в Азербайджане // Химия растительного сырья. – 2016. – №2. – С. 47–52. https://doi.org/10.14258/jcrpm.2016021053.
36. Молохова Е.И., Карпенко Ю.Н., Аффуф А. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования диосциина в экстракционных препаратах из *Tribulus terrestris* L. // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки. Материалы научно-практической конференции с международным участием. – 2018. – №22. – С. 158–161.
37. ОФС.1.5.3.0009.15. Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах
38. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д. Элементный состав подземных органов и экстрактов ели обыкновенной // Фармация. – 2018. – №6. – С. 20–23. https://doi.org/10.29296/25419218-2018-06-04.
39. Гуляев Д.К., Белоногова В.Д., Талипов А.М. Элементный состав корней малины обыкновенной (*Rubus idaeus* L.) // Вестник башкирского государственного медицинского университета. – 2018. – №4. – С. 126–130.
40. Bray J.R., Curtis J.T. 1957. An ordination of upland forest communities of southern Wisconsin. Ecological Monographs. – 1957. – №27. – P. 325–349.
41. Ricotta C., Podani J. On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. Ecological Complexity. – 2017. – №31. – P. 201–205.
42. Копылова Л.В. Аккумуляция железа и марганца в листьях древесных растений в техногенных районах Забайкальского края // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2010. – т. 12, №1(3). – С. 709–712.
43. Мумбер А.Г., Чашина О.Е., Куянцева Н.Б., Потапкин А.Б. Влияние кислотных выбросов Карабашского медеплавильного комбината на жизненное состояние подростка сосны в Ильменском государственном заповеднике (Южный Урал) // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16. – №1. – С. 1230–1236.
44. Ильинских Е.Н., Огородова Л.М., Безруких П.А. Эпидемиологическая генотоксикология тяжелых металлов и здоровье человека. – Томск: СГМУ, 2003. – 300 с.
45. Ставрианиди А.Н., Стеколыщикова Е.А., Турова П.Н., Родин И.А., Шлигун О.А. Применение метода количественного анализа многокомпонентной системы для хромато-масс-спектрометрического определения диосгенина, диосциина и протодиосциина в экстрактах из травы *Tribulus terrestris* // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2017, Vol. 58, Is.3. – P. 144–153.
46. Semerdjieva I.B., Zheljzkov V.D. Chemical Constituents, Biological Properties, and Uses of *Tribulus terrestris*: A Review // Natural Product Communications. 2019. Vol.14, Is. 8. 1934578X19868394.
47. Szakiel A., Pączkowski C., Henry M. Influence of environmental abiotic factors on the content of saponins in plants // Phytochemistry. 2011. Vol. 10, Is. 4. P. 471–491.
48. Lazarova I., Ivanova A., Mechkarova P., Peev D., Valyovska N. Intraspecific Variability of Biologically Active Compounds of Different Populations of *Tribulus terrestris* L. (Zygophyllaceae) in South Bulgaria // Biotechnology and Biotechnological Equipment. 2011. Vol. 25, Is.2. P. 2352–2356.
49. Selvaraju R., Thirupathi G., Raman R.G., Dhakshanamoorthy D. Estimation of essential and trace elements in the medicinal plant *Tribulus terrestris* by icp-oes and flame photometric techniques // Romanian journal of biology plant biology. 2011. Vol. 56, Is. 1. P. 65–75.
50. Ghani A., Ikram M., Hussain M., Imran M., Majid A. Evaluation of trace elements in selected medicinal plants (*Albizia lebeck*, *Acacia modesta* and *Tribulus terrestris*) of soone valley, Khushab, Pakistan // CIBTech Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2016. – Vol. 5, Is. 2. – P. 4–7.
51. Daur I., Shah Z. H., Ihsan M. Z., Ali S., Waqas M., Rehman H. M., Al-Feel A.A., Elsafori A.K., Sohrab, S. S. Occurrence, comparative growth and composition of *Tribulus terrestris* L. under variable in-situ water stress // Pak. J. Bot. 2017. Vol. 49, 5. P. 1641–1646.

АВТОРЫ

Аффуф Абдулкарим – аспирант кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: aboud.bashar89@gmail.com

Карпенко Юлия Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: Karpenko@pfa.ru

Гуляев Дмитрий Константинович – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID: orcid.org/0000-0001-9464-1869. E-mail: dkg2014@mail.ru.

Молохова Елена Игоревна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры промышленной технологии с курсом биотехнологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая

академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: molohova@pfa.ru.

Блинова Ольга Леонидовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: oblinoval@mail.ru

Гилева Ангелина Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: angelinaustinoval@mail.ru

Белоногова Валентина Дмитриевна – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. E-mail: belonogova@pfa.ru.