

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КАЧЕСТВЕННОГО СОСТАВА ТРИТЕРПЕНОВЫХ ГЛИКОЗИДОВ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ *PATRINIA INTERMEDIA* БЕЛОРУССКОЙ ИНТРОДУКЦИИ И ИХ СУММАРНОГО СОДЕРЖАНИЯ

Демид Д.И., Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Курман П.В., Петров П.Т.

Институт биоорганической химии НАН Беларуси, Республика Беларусь

Объектом исследования является растительное сырье *Patrinia intermedia* (Hornem.) Roem. et Schult белорусской интродукции. Для анализа использовались подземная и надземная части растений, различных сроков вегетации, выращенные в Центральном ботаническом саду НАН Беларуси [1]. По литературным данным основное действующее вещество патринии средней - тритерпеновые гликозиды - относятся к эфирам типа ацеталей и состоят из агликона - олеаноловой кислоты - и сахаров [2].

На первом этапе исследования биологически активных веществ растительного сырья патринии средней белоруской интродукции была разработана схема выделения тритерпеновых гликозидов в интактном виде. Существенное значение для выделения комплекса активных веществ имеет выбор оптимального экстрагента. Экстрагент должен обладать избирательностью действия, хорошо смачивать растительный материал, не вступать в химические реакции с биологически активными веществами и не изменять их фармакологических свойств. Для выделения гликозидов из растительного сырья используют воду или разбавленные спирты [3].

Для стандартизации растительного сырья (корней и корневищ) патринии необходимо было определить количественное содержание комплекса биологически активных веществ в экстрактах в виде тритерпеновых сапонинов олеаноловой кислоты, которые обуславливают седативный и анксиолитический эффекты [4].

Определено содержание тритерпеновых сапонинов (производных олеаноловой кислоты) в различном растительном сырье Патринии средней. Из таблицы 1 видно, что прослеживается зависимость накопления от возраста (патриния средняя является многолетним растением: чем больше продолжительность жизни растения, тем выше содержание в корневищах биологически активных соединений, в том числе и сапонинов, которые обуславливают фармакологическую активность патринии средней). Из результатов следует, что для достижения удовлетворительного уровня активных веществ сроков выращивания в 1-2 года недостаточно.

Таблица 1. Кинетика накопления сапонинов в растительном сырье патр.ср.

| Вид растительного сырья патринии средней | Масса раст. сырья, взятая для анализа, г | Содержание суммы сапонинов, % |
|--|--|-------------------------------|
| Корневища с корнями (однолетнее) | 2,0 | 6,2 |
| Корневища с корнями (двухлетнее) | 2,0 | 7,4 |
| Корневища с корнями (третий год вегетации) | 2,0 | 10,9 |
| Семена | 2,0 | 5,6 |
| Верхняя надземная часть (второй год вегетации) | 2,0 | 2,2 |

Представленные данные свидетельствуют о том, что подземные органы (корневища с корнями) патринии наиболее интенсивно накапливают активные вещества, при этом удельное содержание активных ингредиентов зависит от возраста растения. Наименьшее накопление тритерпеновых сапонинов характерно для надземной части растения, включая стебель и листья.

Дополнительно очищенные этанольные экстракты в дальнейшем использовали для изучения компонентного состава активных веществ методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

Интерпретация полученных экспериментальных данных позволяет сделать вывод о том, что основным агликоном гликозидов, содержащихся в экстракте корней *Patrinia intermedia*, является олеаноловая кислота, которая представлена на масс-спектре в виде двух фрагментов дериватизатов. В небольших количествах присутствует также гедерагенин. На хроматограмме наблюдается пик с RT=40,15 минут, который по расшифровке масс-спектра относится к 3x-TMSi-деривату гедерагенина.

Таблица 2. Относительные интенсивности основных ионов в масс-спектре и соответствие этих ионов фрагментам структуры компонента с RT=38,340 минут.

| m/z, Da | % | Фрагмент структуры |
|---------|-------|--|
| 73 | 32,6 | Si(CH ₃) ₃ |
| 203 | 100,0 | Фрагмент структуры 2 |
| 279 | 4,5 | Структура-1 (см. рисунок 3.5) |
| 320 | 22,5 | Структура-2 (см. рисунок 3.5) |
| 482 | 10,4 | M-Si(CH ₃) ₃ OOCH |
| 585 | 2,8 | M-CH ₃ |
| 600 | 1,3 | M ⁺ |

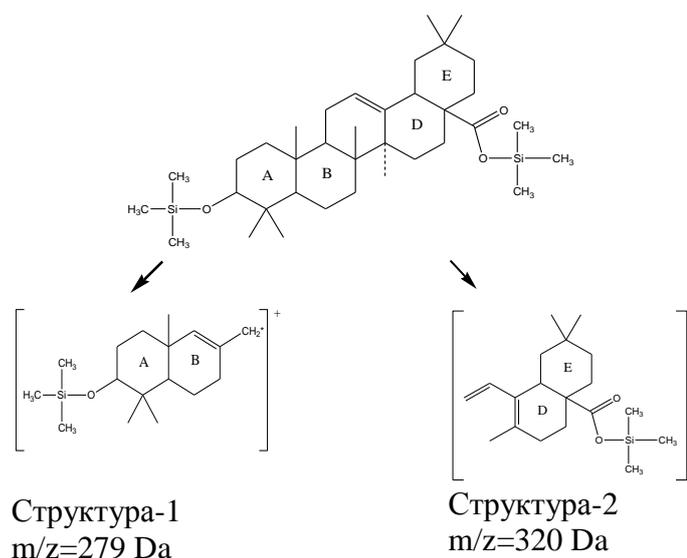


Рисунок 1. Схема фрагментации дериватизата олеаноловой кислоты

Также выполнено определение шести углеводов в липофильной фракции гидролизата сухого бутанольного экстракта *Patrinia intermedia*. Результаты количественного анализа триметилсилильных производных компонентов экстракта методом газовой хроматографии / масс-спектрометрии представлены в таблице 3.

Таблица 3. Относительное содержание (w/w) шести исследованных углеводов в липофильной фракции гидролизата сухого бутанольного экстракта *Patrinia intermedia*.

| Рамноза (Rhamnose) | Глюкоза (Glucose) | Рибоза (Ribose) | Арабиноза (Arabinose) | Ксилоза (Xylose) | Галактоза (Galactose) |
|--------------------|-------------------|-----------------|-----------------------|------------------|-----------------------|
| 10,4 | 14,1 | 1,5 | 1,0 | 1,6 | нет |

Образцы сухих бутанольных экстрактов *Patrinia intermedia* были проанализированы с использованием жидкостного хроматографа Agilent 1200 Rapid Resolution HPLC с масс-детектором Agilent 6410 Triple Quad («тройной квадруполь») и диодно-матричным детектором (рис. 2).

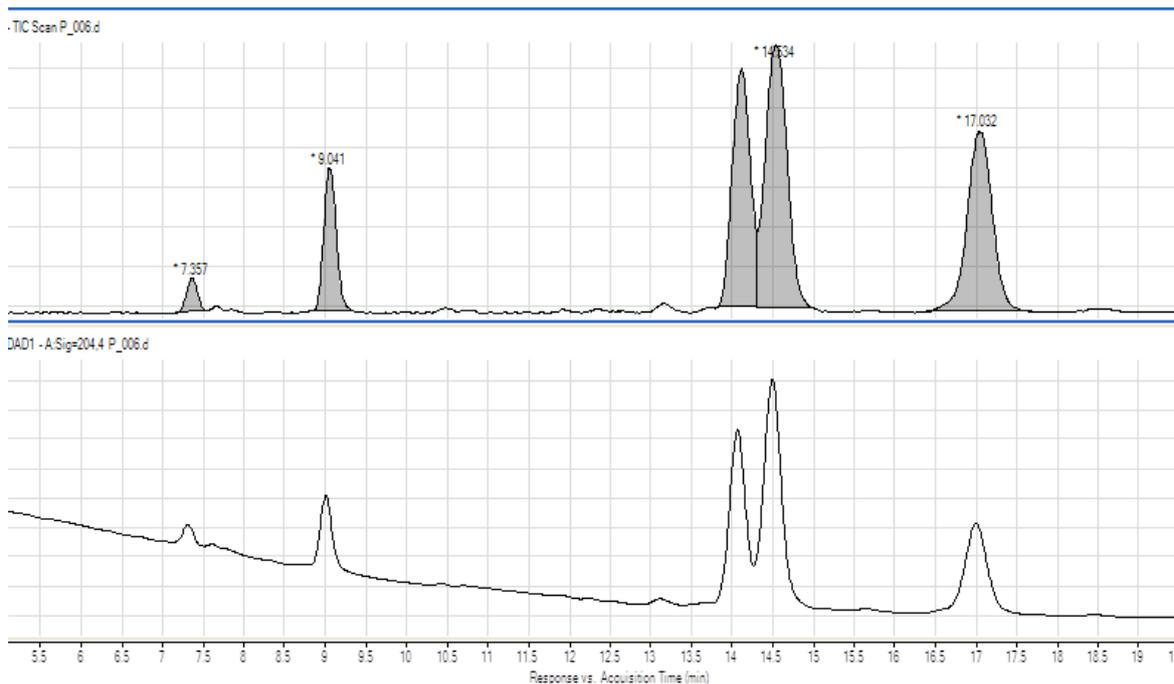


Рисунок 2. Фрагмент хроматограммы водного раствора сухого бутанольного экстракта корней *Patrinia intermedia* (1 мг/мл) в режиме регистрации общего ионного тока отрицательных ионов (вверху) и сигнал диодно-матричного детектора (внизу).

Согласно литературным данным [5-12] полученные результаты были интерпретированы следующим образом:

1. Ион с $m/z=1303$ соответствует $[M-H]^-$. Отсюда $M=1304$ Da.
2. Ион с $m/z=865$ соответствует $[M-438-H]^-$. По механизму фрагментации ионов гликозидов углеводный мономер отрывается в виде дегидратированной частицы с массой 132 (*пентозы*: ксилоза, рибоза, арабиноза), 146 (*деоксигексозы*: рамноза), 162 (*гексозы*: глюкоза, галактоза), 176 (глюкуроновая кислота) и др. [10]. Таким образом, $[M-438-H]^- = [M-(146+146+146)-H]^-$. Элиминирование фрагмента с массой 438 наблюдается для всех пяти исследованных гликозидов олеаноловой кислоты (рисунок 3.3 и рисунок 3.5) и подтверждается данными CID (режим столкновительно-индуцированной диссоциации) (см. ниже). Это свидетельствует о наличии звена из трех рамноз при C-28 агликона, поскольку сложноэфирная связь разрушается легче, чем O-гликозидные связи.
3. Ионы с $m/z=640$ (двухзарядный), 1189 и 1785- кластерные, в том числе с участием компонентов подвижной фазы.

4. Конечным продуктом фрагментации ионов в режиме CID является ион с $m/z=455$, что соответствует аниону олеаноловой кислоты.

5. В следовых количествах регистрируется гликозид, в котором агликоном является гедерагенин, $m/z=471$. Так, $(471+132=603+146=749+132=881)$.

Вся совокупность полученных экспериментальных результатов позволила предложить следующие химические структуры пяти гликозидов олеаноловой кислоты в корнях растения патриния средняя (Root Saponin RS1÷RS5). На рисунке 3 представлена общая структура гликозида олеаноловой кислоты, где в качестве заместителей R_1 выступают различные остатки сахаров, представленные в таблице 4, заместитель R_2 представляет собой -Rha-Rha-Rha.

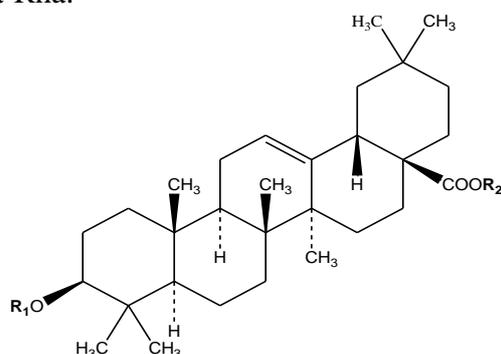


Рисунок 3. Структура гликозида олеаноловой кислоты

Таблица 4. Предлагаемая структура тритерпеновых гликозидов олеаноловой кислоты.

| Условное обозначение гликозида | Химическая формула | Молекулярная масса, Da | | R_1 |
|--------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------------------|------------------|
| | | Точная MW | Рассчитанная из формулы MW | |
| RS1 | $C_{64}H_{104}O_{27}$ | 1305,48 | 1304 | -Xyl-Rha-Xyl |
| RS2 | $C_{65}H_{106}O_{28}$ | 1335,51 | 1334 | -Glu-Rha-Xyl |
| RS3 | $C_{69}H_{112}O_{31}$ | 1437,59 | 1436 | -Xyl-Rha-Xyl-Xyl |
| RS4 | $C_{70}H_{114}O_{32}$ | 1467,62 | 1466 | -Xyl-Rha-Xyl-Glu |
| RS5 | $C_{71}H_{116}O_{33}$ | 1497,65 | 1496 | -Glu-Rha-Xyl-Glu |

Выводы:

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией установлено, что агликоном тритерпеновых сапонинов в корнях и корневищах *Patrinia intermedia* является олеаноловая кислота.

Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией выполнена идентификация патринозидов, содержащихся в корнях и корневищах *Patrinia intermedia*. Для *Patrinia intermedia* белорусской интродукции идентифицировано 5 тритерпеновых сапонинов, в то время, как для *Patrinia intermedia* естественного ареала произрастания характерно наличие только четырёх.

Методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии идентифицированы остатки сахаров в гликозиде олеаноловой кислоты для 5-ти патринозидов. Заместителем в положении R_2 является остаток из трёх рамноз. В качестве заместителя R_1 выступают следующие комбинации сахаров: -Xyl-Rha-Xyl, -Glu-Rha-Xyl, -Xyl-Rha-Xyl-Xyl, -Xyl-Rha-Xyl-Glu, -Glu-Rha-Xyl-Glu.

Литература

1. Титок В.В., Кухарева Л.В., Савич И.М., Тычина И.Н., Гавриленко Т.К., Опыт интродукции патринии средней (*Patrinia Intermedia*) в Беларуси, / Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі №4, - 2013
2. Минина С. А., Каухова И. Е. / Химия и технология фитопрепаратов// ГЭОТАР-Медиа-2009.
3. Георгиевский В., Комиссаренко Н., Дмитрук С. / Биологически активные вещества лекарственных растений // Наука - 1990
4. Иванова, В.М. Исследование корней и корневищ патринии средней как источника новых лекарственных препаратов / В.М. Иванова // Автореферат кандидатской диссертации. Москва, 1965
5. Mingquan Geo, Lei Zhang, Zhiqiang Liu / Analysis of Saponins from Leaves of *Aralia elata* by Liquid Chromatography and Multi-stage Tandem Mass Spectrometry // Analytical Science.- 2009.- Vol.25.- P.753-758.
6. Sam Sik Kang, Ju Sun Kim / A Triterpenoid Saponin from *Patrinia scabiosaefolia* // J. Nat. Prod.- 1997.- Vol.60.- P.1060-1062.
7. Feng Sun, Zheng Cai, Muhammad Ishtiaq Chaudhary, Peigen Xiao, Yiyu Cheng / Distribution of the triterpenoid saponins and chemotaxonomy of the genus *Clematis* L. by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry // Biochemical Systematics and Ecology.- 2010.- Vol.38.- P.1018-1025.
8. Michael Murgu, Edson Rodrigues-Filho / Dereplication of Glycosides from *Sapindus saponaria* using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry // J. Braz. Chem. Soc.- 2006.- Vol.17.- No. 7.- P.1281-1290.
9. Laurence Voutquenne, Pauline Guinot, Odile Thoison, Thierry Sevenet, Catherine Lavaud / Oleanolic glycosides from *Pometia ridleyi* // Phytochemistry.- 1985.- Vol. 24.- No. 9.- P.2063-2066.
10. Gabriella M. Cabrera. Part I. Mass spectrometry in the structural elucidation of natural products: Glycosides // Phytochemistry.- 2003.- Vol.64.- P.781-789.
11. Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Курман П.В. Определение структуры гликозидов и полисахаридов *Patrinia intermedia* методом хромато-масс-спектрометрии / Биологически активные вещества растений – изучение и использование: материалы международной научной конференции 29-31 мая 2013 г., г. Минск.- Минск: ГНУ «Центральный ботанический сад Академии наук Беларуси», 2013.- 356 с.- С. 218-219.
12. Шабуня П.С., Фатыхова С.А., Чернова Т.А., Курман П.В. / Химическая структура сапонинов *Patrinia intermedia* по данным хромато-масс-спектрометрии // Лекарственные растения: фундаментальные и прикладные проблемы: материалы I Международной научной конференции (21-22 мая 2013 г., г. Новосибирск) - Новосиб. гос. аграр. ун-т.- Новосибирск: Изд-во НГАУ, 2013.- 537 с.- С. 239-241.

DETERMINATION OF THE QUALITATIVE COMPOSITION OF TRITERPENE GLYCOSIDES MEDICINAL PLANTS *PATRINIA INTERMEDIA* BELARUSIAN INTRODUCTION AND THEIR TOTAL CONTENT

Demid D.I., Shabunya P.S., Fatykhava S. A., Kurman P.V., Petrov P.T.

Institute of bioorganic chemistry of NAS of Belarus