

УДК 615.32; 615.07; 582

ИЗУЧЕНИЕ САПОНИНОВ КОРНЕЙ СОЛОМОЦВЕТА ДВУЗУБОГО

Т. Н. Нгуен^{1*}, М. Г. Ожигова¹

Резюме. Приведено исследование сапонинов корней соломоцвета двузубого (*Achyranthes bidentata* Blume) семейства амарантовых (Amaranthaceae), собранного во Вьетнаме. Соломоцвет двузубый – тропическое растение из семейства амарантовых, являющееся очень популярным лекарственным растением в Азии. В корнях соломоцвета двузубого обнаружен комплекс биологически активных веществ (БАВ), в который входят сапонины, экистероиды, полисахариды, алкалоиды и кумарины. В данной работе приведены качественный и количественный анализы сапонинов корней соломоцвета. В результате проведенных исследований установлено, что в корнях содержатся как минимум три сапонины преимущественно тритерпеновой группы, являющиеся производными олеаноловой кислоты. Методом спектрофотометрического анализа продуктов, полученных в результате реакции сапонинов с кислотой серной концентрированной, определено количественное содержание суммы сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту, которое составило $2,76 \pm 0,04\%$.

Ключевые слова: соломоцвет двузубый, корень, сапонины, олеаноловая кислота.

STUDY OF SAPONINS IN ROOTS OF *ACHYRANTHES BIDENTATA* BLUME

Т. N. Nguyen^{1*}, M. G. Ozhigova¹

Abstract. To study saponins from the roots of *Achyranthes bidentata* Blume (Amaranthaceae) were collected in Vietnam. *Achyranthes bidentata* is a tropical plant in the Amaranthaceae family, which is the most popular medicinal plant in Asia. A complex of biologically active substances (BAS) was found in the roots of *Achyranthes bidentata* Blume that included saponins, ecdysteroids, polysaccharides, alkaloids, and coumarins. In this study, qualitative and quantitative analysis of saponins of *Achyranthes* roots was carried out. As a result of the studies, it was found that the roots contain at least three saponins predominantly triterpene group, which are derivatives of oleanolic acid. By spectrophotometric analysis of products obtained as a result of the reaction of saponins with concentrated sulfuric acid, the quantity of the content of saponins was defined, equivalent to oleanolic acid is equaled $2,76 \pm 0,04\%$.

Keywords: *Achyranthes bidentata*, root, saponin, oleanolic acid.

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University of the Ministry of Healthcare, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

* адресат для переписки:
E-mail: nganbn1504@gmail.com

ВВЕДЕНИЕ

Соломоцвет двузубый – многолетнее травянистое растение, широко распространенное в восточноазиатских странах – Японии, Китае, Вьетнаме и Малаккском архипелаге. В России встречается на Дальнем Востоке, в Уссурийском крае [1].

Соломоцвет двузубый в качестве лекарства с древности используется в азиатской народной медицине для лечения различных заболеваний благодаря своим противовоспалительным, гипотензивным, диуретическим свойствам. Современными исследователями установлено, что соломоцвет двузубый обладает многими видами фармакологической активности – противовоспалительной, антибактериальной, иммуномодулирующей, антиоксидантной, антиостеопорозной, нейропротекторной и др. [2–6]. Водный экстракт *A. bidentata* ускоряет регенерацию нервов после травмы у кроликов. Фракцию полисахари-

дов *A. bidentata* возможно использовать в качестве нейропротектора для лечения поврежденных периферических нервов [2]. Экстракт корня *A. bidentata* эффективно предотвращает потери костной массы у крыс с удаленными яичниками и проявляет выраженный терапевтический эффект при лечении остеопороза [3]. Спиртовые экстракты из различных частей *A. bidentata* обладают высокой антибактериальной активностью и используются в качестве антибактериального средства, обладающего узким спектром активности [4]. Полисахариды корней активируют иммунную систему у старых мышей и крыс, обладают общеукрепляющим и тонизирующим действием [5]. Соломоцвет снижает содержание холестерина в крови, увеличивает тонус матки, замедляет ритм сердечных сокращений [6].

Во Вьетнаме соломоцвет двузубый включен в Государственную фармакопею IV издания [7]. Лекарственные препараты из этого растения наз-

начают при артритах, гипертонической болезни, атеросклерозе, мочекаменной болезни, гематурии, аменорее, воспалении слюнных желез, ларингитах [6, 8]. В китайской медицине корни этого растения применяют в качестве средства, восстанавливающего силы, а также как диуретическое, кровоостанавливающее, противовоспалительное средство. Используют как противоядие, наружно при заболеваниях кожи и ногтей. В Корее лекарства из корня этого растения используют при воспалительных процессах мочевого пузыря и уретры. В Японии отвары из корней *A. bidentata* применяют при артритах, ларингитах, гипертонии и атеросклерозе [8].

Корень соломоцвета двузубого содержит комплекс биологически активных соединений, таких как сапонины, экдистероиды, полисахариды, алкалоиды и кумарины [8, 9].

Противовоспалительное, противоревматическое, диуретическое и особенно гипотензивное фармакологическое действие связывают с наличием тритерпеновых сапонинов [10].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись корни соломоцвета двузубого, приобретенные в аптечной сети г. Ханой (Вьетнам), выпущенные в пачках фирмой VIET MEC (серия № 150, год сбора 2016).

Для определения наличия тритерпеновых сапонинов готовили водное и спиртовое извлечение [11].

Методика: 1,0 г воздушно-сухого измельченного сырья помещают в колбу объемом 50 мл, заливают 10 мл экстрагента и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После извлечения охлаждают под струей холодной воды и фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» в коническую колбу объемом 50 мл.

Наличие тритерпеновых соединений определяли в водных извлечениях с помощью реакции пенообразования [11].

Методика. Берут две пробирки с водным извлечением, в одну добавляют 5 мл раствора кислоты хлористоводородной 0,1 моль/л, в другую – 5 мл раствора натрия гидроксида 0,1 моль/л и сильно встряхивают. При наличии в сырье тритерпеновых сапонинов в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и устойчивости. Если сырье содержит сапонины стероидной группы, то в среде щелочи образуется пена, в несколько раз большая по объему и устойчивости [11].

Для подтверждения наличия тритерпеновых сапонинов, а также их агликонов осуществляли тонкослойную хроматографию на пластинках Sorbfil в различных системах растворителей: хлороформ – этилацетат (9:1), бензол – ацетон (3:1), н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) [12].

Методика получения извлечения сапонинов.

Извлечение биологически активных соединений из сырья получали с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70% [11].

Для определения агликонов сапонинов осуществляли гидролиз полученного выше извлечения: отбирали аликвоту объемом 5 мл и выпаривали под вакуумом досуха. Сухой остаток растворяли в 10 мл смеси для гидролиза. Смесь растворителей для гидролиза готовили, используя кислоту ледяную уксусную, кислоту хлористоводородную концентрированную, воду очищенную; для этого компоненты смешивали, соблюдая соотношение объемов (3,5:1:5,5), затем помещали в круглодонную колбу для гидролиза и нагревали на водяной бане в течение 2 ч с момента закипания бани. Затем гидролизную смесь разбавляли водой очищенной в соотношении 1:2, выпавший осадок отделяли фильтрованием через плотный бумажный фильтр «зеленная лента». Осадок на фильтре промывали водой очищенной, растворяли в 25 мл горячего спирта этилового 95%. После хроматографирования пластинки обрабатывали раствором кислоты серной 20%, высушивали в сушильном шкафу в течение 10 мин при температуре 100–105 °С. При этом на хроматографической пластинке проявлялись пятна фиолетового цвета.

В качестве свидетеля использовали стандартный образец (СО) кислоты олеаноловой (AK Scientific, США).

Определение содержания суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили по методике, основанной на способности поглощения продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра. В результате этой реакции тритерпеноиды протонируются по двойной связи с образованием карбокатиона в положении C-28 с последующей лактонизацией. При этом наблюдается характерный максимум поглощения при 310 нм [13].

Методика. Около 1,0 г измельченного воздушно-сухого сырья корней соломоцвета двузубого трехкратно экстрагируют спиртом этиловым 70% порциями по 15 мл по 1 часу на кипящей водяной бане с обратным холодильником в круглодонной колбе объемом 50 мл. Полученные извлечения фильтруют через бумажный фильтр «красная лента» и объединяют в мерную колбу объемом 50 мл, недостающий объем восполняют экстрагентом (раствор А). Далее из полученного извлечения отбирают аликвоту объемом 5 мл и выпаривают под вакуумом досуха. Гидролиз проводят по методике, описанной выше. Осадок на фильтре промывают очищенной водой, растворяют в 25 мл спирта этилового 95% и помещают в мерную колбу объемом 25 мл (раствор Б).

К 1 мл полученного раствора прибавляют 4 мл кислоты серной концентрированной, выдерживают 10 мин и определяют оптическую плотность на спектрофотометре Shimadzu UV-1240 в кюветах с толщиной поглощающего слоя 10 мм в области 220–450 нм. Раствор сравнения – кислота серная концентрированная.

Параллельно определяют оптическую плотность стандартного раствора олеаноловой кислоты в аналогичных условиях проведения эксперимента.

Приготовление раствора СО олеаноловой кислоты. Около 0,0052 г (точная навеска) СО кислоты олеаноловой переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте этиловом 95% и доводят объем раствора до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы сапонинов в корнях соломоцвета двузубого в пересчете на олеаноловую кислоту проводят 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 – оптическая плотность исследуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора СО олеаноловой кислоты; m_0 – масса СО олеаноловой кислоты в г; m_x – масса сырья в г; W – потеря в массе сырья при высушивании (5,88%).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате реакции пенообразования полученного извлечения с растворами гидроксида натрия и хлористоводородной кислотой в обеих пробирках образуется пена, равная по объему и устойчивости, что свидетельствует о наличии в корнях соломоцвета двузубого сапонинов преимущественно тритерпеновой структуры [11].

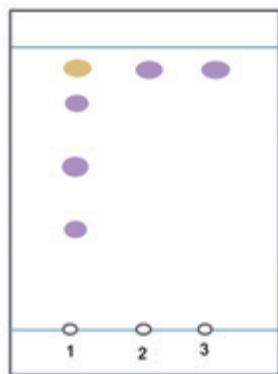


Рисунок 1. ТСХ-анализ. Система: н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5); пластинка Sorbfil, детекция – обработка раствором кислоты серной 20% с последующим нагревом в течение 10 мин при температуре 100–105 °С. Обозначения: 1 – спиртовое извлечение корней; 2 – спиртовое извлечение после гидролиза; 3 – СО кислоты олеаноловой

В результате проведения хроматографии в тонком слое сорбента наиболее четкое разделение пятен сапонинов наблюдалось в системе растворителей н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) (рисунок 1). После детекции хроматограмм спиртового извлечения проявлялось 4 пятна: одно коричневого и три фиолетового цвета со значениями R_f 0,44±0,01; 0,57±0,02; 0,78±0,01; 0,90±0,01. Извлечение после гидролиза на

хроматограмме проявлялось в виде одного пятна, совпадающего со стандартом олеаноловой кислоты по окраске (фиолетового цвета) и значению R_f (0,90±0,01), что позволяет предположить, что сапонины соломоцвета являются производными олеаноловой кислоты (таблица 1).

Таблица 1.

Результаты идентификации сапонинов корней соломоцвета двузубого методом ТСХ в системе н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) до и после гидролиза

№ пятна	R_f	Цвет пятна после обработки 20% раствором серной кислоты и нагревания		
		Спиртовое извлечение	Спиртовое извлечение после гидролиза	СО кислоты олеаноловой
1	0,90±0,01	коричневый	фиолетовый	фиолетовый
2	0,78±0,01	фиолетовый	–	–
3	0,57±0,02	фиолетовый	–	–
4	0,44±0,01	фиолетовый	–	–

Количественное определение суммы сапонинов проводили по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой в УФ-части спектра при 310 нм (рисунок 2) [12].

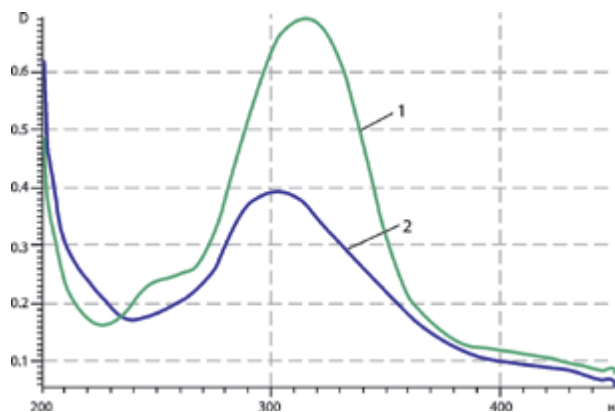


Рисунок 2. Спектры поглощения СО олеаноловой кислоты и сапонинов в корнях соломоцвета двузубого.

1 – СО кислоты олеаноловой; 2 – сапонины в корнях соломоцвета двузубого после гидролиза

В результате статистической обработки данных четырех параллельных измерений установлено, что общее содержание сапонинов в корнях соломоцвета двузубого в пересчете на олеаноловую кислоту составило 2,76±0,04%. Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 составила 1,27% (таблица 2).

Таблица 2.

Результаты количественного определения суммы
тритерпеновых сапонинов в пересчете
на олеаноловую кислоту

$X_i(\%)$	$X_{cp}-X_i$	$(X_{cp}-X_i)^2$	Метрологические характеристики
2,79	0,03	0,0009	$X_{cp}=2,76$ $S^2=6,3 \cdot 10^{-4}$ $S=0,025$ $P=0,95$ $t(P,f)=2,78$ $\Delta x=0,04$ $E=1,27\%$
2,76	0	0	
2,73	0,03	0,0009	
2,75	0,01	0,0001	
$X_{cp}=2,76$		$\Sigma=0,0019$	

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований установлено, что в корнях соломоцвета двузубого содержатся сапонины преимущественно тритерпеновой группы. При хроматографировании спиртоводного извлечения из корней в тонком слое силикагеля в системе растворителей н-бутанол – этанол – раствор аммиака 25% (7:2:5) после обработки раствором кислоты серной 20% с последующим нагревом в течение 10 мин при температуре 100–105 °С проявлялось 4 пятна: одно коричневого и три фиолетового цвета. После гидролиза в смеси кислоты ледяной уксусной, кислоты хлористоводородной концентрированной и воды очищенной на хроматограмме в тех же условиях проявлялось 1 пятно фиолетового цвета, совпадающее по окраске и значению R_f (0,90±0,01) со стандартом олеаноловой кислоты. На основании этого можно сделать вывод о том, что в корнях соломоцвета содержатся как минимум три сапонины, производных олеаноловой кислоты.

Количественное содержание суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту проводили методом прямой спектрофотометрии по методике, основанной на способности к поглощению продуктами реакции тритерпеновых сапонинов с концентрированной серной кислотой при длине волны 310 нм. Содержание сапонинов в корнях соломоцвета составило 2,76±0,04% при относительной ошибке 1,27% с доверительной вероятностью 0,95.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xirui H. et al. The genus *Achyranthes*: A review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities // Journal of ethnopharmacology 2017. V. 203. P. 260–278.
2. Cheng Qiong et al. Neurotrophic and neuroprotective actions of *Achyranthes bidentata* polypeptides on cultured dorsal root ganglia of rats and on crushed common peroneal nerve of rabbits // Neuroscience letters. 2014. № 562. P. 7–12.
3. He Cui-Cui et al. Osteoprotective effect of extract from *Achyranthes bidentata* in ovariectomized rats // Journal of ethnopharmacology. 2010. V. 2. № 127. P. 229–234.

4. P.U. Devi et al. Antibacterial, in vitrolipid peroxidation and phytochemical observation on *Achyranthes bidentata* Blume // Pakistan Journal of Nutrition. 2007. V. 6. № 5. P. 447–451.
5. Li Z. K., Li D. D. The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides // Yao xue xue bao – Acta pharmaceutica Sinica. 1997. V. 12. № 32. P. 881–887.
6. Do Tat Loi. Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam // NxbY Hoc. 2004. Trang 48–49.
7. Вьетнамская фармакопея. IV изд. 2010. С. 882.
8. Yanze L., Wang Z., Zhang J. Dietary Chinese Herbs. – Vienna: Springer. 2015. P. 45–48.
9. Marouf A. et al. Triterpene saponins from the roots of *Achyranthes bidentata* // Pharmaceutical biology. 2001. V. 4. № 39. C. 263–267.
10. Wang L., Zhu Y., Liao M. Therapeutic effects of saponins from *Achyranthes bidentata* in SHRsp // Zhongguo Zhong yao za zhi – China journal of Chinese materia medica. 2011. V. 9. № 36. P. 1239–1241.
11. Ковалев В. Н., Попова Н. В., Кисличенко В. С. и др. Практикум по фармакогнозии / Под общ. ред. Ковалева В. Н. – Харьков: Изд-во НФаУ; Золотые страницы. 2003. С. 512. [Kovalev V. N., Popova N. V., Kislichenko V. S. i dr. Praktikum po farmakognozii / Pod obshch. red. Kovaleva V. N. – Khar'kov: Izd-vo NfaU; Zolotyie stranitsy. [Workshop on pharmacognosy / Under the Society. Ed. Kovalev V. N. – Kharkov: Publishing house of NfaU; Golden Pages.] 2003. C. 512.]
12. Федосеева Л. М., Башар Д. Б. Изучение сапонинов в подземных органах ферулы хермонской // Химия растительного сырья. 2016. № 1. С. 181–184. [Fedoseeva L. M., Bashar D. B. Izuchenie saponinov v podzemnykh organakh feruly khermonskoi // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. [The study of saponins in the underground organs of the ferul of Hermon // Chemistry of plant raw materials.] 2016. № 1. S. 181–184.]
13. Писарев Д. И. и др. Сапонины и их определение в корневищах аралии маньчжурской в условиях Белгородской области // Химия растительного сырья. 2009. № 4. С. 197–198. [Pisarev D. I. i dr. Saponiny i ikh opredelenie v kornevishchakh aralii man'chzhurskoi v usloviyakh Belgorodskoi oblasti // Khimiya rastitel'nogo syr'ya. [Saponins and their determination in the rhizomes of Manchurian aralia in the conditions of the Belgorod region // Chemistry of plant raw materials.] 2009. № 4. S. 197–198.]