© Т.С. Попова, Н.С. Терёшина, 2015
УДК 615.322:582.717.7:581.141/.142]:547.918].074

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ САПОНИНЫ В ЛИСТЬЯХ И ПОЧКАХ ЧЕРНОЙ СМОРОДИНЫ

Т.С. Попова, **Н.С. Терёшина***, докт. фарм. наук

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова;
119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

***E-mail:** teryoshinan@mail.ru

Разработана методика спектрофотометрического количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин в листьях и почках черной смородины – *Ribes nigrum* L. на основе цветной реакции с серной кислотой. Чувствительность метода составляет 0,05 мг/мл, линейная зависимость соблюдается в интервале от 0,0005–0,004%. Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает ±4,0%. Содержание тритерпеновых сапонинов: в почках черной смородины – 2,01–2,22%, в листьях – 2,81–3,39%.

Ключевые слова: *смородина черная, Ribes nigrum L., листья, почки, тритерпеновые сапонины, спектрофотометрия, количественный анализ.*

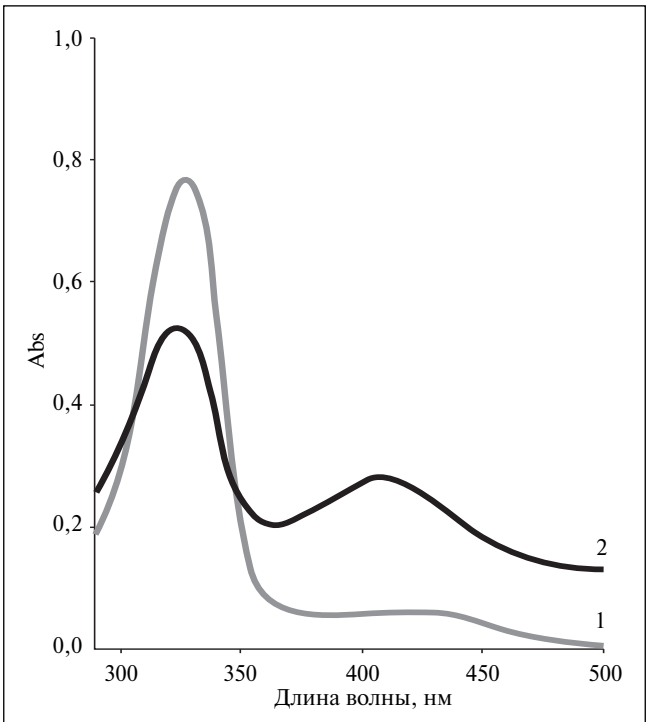
Листья и почки черной смородины (*Ribes nigrum* L.) используются в аллопатии, гомеопатии и народной медицине при лечении различных заболеваний, что обусловлено широким спектром биологически активных веществ, содержащихся в сырье. Ранее нами было проведено сравнительное изучение состава флавоноидов, аминокислот, эфирного масла, углеводов и катехинов в листьях и почках черной смородины; качественными реакциями и методом хроматографии в тонком слое сорбента установлено наличие в них тритерпеновых соединений [4–6].

Тритерпеновые сапонины широко распространены в растительном мире, они содержатся не менее чем в 70 семействах, причем более чем для 150 видов типичны. Некоторые из тритерпеновых сапонинов оказывают нежелательное действие на организм – вызывают гемолиз крови, что напрямую зависит от количества сапонинов [8]. В связи с этим в последнее время уделяется большое внимание оценке содержания сапонинов в лекарственном растительном сырье (ЛРС). Для количественного определения тритерпеновых сапонинов используются различные методы: ВЭЖХ, ТСХ, спектрофотометрия [9–12]. Указанные спектрофотометрические методики определения суммы сапонинов основаны на образовании с помощью различных реагентов (концентрированной серной кислотой, анисового альдегида в присутствии серной кислоты) окрашенных соединений [1–3,7,8].

Экспериментальная часть

Объектами исследования служили высушенные почки и листья черной смородины культурной, заготовленные в Московской, Тамбовской, Рязанской, Пермской областях в 2010–2014 гг.

Для количественного определения тритерпеновых сапонинов был выбран хроматоспектрофотометрический метод, в основе которого – свойство сапонинов давать окрашенные соединения при взаимодействии с кислотой серной концентрированной. В качестве стандарта использовали 0,005% раствор эсцина (02320 Fluka) в 95% этаноле. Измерение проводили с помощью регистрирующего спектрофотометра Cary 50. Максимум поглощения раствора эсцина (см. рисунок) регистрировался при длине вол-



Спектры поглощения продуктов реакции сапонинов с кислотой серной концентрированной: 1 – 0,005% раствор эсцина; 2 – извлечение из почек смородины

ны 325±3 нм; максимум поглощения извлечения из почек смородины совпадает с максимумом поглощения эсцина.

Калибровочная кривая зависимости между оптической плотностью и концентрацией эсцина носит линейный характер в интервале концентраций от 0,0005 до 0,004%. Чувствительность определения – 0,05 мг/мл эсцина. Был рассчитан удельный показатель поглощения продуктов реакции эсцина с кислотой серной концентрированной, который составил 222,450±2,085.

При разработке методики количественного определения суммы тритерпеновых сапонинов в ЛРС были изучены факторы, влияющие на экстракцию биологически активных веществ (БАВ) (табл. 1). Оптимальными условиями экстракции являются: измельченность сырья – 2 мм; экстрагент – 95% этиловый спирт, подкисленный кислотой хлористоводородной; соотношение сырья и экстрагента – 1:50; время экстракции – 60 мин на водяной бане при температуре 100°С (двухкратная экстракция 45 и 15 мин).

Методика. Около 2,0 г (точная навеска) почек или листьев черной смородины, измельченных до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 2 мм, помещают в круглодонную колбу, прибавляют 60 мл 95% этилового спирта, подкисленного кислотой хлористоводородной, и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 мин. После охлаждения до комнатной температуры содержимое колбы фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы сырье не попало на фильтр. К шроту в круглодонной колбе прибавляют 40 мл 95% этилового спирта, подкисленного кислотой хлористоводородной, и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 15 мин. Охлаждают и полученное извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Объем раствора в колбе доводят 95% этиловым спиртом, подкисленным кислотой хлористоводородной, до метки, перемешивают (раствор А).

2 мл раствора А помещают в выпарительную чашку и выпаривают на водяной бане досуха. После охлаждения остаток растворяют в 5 мл воды и помещают в колонку диаметром 1 см с 3,0 г алюминия оксида для хроматографии II степени активности. Выпарительную чашку, в которой проводилось выпаривание, промывают 5 мл воды и промывную воду помещают в ту же колонку.

Водный элюат, собранный с колонки, выпаривают на водяной бане досуха. Осадок после охлаждения количественно переносят с помощью 95% этилового спирта в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают (раствор Б).

В 2 пробирки с притертой пробкой отмеривают: в 1-ю пробирку – 2 мл 95% этилового спирта, во 2-ю – 2 мл раствора Б. В обе пробирки прибавляют по 8 мл кислоты серной концен-

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ НА ВЫХОД САПОНИНОВ ИЗ СЫРЬЯ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

Условия экстракции	Содержание сапонинов, %	
	почки	листья
Измельченность сырья, мм:		
5	1,87	1,87
3	2,17	2,31
2	2,42	2,81
1	2,42	2,80
Экстрагент:		
25% этанол, подкисленный HCI	1,91	1,90
40% этанол, подкисленный HCI	2,25	2,31
70% этанол, подкисленный HCI	2,37	2,39
96% этанол, подкисленный HCI	2,45	2,85
Соотношение сырье – экстрагент:		
1:50	2,47	2,87
1:100	2,41	2,43
1:200	1,95	1,91
1:250	1,83	1,81
Время экстракции, мин:		
15	1,77	1,79
30	2,34	2,35
60	2,48	2,84
90	2,47	2,75
Температурный режим:		
без нагревания	1,57	1,49
нагревание при 30°С	2,17	2,47
нагревание при 70°С	2,31	2,83
нагревание при 100°С	2,49	2,54
Кратность экстракции:		
двухкратная	2,43	2,85
трехкратная	2,41	2,87

Таблица 2

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОНИНОВ В ПОЧКАХ СМОРОДИНЫ

f	$\bar{X}$, мг	$S_{\bar{X}}$	P, %	T (p,f)	$\Delta\bar{X}$	A±%
9	2,42	0,041	95	2,26	0,093	3,84

трированной, закрывают пробкой и тщательно перемешивают. Через 30 мин измеряют оптическую плотность содержимого 2-й пробирки при длине волны 325±3 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм, используя в качестве раствора сравнения содержимое 1-й пробирки.

Содержание суммы сапонинов в пересчете на эсцин в абсолютно сухом сырье (почках или листьях черной смородины) в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 10 \times 100}{222{,}45 \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{D \times 25 \times 100}{222{,}45 \times a \times 2 \times (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; a – навеска сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, в %.

Для установления точности и воспроизводимости методики были проанализированы образцы почек смородины черной и проведена статистическая обработка результатов (табл. 2). Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышала ±4,0%. Отсутствие систематической ошибки было доказано методом добавок стандарта эсцина (табл. 3).

С помощью разработанной методики были проанализированы образцы листьев и почек смородины черной, в частности содержание сапонинов в почках смородины колебалось от 2,01 до 2,92%; в листьях – от 2,81 до 3,39% (табл. 4).

Таблица 3

РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ САПОНИНОВ В ПОЧКАХ СМОРОДИНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ ДОБАВОК

№ образца	Найдено сапонинов, г/100 г сырья	Добавлено эсцина, г	Должно быть, г	Найдено, г	Относительная ошибка, %
1	2,01	1,50	3,51	2,60	+2,56
2	2,42	2,21	4,63	4,55	-1,73
3	2,44	2,22	4,66	4,50	-3,43
4	2,84	0,71	3,55	3,65	+2,81

Таблица 4

СОДЕРЖАНИЕ САПОНИНОВ В ПОЧКАХ И ЛИСТЬЯХ СМОРОДИНЫ ЧЕРНОЙ

№ образца	Содержание сапонинов, %	
	почки	листья
1	2,01	2,81
2	2,42	2,94
3	2,44	3,04
4	2,84	3,17
5	2,92	3,39

Выводы

1. Разработана спектрофотометрическая методика количественного определения тритерпеновых сапонинов в почках и листьях черной смородины, основанная на взаимодействии сапонинов с кислотой серной концентрированной и измерении оптической плотности с помощью спектрофотометра при длине волны 325±3 нм. Относительная ошибка определения при доверительной вероятности 0,95 не превышает ±4,0%.

2. Содержание тритерпеновых сапонинов в почках черной смородины колеблется от 2,01 до 2,92%, в листьях – от 2,81 до 3,39%.

ЛИТЕРАТУРА

1. Деста Ильма, Оганесян Э.Т., Беликов В.Г. Использование реакции тритерпеноидов с концентрированной серной кислотой в анализе олеаноловой кислоты в препарате «Сапарал». Изучение препаратов растительного и животного происхождения. Томск, 1978; 82–83.

2. Наумова О.А., Попов Д.М. Содержание сапонинов в плодах бархата амурского. Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике. Ярославль, 2014; 143–158.

3. Попов Д.М., Борисова Д.А. Разработка методик анализа сапонинов в листьях, цветках, траве и корневищах первоцвета лекарственного. Инновационные процессы в лекарствоведении. Ярославль, 2012; 253–258.

4. Попова Т.С., Терёшина Н.С. Использование черной смородины и химический состав сырья. Гомеопатический ежегодник, 2015; 197–202.

5. Попова Т.С., Терёшина Н.С. Сравнительное качественное и количественное определение углеводов в почках и листьях черной смородины. Фармация, 2013; 8: 10–13.

6. Попова Т.С., Терёшина Н.С. Сравнительное исследование аминокислотного состава почек и листьев черной смородины (*Ribes nigrum* L.). Вопросы обеспечения качества лекарственных средств, 2013; 2.

7. Писарев Д.И., Мартынова Н.А., Нетребенко Н.Н., Новиков О.О., Сорокопудов В.Н. Сапонины и их определение в корневищах аралии маньчжурской в условиях Белгородской области. Химия растительного сырья, 2009; 4: 197–198.

8. Химический анализ лекарственных растений (под ред. Гринкевич Н.И., Сафронич Л.Н.). М.: Высшая школа, 1983; 186.

9. Ing-Luen S., Tzenge-Lien S., Ya-Nang W., Hsin-Tai C., Haw-Farn L., Han Chien L. et al. Quantification for saponin from a soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn) in cleaning products by a chromatographic and two colorimetric assays. J. Fac. Agr., 2009; 54: 215–221.

10. Jinlan Zhang, Feng Qu Methods for Analysis of Triterpenoid Saponins. Natural Products, 2013; 3311-3323. Режим доступа: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-22144-6_180#page-1.

11. Uematsu Y., Hirata K., SaitoK., Kudo I. Spectrophotometric determination of saponin in Yucca extract used as food additive. Journal Association of Official Analytical Chemists, 2000; 83. (6): 1451–1454.

12. Vador N., Vador B. Simple spectrophotometric methods for standardizing ayurvedic formulation. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012; 74. (2): 161–163.

Поступила 29 марта 2015 г.

TRITERPENIC SAPONINS IN THE LEAVES AND BUDS OF BLACKCURRANTS (*RIBES NIGRUM* L.)

T.S. Popova; N.S. Teryoshina, PhD
I.M. Sechenov First Moscow State Medical University; 8, Trubetskaya St., Build. 2, Moscow 19991

SUMMARY

Much attention has been recently given to the estimation of saponins in medicinal plant material, as triterpenic saponins have a negative effect on humans. To determine this group of biologically active substances in the leaves and buds of blackcurrants (*Ribes nigrum* L.), a procedure has been developed for the spectrophotometric determination of the sum of triterpenic saponins calculated with reference to escin, by carrying out a color reaction with sulfuric acid. The sensitivity of the method is 0.05 mg/ml; a linear relationship is observed in the range of 0.0005 to 0.004%. The relative error of determination at 0.95 confidence probability is not greater than ±4.0%. The content of triterpenic saponins in the buds and leaves of blackcurrants is 2.01–2.22 and 2.81–3.39%, respectively.

Key words: blackcurrants (*Ribes nigrum* L.), leaves, buds, triterpenic saponins, spectrophotometry, assay.

REFERENCE

1. Desta Ilma, Oganesyan E.T., Belikov V.G. Using triterpenoids reaction with concentrated sulfuric acid in the assay of oleanolic acid in the formulation «Saparal». The study of drugs of plant and animal origin. Tomsk, 1978; 82–83 (in Russian).

2. Naumova O.A., Popov D.M. The content of saponin in the fruit Amur velvet. State and prospects of optimization and efficiency in pharmacognosy, technology, clinic. Yaroslavl, 2014; 143–158 (in Russian).

3. Popov D.M., Borisova D.A. The development of methods of analysis of saponins in the leaves, the flowers, the grass and primrose medicinal rhizomes. Innovative processes in pharmacology. Yaroslavl, 2012; 253–258 (in Russian).

4. Popova T.S., Tereshina N.S. The use of black currant and chemical composition of raw materials. Homeopathic Yearbook 2015; 197–202 (in Russian).

5. Popova T.S., Tereshina N.S. Comparative qualitative and quantitative determination of carbohydrates in the buds and leaves of black currant. Farmatsiya, 2013; 8: 10–13 (in Russian).

6. Popova T.S., Tereshina N.S. A comparative study of the amino acid composition of buds and leaves of black currant (*Ribes nigrum* L.). Quality assurance of medicines 2013; 2 (in Russian).

7. Pisarev D.I., Martynova N.A., Netrebenko N.N., Novikov O.O., Sorokopudov V.N. Saponins and their definition in the rhizomes aralia in conditions of the Belgorod region. Chemistry of plant raw materials, 2009; 4: 197–198 (in Russian).

8. Chemical analysis of medicinal plants (ed. Grinkevich N.I., Safronich L.N.). Moscow: Visshaiya shkola, 1983; 186 (in Russian).

9. Ing-Luen S., Tzenge-Lien S., Ya-Nang W., Hsin-Tai C., Haw-Farn L., Han Chien L. et al. Quantification for saponin from a soapberry (*Sapindus mukorossi* Gaertn) in cleaning products by a chromatographic and two colorimetric assays. J. Fac. Agr., 2009; 54: 215–221.

10. Jinlan Zhang, Feng Qu Methods for Analysis of Triterpenoid Saponins. Natural Products, 2013; 3311-3323. Режим доступа: http://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-22144-6_180#page-1.

11. Uematsu Y., Hirata K., SaitoK., Kudo I. Spectrophotometric determination of saponin in Yucca extract used as food additive. Journal Association of Official Analytical Chemists, 2000; 83. (6): 1451–1454.

12. Vador N., Vador B. Simple spectrophotometric methods for standardizing ayurvedic formulation. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2012; 74. (2): 161–163.