

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

УДК 581.192:547.595

**ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ
ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ В СОПЛОДИЯХ И ЛИСТЬЯХ ОЛЬХИ
РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ****Георгий Викторович Нестеров¹, Татьяна Михайловна Литвинова¹,
Владимир Николаевич Матвеев², Надежда Викторовна Нестерова¹,
Фидан Ширин кызы Сулейманова¹**¹ Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,
Россия**Автор, ответственный за переписку:** Владимир Николаевич Матвеев,
13121946VNM@gmail.com

Аннотация. В соплодиях и листьях ольхи серой ((*Alnusincana* (L.) Moech) и черной (клейкой) (*Alnusglutinosa* (L.) Gaerth)) с использованием качественных реакций установлено наличие тритерпеновых сапонинов. Методом тонкослойной хроматографии показано наличие олеаноловой кислоты во всех исследуемых образцах. Показано, что содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту методом прямой спектрофотометрии на длине волны 310 нм составляет для соплодий от 1,538 до 1,682%, а для листьев от 1,102 до 1,274%.

Ключевые слова: ольха черная, ольха серая, листья ольхи, соплодия ольхи, олеаноловая кислота, тритерпеновые сапонины, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия

Финансирование: исследование выполнено в рамках бюджетного финансирования МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет и Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Для цитирования: Нестеров Г.В., Литвинова Т.М., Матвеев В.Н., Нестерова Н.В., Сулейманова Ф.Ш. Идентификация и количественное определение тритерпеновых сапонинов в соплодиях и листьях ольхи различных видов // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. Т. 63. № 1. С. 76–82.

ORIGINAL ARTICLE

**IDENTIFICATION AND QUANTIFICATION OF TRITERPENE SAPONINS
IN THE INFRUCTESCENCE AND LEAVES OF VARIOUS ALDER SPECIES****Georgy V. Nesterov¹, Tatiana M. Litvinova¹, Vladimir N. Matveenko²,
Nadezhda V. Nesterova¹, Fidan Sh. Suleymanova¹**¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University,
Moscow, Russia² Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia**Автор, ответственный за переписку:** Vladimir N. Matveenko, 13121946VNM@
gmail.com

Abstract. The presence of triterpene saponins was established using qualitative reactions in the seed and leaves of gray alder (*Alnusincana* (L.) Moech) and black (sticky) (*Alnus glutinosa* (L.) Gaerth). The presence of oleanolic acid in all studied samples was established by thin layer chromatography. Evaluation of the quantitative content of the sum of triterpene saponins in terms of oleanolic acid was carried out by direct spectrophotometry using a Specord instrument at a wavelength of 310 nm. It has been shown that the content of the sum of triterpene saponins in terms of oleanolic acid is from 1.538 to 1.682% for infructescence, and from 1.102 to 1.274% for leaves.

Keywords: black alder, gray alder, alder leaves, alder infructescence, oleanolic acid, triterpene saponins, thin layer chromatography, spectrophotometry

Financial Support: the study was carried out within the framework of budgetary financing of the Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry and the First Sechenov Moscow State Medical University of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Nesterov G.V., Litvinova T.M., Matveenko V.N., Nesterova N.V., Suleymanova F.Sh. Identification and quantification of triterpene saponins in the infructescence and leaves of various alder species // Vestn. Mosk. un-ta. Ser. 2. Chemistry. T. 63. N 1. P. 76–82.

Сапонины достаточно широко представлены в растительном мире. Их присутствие достоверно установлено в растениях, относящихся к 40 семействам. К тритерпеновым относят сапонины, агликоны которых являются пентациклическими или тетрациклическими тритерпеноидами. Исследования, направленные на выявление особенностей распространения тритерпеновых гликозидов в разных семействах цветковых растений, позволили установить, что больше всего представителей этой группы биологически активных веществ содержат двудольные, причем у них чаще встречаются соединения, относящиеся к типам олеанана, урсана, даммарана, реже лупана.

В последние десятилетия проведены многочисленные исследования *in vitro* и *in vivo*, которые убедительно доказывают, что эти соединения способны в широчайшем спектре оказывать фармакологическое действие: противовоспалительное, гиполлипидимическое, регулирующее водно-солевой обмен, отхаркивающее, мочегонное, тонизирующее, адаптогенное, антиаллергическое, седативное, антимикробное и антифунгициальное. Кроме того, выявлена пищевая безопасность сапонинсодержащего сырья, что позволяет использовать его не только в качестве источника создания новых лекарственных средств, но и для производства обогащенных функциональных пищевых продуктов [1–7]. В последнее время значительный интерес вызывает возможность использования тритерпеновых гликозидов в качестве адъювантов при производстве вакцин [8].

При возрастающем интересе к лекарственному растительному сырью, представляюще-

му собой перспективный источник сапонинов тритерпенового ряда, отмечается тенденция к изучению растительных объектов, традиционно рассматриваемых как сырье для получения других групп биологически активных веществ (БАВ). В научной литературе отмечается, что такие виды ольхи, как *Alnus japonica*, *A. hirsute*, *A. nepalensis*, *A. acuminata*, *A. rubra* накапливают сапонины тритерпенового ряда, среди которых идентифицированы β -амирин, урсоловая и олеаноловая кислоты [9–11]. Формулы основных компонентов фракции тритерпеновых сапонинов, характерных для рода *Alnus*, представлены на рис. 1.

Цель исследования – изучение качественного состава сырья, а также количественное определение сапонинов в соплодиях и листьях ольхи фармакопейных видов, произрастающих в Москве и Московской области.

Материалы и методы

Объектом исследования служили соплодия и листья ольхи видов *Alnus incana* и *A. glutinosa*, заготовленные от дикорастущих растений, произрастающих в разных районах Московской области (подлесок смешанного леса) и в парковой зоне Москвы, а также соплодия и листья ольхи черной декоративной сорта «Imperialis». Заготовку соплодий осуществляли осенью 2020 г. в соответствии с рекомендациями [12]. Листья заготавливали с конца мая до середины сентября в период 2020 г. для оценки сезонной динамики накопления тритерпеновых сапонинов. Сушку сырья проводили воздушно-теневым методом. Высушенное сырье подвергали измельчению

на аналитической мельнице «Ика» (Германия). Для проведения качественного анализа получали водные извлечения из исследуемого сырья. Осуществляли качественные реакции пенообразования с раствором свинца ацетата и спиртовым раствором холестерина, а также реакцию Лафона [13]. В целях подтверждения полученных результатов анализа последующую идентификацию веществ тритерпеновой природы проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Мерс» в разных системах растворителей, используемых при качественном анализе сапонинов. Извлечение биологически активных веществ из образцов исследуемого сырья проводили 70%-м спиртом этиловым при соотношении сырья и экстрагента 1:10. Для последующего качественного определения агликоновотритерпеновых сапонинов необходимо проводить стадию гидролиза, для осуществления которой из полученных извлечений были отобраны аликвоты объемом 15 мл, выпаренные досуха в выпарительных чашках. Полученные после выпаривания остатки растворяли в смеси для гидролиза, полученной смешиванием кислоты уксусной ледяной, кислоты хлористоводородной концентрированной (35–38%) и воды дистиллированной в соотношении по объему 3,5:1,0:5,5, после чего нагревали в кругло-

донной колбе в течение 120 мин. По окончании времени гидролиза полученную смесь разводили водой дистиллированной и отделяли выпавший при разбавлении осадок. Полученный осадок растворяли в 95%-м этиловом спирте. В качестве свидетеля мы использовали СО кислоты олеаноловой (Oleanolic acid analytical standart, «AKScientific», США). В качестве проявителя применяли 20%-й раствор кислоты фосфорновольфрамовой в 95%-м этиловом спирте. Зоны адсорбции веществ тритерпеновой природы и СО должны окрашиваться в розовый цвет.

Методы спектрофотометрии широкого используются при анализе лекарственного растительного сырья, они отличаются быстротой, эффективностью и экономической привлекательностью. Для оценки количественного содержания тритерпеновых сапонинов в соплодиях и листьях ольхи исследуемых видов мы выбрали метод УФ-спектрофотометрии, в результате которого происходит протонирование тритерпенового цикла с формированием карбокатиона по месту локализации неопределенной связи, а в случае присутствия у C28 (рис. 1) карбоксильной группы осуществляется последующее формирование лактона. Максимум поглощения продукта реакции наблюдается при длине волны, равной 310 нм.

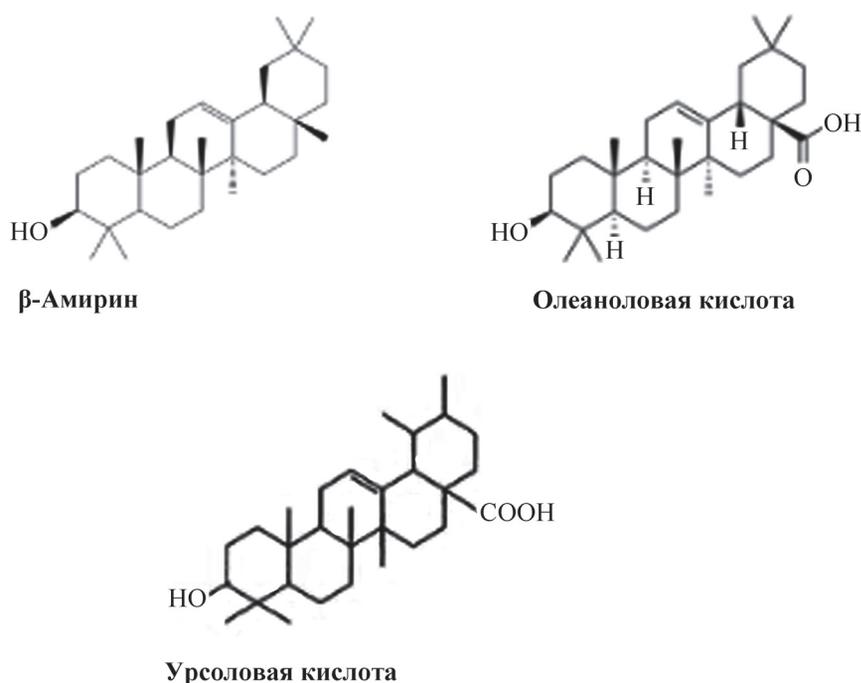


Рис. 1. Основные компоненты фракции тритерпеновых сапонинов, встречающиеся у представителей рода *Alnus*

В целях проведения спектрофотометрического анализа из образцов сырья получали извлечения пятикратной экстракцией точных навесок предварительно измельченного сырья 70%-м этиловым спиртом на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Отобранные из извлечения аликвоты объемом 10 мл выпаривали досуха на роторном испарителе. Гидролиз осуществляли в соответствии с вышеизложенной методикой. Полученные осадки на фильтре промывали водой дистиллированной, растворяли в 95%-м этиловом спирте и переносили в мерную колбу емкостью 25 мл. К 1 мл полученного раствора приливали 4 мл кислоты серной концентрированной, оставляли на 15 мин и проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре «Specord UV-VIS 205» в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм в диапазоне длины волн 220–400 нм. В качестве раствора сравнения использовали концентрированную серную кислоту. Параллельно проводили оценку значений оптической плотности стандартного раствора олеаноловой кислоты, получаемого растворением 0,0004 г (точная навеска) олеаноловой кислоты в 10 мл 95%-го этилового спирта.

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую в исследуемых образцах сырья ольхи рассчитывали по формуле:

$$X(\%) = \frac{A_x \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m_x \cdot 50 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A_x – значение оптической плотности исследуемого извлечения из сырья ольхи, A_0 – значение оптической плотности раствора кислоты олеаноловой, m_0 – масса кислоты олеаноловой; m_x – масса исследуемого сырья (соплодия, ли-

стья) ольхи видов серая и черная, W – влагосодержание сырья.

Результаты и обсуждение

Качественные реакции на сапонины дали положительный результат со всеми исследуемыми образцами, который представлен в табл. 1. Как видно из данных табл. 1, качественные реакции на сапонины подтвердили наличие во всех исследуемых образцах тритерпеновых сапонинов, присутствие которых было подтверждено в дальнейшем методом ТСХ.

Мы использовали следующие системы растворителей: хлороформ – 96%-й этиловый спирт – вода дистиллированная (13:6:1), *n*-бутанол – кислота уксусная – вода дистиллированная (10:3:5), бензол – ацетон (3:1). После проявления хроматограмм раствором 20%-й фосфорновольфрамовой кислоты в 95%-м этиловом спирте зоны адсорбции веществ тритерпеновой природы окрасились в различные оттенки розового цвета. Число пятен составило 4 и 6 у извлечений из листьев и плодов ольхи серой и черной соответственно. Значение R_f пятна, совпадающего с R_f СО олеаноловой кислоты составило 0,46–0,48 в системе растворителей хлороформ – 96%-й этиловый – вода дистиллированная (13:6:1), 0,67–0,68 в системе *n*-бутанол – кислота уксусная – вода дистиллированная (10:3:5) и 0,49–0,51 в системе бензол – ацетон (3:1). Таким образом, было подтверждено наличие кислоты олеаноловой во всех исследуемых образцах.

Количественное определение суммарного содержания сапонинов проводили по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра при 310 нм. Результаты анализа представлены на рис. 2.

Т а б л и ц а 1

Результаты качественных реакций на сапонины в листьях и соплодиях ольхи исследуемых видов

| Проводимая реакция | Ожидаемый результат |
|---|--|
| Реакция пенообразования в кислой и щелочной среде | образование устойчивой пены во всем объеме |
| Реакция с раствором свинца ацетата | образование желтовато-бежевого творожистого осадка |
| Реакция Лафона | образование зеленого осадка |
| Реакция с 1%-м спиртовым раствором холестерина | образование коричневатого осадка |

Т а б л и ц а 2

Результаты количественного определения сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в сухом экстракте листьев ольхи фармакопейных видов

| Объект исследования | Содержание сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую, % | Метрологические характеристики |
|--|--|---|
| Сухой экстракт листьев ольхи фармакопейных видов | 11,212 | $X_{\text{ср.}} = 11,212$ $S^2 = 0,00292$ $S = 0,0541$ $P = 0,95$ $t(P, f) = 2,78$ $\Delta x = 0,06718$ $E = 0,599\%$ |

П р и м е ч а н и е: $X_{\text{ср.}}$ – среднее выборки, S^2 – дисперсия, S – стандартное отклонение, P – доверительная вероятность, $t(P, f)$ – критерий Стьюдента, Δx – доверительный интервал, E – относительная погрешность.

В ходе статистической обработки данных пяти параллельных измерений по всем исследуемым объектам выявлено, что содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую составляет для соплодий от 1,538 до 1,692%, а для листьев от 1,102 до 1,274%. Ошибка единичного измерения колеблется от 0,61 до 1,48%.

В настоящее время листья ольхи не являются официальным сырьем и для их заготовка используют многолетние растения, поэтому пред-

ставлялось целесообразным провести оценку сезонной динамики накопления тритерпеновых сапонинов. Как следует из данных проведенного исследования, максимальное содержание сапонинов в сырье наблюдается в весенний период, а с мая по сентябрь снижается на 20%, что, очевидно, обусловлено физиологической ролью сапонинов в растительном организме, которые выполняют функцию регулирования ростовых процессов и обеспечивают фитопатогенную защиту. Однако снижение количества

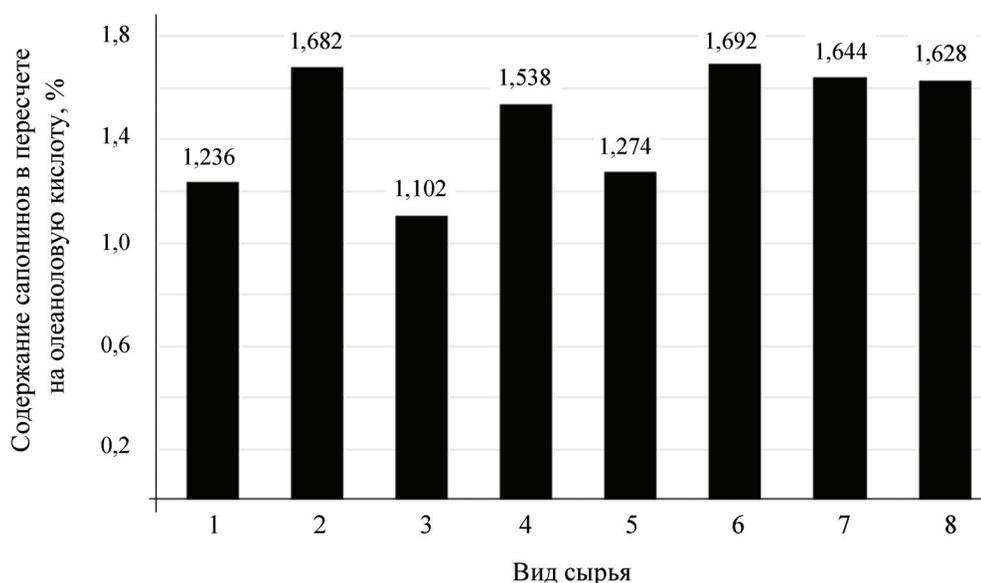


Рис. 2. Результаты количественного определения сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту (1 – листья ольхи черной, 2 – соплодия ольхи черной, 3 – листья ольхи серой, 4 – соплодия ольхи серой, 5 – листья ольхи черной декоративной (сорт «Imperial»), 6 – соплодия ольхи черной декоративной (сорт «Imperial»), 7 – соплодия ольхи («ФармаЦвет»), 8 – соплодия ольхи («Зеленая лавка»))

тритерпеновых сапонинов в листьях ольхи не является существенным, как для других растительных объектов, что позволяет рассматривать возможность поздней заготовки листьев ольхи как наиболее щадящего метода.

Предложенная методика количественного определения сапонинов использовалась в дальнейшем для оценки их содержания в сухом экстракте листьев ольхи фармакопейных видов. Результаты анализа представлены в табл. 2.

Выводы

В ходе проведенных исследований соплодий и листьев ольхи черной и серой, заготовленных от дикорастущих и культивируемых сортов растений Московской области, а также образцов соплодий промышленной фасовки выявлено содержание веществ сапониновой природы, преимущественно тритерпенового ряда. При разделении сапонинов методом тонкослойной

хроматографии из спиртоводных извлечений соплодий и листьев ольхи выявлены вещества тритерпеновой природы, среди которых при сравнении полученных значений R_f со значением стандарта идентифицирована олеаноловая кислота. Оценку количественного содержания суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую осуществляли методом прямой спектрофотометрии, основанной на способности продуктов взаимодействия агликонов тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой поглощать при длине волны 310 нм. Содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую составляет для соплодий от 1,538 до 1,682%, а для листьев от 1,102 до 1,274%. Листья ольхи фармакопейных видов были использованы для получения сухого экстракта, в котором количество тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту составило 11,212%.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rao A.V. Dietary saponins and human health // Saponins in food, feedstuffs and medical plants: Proceeding of the Phytochemical Society of Europe, Kluwer Academic Publishers, 2000. Vol. 45. P. 255–270 (DOI: 10.1007 / 978-94-015-9339-7_26).
2. Куркин В.А., Петрухина И.К., Акушская А.С. Исследование номенклатуры адаптогенных лекарственных препаратов, представленных на фармацевтическом рынке Российской Федерации // Фундаментальные исследования. 2014. № 8 (4). С. 898–902.
3. Василенко Ю.К., Пономарев В.Д., Оганесян Э.Т. Сравнительное исследование гиполипидимических свойств тритерпеноидов // Химико-фармацевтический журнал. 1981. № 5. С. 50–53.
4. Sprag S.G., Light M.E. van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins // J. Ethnopharmacol. 2004. Vol. 94. N 2–3. P. 219–243 (DOI: 10.1016 / j.jep.2004.05.016).
5. Темиргалиева Э.М., Митковская О.А., Толыбекова А.А. Солодка в комплексной терапии аллергодерматозов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2012. № 3. С. 33–36.
6. Жалсрай Алдармаа. Исследование нейропротективных свойств извлечений из лекарственных растений при моделях заболеваний центральной нервной системы // Дис. ... докт. биол. наук. Томск, 2019. 312 с.
7. Дикусар Е.А. Синтез и изучение фунгицидной активности аммониевых солей глицирризиновой кислоты // Химия растительного сырья. 2011. № 4. С. 53–56.
8. Ozlem Guclu-Ustundag and Giuseppe Mazza. Saponins: Properties, Applications and Processing // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2007. N 47. P. 231–258 (DOI:10.1080 / 10408390600698197).
9. Felföldi-Gáva A., Szarka S., Simándi B., Blazics B., Simon B., Kéry A. Supercritical fluid extraction of *Alnusglutinosa* (L.) Gaertn // J. Supercrit. Fluids 2012. Vol. 61. P. 55–61 (DOI: 10.1016 / j.supflu.2011.10.003).
10. Aguilar M.I., Rovelo, R., Verjan, J.G., Illescas, O., Baeza, A.E., Fuente, M.D.L., Avila I., Navarrete A. Anti-inflammatory activities, triterpenoids, and diarylheptanoids of *Alnusacuminata* ssp. *arguta* // Pharm. Biol. 2011. Vol. 49. P. 1052–1057 (DOI: 10.3109/13880209.2011.564634).
11. Xueyang Ren, Ting He, Yanli Chang, Yicheng Zhao, Xiaoyi Chen, Shaojuan Bai, Le Wang, Meng Shen and Gaimei She. The Genus *Alnus*, A Comprehensive Outline of Its Chemical Constituents and Biological Activities // Molecules. 2017. Vol. 22. P. 138 (doi.org/10.3390/molecules22081383).
12. Правила сбора и сушки лекарственных растений (сборник инструкций). Под ред. А.П. Шретера, М., 1985. 328 с.
13. Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С. и др. Практикум по фармакогнозии // уч. пособие для вузов. Харьков, 2004. 512 с.

Информация об авторах

Нестеров Георгий Викторович – ассистент кафедры фармации ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (<https://orcid.org/0000-0002-2743-2765>, nesterov_g_v@staff.sechenov.ru);

Литвинова Татьяна Михайловна – зав. кафедрой фармации ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. фарм. наук (<https://orcid.org/0000-0003-0820-0755>, litvinovatat@list.ru);

Матвеевко Владимир Николаевич – профессор кафедры коллоидной химии МГУ имени М.В. Ломоносова, докт. хим. наук (<https://orcid.org/0000-0002-6142-5710>, 13121946VNM@gmail.com);

Нестерова Надежда Викторовна – ст. преподаватель кафедры фармацевтического естествознания ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, канд. фарм. наук (<https://orcid.org/0000-0002-9752-9757>, nestero-nadezhda@yandex.ru);

Сулейманова Фидан Ширин кызы, ассистент кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина, (<https://orcid.org/0000-0003-2432-4715>, suleymanovafidan5@gmail.com).

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила в редакцию 16.09.2021;
одобрена после рецензирования 12.10.2021;
принята к публикации 14.10.2021.