

УДК 581.192:547.595

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2022.77.17.005>

АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ В ТРАВЕ ЛЮБИСТОКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

О.В. Нестерова, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО «первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский университет)

К.И. Ваулина, академический директор Офиса образовательных программ Передовой инженерной школы «Интеллектуальные системы тераностики» ФГАОУ ВО «первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава РФ (Сеченовский университет)

Установлено наличие тритерпеновых сапонинов с использованием качественных реакций в листьях любистока лекарственного. Методом тонкослойной хроматографии было установлено наличие олеаноловой кислоты во всех исследуемых образцах. Оценку количественного содержания суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили методом прямой спектрофотометрии на приборе *Spesord* при длине волны 310 нм. Показано, что содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту составляет для травы 1,578–1,586%, а для листьев – 1,827–1,836%.

Ключевые слова: любисток лекарственный, листья любистока, тритерпеновые сапонины, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия

Очевидная необходимость расширения ассортимента лекарственных средств растительного происхождения вызывает в научной среде интерес к поиску дополнительных источников получения лекарственного растительного сырья. Внимание ученых все чаще привлекают ранее не использовавшиеся в официальной медицине части пищевых растений. Получены интересные данные о возможности внедрения

в медицинскую практику таких растительных объектов, как листья яблони лесной и домашней [1–3], листья персика [4,5], винограда [6], терна [7], аронии черноплодной [8].

На наш взгляд, перспективным источником получения новых лекарственных средств могут стать листья любистока лекарственного, применяемого в РФ в качестве пряности, стандартизация которого осуществляется как свежей овощной зеленой культуры в соответствии с требованиями ГОСТ 34313-2017 «Зеленые культуры овощные свежие». При этом анализ данных научной литературы свидетельствует о существенном содержании в надземной части любистока лекарственного ценных биологически активных веществ, обеспечивающих разнообразную фармакологическую активность сырья [13]. Учитывая имеющиеся литературные данные о высокой фармакологической активности веществ, относящихся к классу тритерпеновых сапонинов, актуальным является проведение исследований, направленных на оценку содержания их в листьях любистока лекарственного.

Цель исследования – изучение качественного состава и количественное определение сапонинов в листьях любистока лекарственного, культивируемого в Московской области, а также реализуемого в качестве пряности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом нашего исследования стали листья любистока лекарственного, заготовленные от культивируемых растений в экологически благополучных районах Московской области, а также свежее и высушенное сырье, реализуемое в качестве пряности в продуктовых сетях г. Москвы. Листья собирали в летний период 2021 г. Сушка сырья проводилась воздушно-теневым методом. Высушенное сырье подвергали измельчению на аналитической мельнице Ika (Германия).

Для проведения качественных реакций использовали водные извлечения из анализируемого сырья и осуществляли качественные реакции: пенообразования, с раствором свинца ацетата, спиртовым раствором холестерина, реакцию Лафона [9].

Для подтверждения полученных результатов качественных реакций в дальнейшем идентификацию соединений, относящихся к тритерпеновым сапонидам, проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках Мерс в системах растворителей, наиболее широко используемых при качественном анализе сапонинов [10]. Пробоподготовка включала выделение биологически активных веществ из измельченных листьев любистока 70% спиртом этиловым в соотношении «сырье – экстрагент» 1:10. Для последующего качественного определения агликонов тритерпеновых 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%), воды дистиллированной в соотношении по объему 3,5:1:5,5, после чего нагревали в круглодонной колбе в течение

120 минут. По окончании времени гидролиза полученную смесь разводили водой дистиллированной и отделяли выпавший при разбавлении осадок. Полученный осадок растворяли в спирте этиловом 95%. В качестве свидетеля нами использовался СО кислоты олеаноловой (Oleanolic acid analytical standart, АК Scientific, США).

В качестве проявителя применяли раствор кислоты фосфорновольфрамной 20% в спирте этиловом 95%. Зоны адсорбции веществ тритерпеновой природы и СО должны окрашиваться в розовый цвет.

Учитывая широкий опыт использования метода спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья, быстроту, эффективность и экономическую привлекательность [11], в качестве метода оценки количественного содержания тритерпеновых сапонинов в траве и листьях любистока лекарственного исследуемых видов нами был выбран данный метод.

Оценку количественного содержания тритерпеновых сапонинов в извлечениях из листьев любистока осуществляли методом УФ-спектрофотометрии по окончании взаимодействия веществ с кислотой серной концентрированной, в результате которого происходит протонирование тритерпенового цикла с формированием карбокатиона по месту локализации непредельной связи, а в случае присутствия у С-28 карбоксильной группы осуществляется последующее формирование лактона. Максимум поглощения продукта реакции наблюдается при длине волны 310 нм.

С целью проведения спектрофотометрического анализа из образцов сырья получали извлечения пятикратной экстракцией точных навесок предварительно измельченного сырья спиртом этиловым 70% на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Отобраные 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 спирте этиловом 95% и переносили в мерную колбу емкостью 25 мл. К 1 мл полученного раствора приливали 4 мл кислоты серной концентрированной, оставляли на 15 минут и проводили измерение оптической плотности на спектрофотометре Specord в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм в диапазоне длины волн 220–400 нм. В качестве раствора сравнения использовалась кислота серная концентрированная. Параллельно осуществлялась оценка значений оптической плотности стандартного раствора олеаноловой кислоты, получаемого растворением 0,0004 г (точная навеска) олеаноловой кислоты в 10 мл спирта этилового 95%.

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую в исследуемых образцах сырья любистока 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 любистока; A_0 – значение оптической плотности раствора кислоты олеаноловой; m_0 – масса

кислоты олеаноловой; m_x – масса исследуемых листьев любистока; W – влагосодержание сырья.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Качественные реакции на сапонины дали положительный результат со всеми исследуемыми образцами. Результаты анализа представлены 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. Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов спиртовых извлечений из листьев и травы любистока представлены в табл. 2.

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 в табл. 3.

В ходе статистической обработки данных пяти параллельных измерений по всем исследуемым объектам было выявлено, что содержание суммы тритерпеновых сапонинов

Таблица 1

РЕЗУЛЬТАТЫ КАЧЕСТВЕННЫХ РЕАКЦИЙ НА САПОНИНЫ В ИЗВЛЕЧЕНИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ ЛЮБИСТОКА

Проводимая реакция	Ожидаемый результат
Реакция пенообразования в кислой и щелочной среде	Образование пены, равной по объему и стойкости
Реакция с раствором свинца ацетата	Образование желтовато-бежевого творожистого осадка
Реакция Лафона	Образование зеленого осадка
Реакция со спиртовым раствором холестерина 1%	Образование коричневатого осадка

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРИТЕРПЕНОВЫХ САПОНИНОВ
В СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ И ТРАВЫ ЛЮБИСТОКА**

Исследуемый образец	Система растворителей	Хроматограмма после проявления раствором 20% серной кислоты		Значение Rf пятна, совпадающее с Rf СО олеаноловой кислоты
		Цвет пятен в видимом свете	Цвет пятен после нагревания в сушильном шкафу	
Спиртовое извлечение листьев любистока	Хлороформ – спирт этиловый 96% – вода дистиллированная (13:6:1)	бесцветный	малиновый	0,46
	Н-бутанол – кислота уксусная – вода дистиллированная (10:3:5)	бесцветный	розовый	0,68
	Бензол – ацетон (3:1)	бесцветный	розово-вишневый, постепенно переходящий в голубой	0,50
Спиртовое извлечение травы любистока	Хлороформ – спирт этиловый 96% – вода дистиллированная (13:6:1)	бесцветный	фиолетовый	0,47
	Н-бутанол – кислота уксусная – вода дистиллированная (10:3:5)	бесцветный	розовый	0,67
	Бензол – ацетон (3:1)	бесцветный	Розовый, постепенно переходящий в голубой	0,49

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ САПОНИНОВ В ПЕРЕСЧЕТЕ НА ОЛЕАНОЛОВУЮ КИСЛОТУ В ИЗВЛЕЧЕНИЯХ ИЗ ЛИСТЬЕВ И ТРАВЫ ЛЮБИСТОКА

Объект исследования	Содержание суммы сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую, %	Метрологические характеристики
Листья любистока	1,829 1,836 1,831 1,827 1,833	$X_{ср} = 1,8312$ $S^2 = 0,003493$ $S = 0,001559$ $P = 0,95$ $t(P, f) = 2,78$ $\Delta x = 0,004335$ $E = 0,2367\%$
Трава любистока	1,584 1,579 1,578 1,582 1,586	$X_{ср} = 1,5818$ $S^2 = 0,003347$ $S = 0,001494$ $P = 0,95$ $t(P, f) = 2,78$ $\Delta x = 0,004153$ $E = 0,2625\%$
Измельченная трава любистока промышленной фасовки	1,531 1,537 1,539 1,532 1,538	$X_{ср} = 1,5354$ $S^2 = 0,003647$ $S = 0,001628$ $P = 0,95$ $t(P, f) = 2,78$ $\Delta x = 0,004526$ $E = 0,2947$

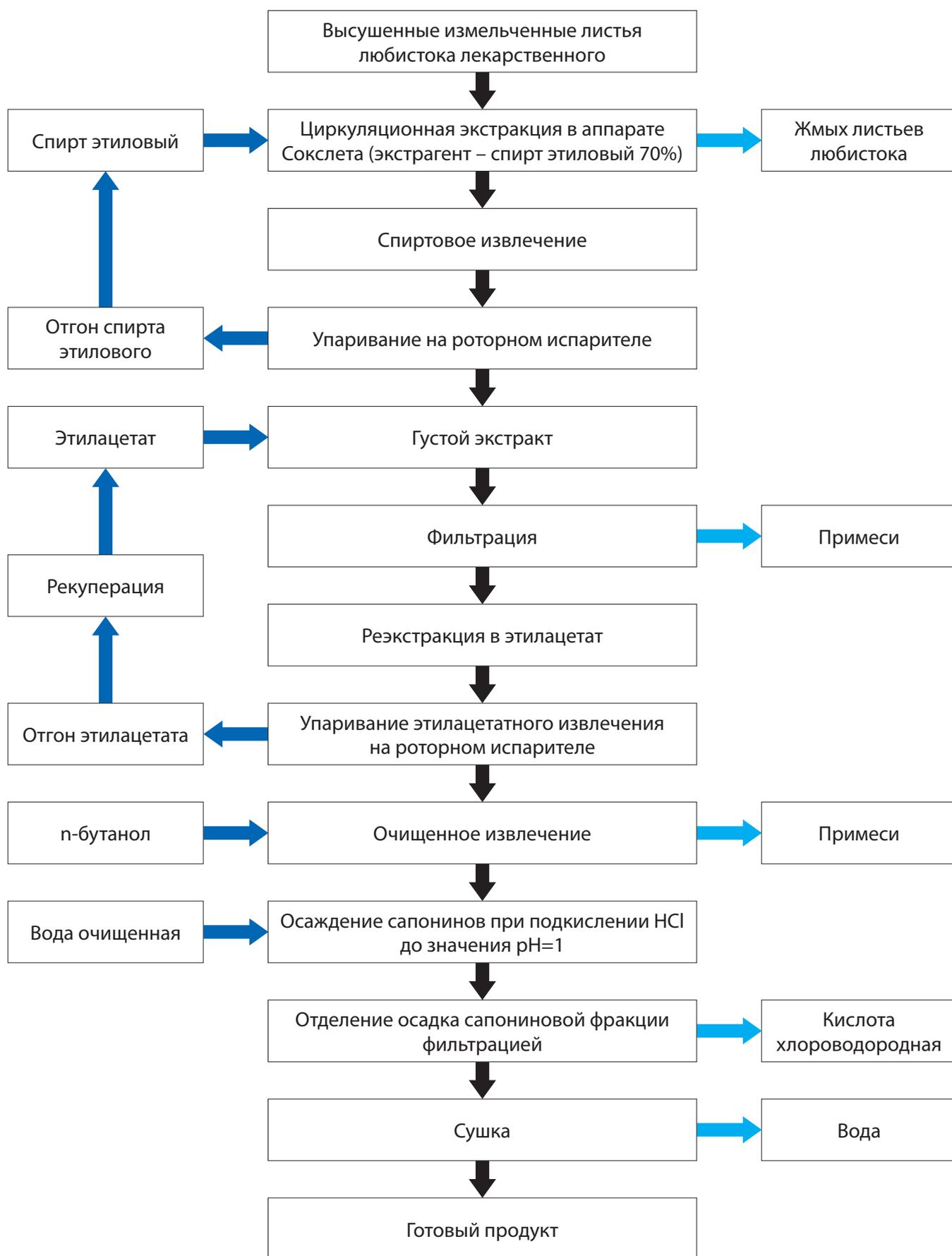


РИС. 1. Технологическая схема получения экстракта, обогащенного тритерпеновыми сапонинами

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ САПОНИНОВ В ПЕРЕСЧЕТЕ НА ОЛЕАНОЛОВУЮ КИСЛОТУ В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ ЛИСТЬЕВ ЛЮБИСТОКА

Объект исследования	Содержание суммы сапонинов в пересчете на кислоту олеаноловую, %	Метрологические характеристики
Сухой экстракт листьев любистока	14,341	$\bar{X}_{ср} = 14,3318$ $S^2 = 0,009884$ $S = 0,004413$ $P = 0,95$ $t(P, f) = 2,78$ $\Delta x = 0,012267$ $E = 0,0855$
	14,329	
	14,316	
	14,338	
	14,335	

в пересчете на кислоту олеаноловую составляет для травы 1,578–1,586%, а для листьев – 1,827–1,836%. Ошибка единичного измерения колеблется от 0,24 до 0,3% в зависимости от исследуемого сырья.

Для получения экстракционного препарата, обогащенного фракцией тритерпеновых сапонинов, нами использовалась методика, описанная в литературе [12]. Измельченные листья любистока помещали в экстрактор аппарата Сокслета и заливали 70% спиртом этиловым в соотношении «сырье – экстрагент» 1:5. Извлечение биологически активных веществ осуществляли при 55°C. Полноту извлечения контролировали по обесцвечиванию получаемых сливов. Объединенные извлечения упаривали на вакуумно-ротационном испарителе. Полученный густой экстракт последовательно промывали этилацетатом (1:10) (ГОСТ 8981–78) и н-бутанолом (1:20) (ГОСТ 6006–78). При последующем подкислении кислотой хлористоводородной концентрированной получали осадок, который отфильтровывали и сушили в течение суток. Технологическая схема получения экстракта, обогащенного тритерпеновыми сапонинами, представлена на рис. 1.

Результаты определения суммарного содержания сапонинов в сухом экстракте представлены в табл. 4.

ВЫВОДЫ

В ходе проведенных исследований листьев и травы любистока, заготовленных от культивируемых сортовых растений Московской области, а также образцов измельченной травы промышленной фасовки выявлено содержание веществ сапониновой природы, преимущественно тритерпенового ряда. При разделении сапонинов методом тонкослойной хроматографии из спиртоводных извлечений листьев и травы любистока выявлены вещества тритерпеновой природы, среди которых сравнением полученных значений Rf 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 травы 1,578–1,586%, а для листьев – 1,827–1,836%. Листья любистока были использованы для получения сухого экстракта, в котором сумма тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту составила 14,316–14,341%.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Нестерова Н.В., Самылина И.А. Сравнительная оценка суммарного содержания дубильных веществ в листьях яблони лесной и домашней зимних сортов [Текст] / Научные исследования: теория, методика и практика: материалы Междунар. науч.-практ. конф. (Чебоксары, 21 мая 2017 г.). В 2 т. Т. 1 / редкол.: О.Н. Широков и др. – Чебоксары: ЦНС «Интерактив плюс», 2017, с. 94–96.
2. Нестерова Н.В., Самылина И.А., Бобкова Н.В., Кузьменко А.Н., Краснюк (мл.) И.И. Количественное определение гидроксикоричных кислот и анализ динамики их накопления в листьях яблони лесной [Текст] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия ИФ. 2019. Т. 60. №1, с. 60–64.
3. Нестерова Н.В., Самылина И.А., Кузьменко А.Н., Кузьменко И.А., Краснюк (мл.) И.И., Евграфов А.А. Количественное определение арбутина в листьях яблони лесной методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [Текст] // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия ИФ. 2019. Т. 60. №1, с. 55–59.
4. Савенкова А.Б., Нестерова Н.В. Разработка показателей подлинности нового лекарственного растительного сырья – листья персика обыкновенного (*Prunus Persica*) / Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна – 2020», с. 341.
5. Савенкова А.Б., Нестерова Н.В. Разработка макро- и микродиагностических признаков в сырье листья персика обыкновенного *Persica Vulgaris* Mill. // Медико-фармацевтический журнал «Пульс». 2021. Т. 23. №1, с. 46–51.
6. Матвеева Е.С., Бирюкова Н.В., Нестерова Н.В. Анализ перспектив изучения листьев и плодов винограда культурного для составления нормативной документации на новые виды ЛРС / Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна – 2020», – 535 с.
7. Kondrashev S., Luzin A., Kochanov V., Matyushin A., Nesterova N., Luzina A. Qualitative And Quantitative Assay Of Hydroxycinnamates Of *Prunus Spinosa* L. // *Pharmacognosy Journal*. 2020. V. 12, №1, p. 157–161.
8. Черничкина А.Д., Нестерова Н.В., Бирюкова Н.В. Сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в листьях и плодах рябины обыкновенной (*Sorbus Aucuparia Fructus*) / Сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицинская весна – 2020», с. 292.
9. Ковалев В.Н., Попова Н.В., Кисличенко В.С. и др. Практикум по фармакогнозии: учебное пособие для вузов. – Харьков, 2004. – 512 с.
10. Федосеева Л.М., Дали Балтах Башар. Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской // Химия растительного сырья, 2016, №1. с. 181–184.
11. Марахова А.И., Федоровский Н.Н., Скалозубова Т.А., Аврач А.С., Сорокина А.А., Сергунова Е.В. Методологические подходы к использованию спектрофотометрии в анализе лекарственного растительного сырья // *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2011, №5, с. 34–41.
12. Хамама З., Хомик А.С., Суслина С.С., Савосина А.А., Радева Д.В. Разработка технологии получения сухого экстракта из околоплодников *Styrax officinalis* L. методом циркуляционной экстракции // Сборник научных трудов по итогам IV Международной научно-практической конференции – Актуальные проблемы и достижения в медицине. – Самара. 2017, с. 110–113.
13. Ваулина К.И., Нестерова О.В. Исторический опыт и перспективы использования любистока лекарственного (*Levisticum officinale* Koch.) в медицине // Медико-фармацевтический журнал «Пульс», т. 21, №3, 2019, с. 49–51.

ANALYSIS OF TRITERPENE SAPONINS CONTENT IN GRASS OF LEVISTICUM OFFICINALE K.

K.I. Vulina, O.V. Nesterova

I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

The presence of triterpene saponins in leaves of leavisticum officinale is revealed by qualitative analysis. Oleanolic acid (OA) is detected in all test samples by thin-layer chromatography. The quantitative content of the sum of triterpene saponins in terms of oleanolic acid is evaluated by direct spectrophotometry (using «Specord», detection wavelength of 310 nm). The content of the sum triterpene saponins are determined in grass (1.578–1.586%, as OA) and leaves (1.827–1.836%, as OA).

Keywords: Levisticum officinale Koch., leaves of a Levisticum officinale K., triterpene saponins, thin-layer chromatography, spectrophotometry