

Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского
Биология. Химия. Том 11 (77). 2025. № 3. С. 283–289.

УДК 547.918:543.422:582.5/.9

DOI 10.29039/2413-1725-2025-11-3-283-289

ТРИТЕРПЕНОВЫЕ ГЛИКОЗИДЫ ARALIACEAE.

II. ПОДГОТОВКА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, ВЫДЕЛЕНИЕ СУММ ГЛИКОЗИДОВ, ИХ ОЧИСТКА И РАЗДЕЛЕНИЕ НА ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ

Грииковец В. И.

*Институт биохимических технологий, экологии и фармации (структурное подразделение)
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В. И. Вернадского»,
Симферополь, Россия
E-mail: vladgri56@yandex.ru*

Рассмотрены способы подготовки растительного сырья к извлечению суммы тритерпеновых гликозидов, методы экстракции и предварительной очистки суммы тритерпеновых гликозидов, различные варианты препаративного хроматографического разделения сумм гликозидов на индивидуальные компоненты или узкие фракции по типу гликозидов или хроматографически неразделимых сумм и окончательное разделение узких фракций на индивидуальные гликозиды, их дополнительная очистка от негликозидных примесей и оценка их чистоты.

Ключевые слова: Araliaceae, тритерпеновые гликозиды, препаративная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

В предыдущей статье [1] были рассмотрены способы качественной первичной оценки растений семейства Аралиевые на содержание различных групп тритерпеновых гликозидов с помощью одномерного и двумерного ТСХ-анализа с целенаправленно выбираемыми хроматографическими системами растворителей с различными величинами pH, детектирующие реагенты на основе фосфорновольфрамовой кислоты с добавками ароматических альдегидов, позволяющие сделать предварительные выводы о природе агликонной части гликозидов, и обсуждены методы полуколичественного определения тритерпеновых гликозидах в экстрактах и растительном сырье.

В настоящей статье обсуждаются способы подготовки растительного сырья к извлечению суммы тритерпеновых гликозидов, методы экстракции и предварительной очистки суммы тритерпеновых гликозидов, различные варианты препаративного хроматографического разделения сумм гликозидов на индивидуальные компоненты или узкие фракции по типу гликозидов или хроматографически неразделимых сумм и окончательное разделение узких фракций на индивидуальные гликозиды, их дополнительная очистка от негликозидных примесей и оценка их чистоты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ТСХ-анализ и контроль разделения гликозидов выполняли на пластинах "Silufol" (Чехословакия). Детектирование пятен тритерпеновых гликозидов и их агликонов на хроматограммах осуществляли 10 %-ным спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты, 10 %-ным спиртовым раствором фосфорновольфрамовой кислоты с добавлением 2 % *n*-оксибензальдегида, в отдельных случаях – 5 %-ным спиртовым раствором ванилина с добавлением 0.5 % серной кислоты с последующим нагреванием хроматограмм при 100–120 °C. Детектирование сахаров проводили 10 %-ным спиртовым раствором кислого фталата анилина с последующим нагреванием хроматограмм при 100–150 °C.

Препартивное разделение проводили на колонках с силикагелем L (40–100 мкм) или с микросферическим силикагелем "Silpearl" (Чехословакия). Окончательную очистку гликозидов проводили на силикагеле "Silpearl". Использовали следующие системы растворителей: хлороформ-бензол (7:3); бензол-ацетон (4:1); хлороформ-метанол-10 % водный аммиак (100:50:15), (100:40:10) и (100:30:5); хлороформ-метанол-вода (100:40:7) и (100:30:5); хлороформ-этанол (10:1→1:1), насыщенный водой; хлороформ-этанол (10:1→1:1), насыщенный 10 % водным аммиаком. Для обращено-фазовой хроматографии использовали силикагель с привитыми октадецильными группами silica gel 90 C₁₈ (Merck) или подобные. Для гликозидов с остатками глюкуроновой кислоты использовали оксид магния или основной карбонат магния (Реахим, СССР).

Свежесобранный растительный материал высушивали в хорошо проветриваемом помещении при комнатной температуре до состояния ломкости. Воздушно-сухое сырье тщательно измельчали в гомогенизаторе тканей с вращающимися ножами до размера частиц не более 0,1–0,2 мм. Измельченный растительный материал последовательно экстрагировали: троекратно смесью хлороформ-бензол (7:3) по 100 мл на каждые 10 г сырья; пятикратно 80 %-ным водным 2-пропанолом по 100 мл на каждые 10 г сырья. Хлороформно-бензольные экстракты отбрасывали. Объединенные спиртовые экстракты упаривали досуха, остаток растворяли в 30-кратном количестве бутанола, насыщенного водой, и троекратно промывали 10-кратным количеством 5 %-ного водного раствора аммиака, насыщенного бутанолом (вариант А) или 10-кратным количеством воды, насыщенной бутанолом (вариант Б). Бутанольный слой упаривали досуха и получали очищенную сумму тритерпеновых гликозидов. Полученную сумму гликозидов разделяли на индивидуальные гликозиды или узкие фракции близких по хроматографической подвижности гликозидов хроматографически на силикагеле (соотношение адсорбент-адсорбат от 200:1 до 100:1) при градиентном элюировании системой растворителей хлороформ-этанол (10:1→1:1), насыщенной водой.

Фракции, содержащие гликозиды одного типа, разделяли рехроматографированием на микросферическом силикагеле Silpearl (соотношение адсорбент-адсорбат от 1000:1 до 500:1) при элюировании системой растворителей с соответствующей полярностью (хлороформ-этанол от 10:1 до 1:1, насыщенной водой), на индивидуальные гликозиды или хроматографически неразделимые смеси гликозидов (обнаруживалось методом ЯМР).

Фракции, содержащие одновременно гликозиды разных групп разделяли рехроматографированием на силикагеле (соотношение адсорбент-адсорбат от 100:1 до 50:1) в случае сульфатированных и несульфатированных гликозидов или в случае моно- и бисдесмозидных гликозидов с использованием элюирующей системы хлороформ-этанол, насыщенной 10 %-ным водным амиаком, с соответствующей полярностью (соотношение хлороформ-этанол от 5:1 до 1:1), а в случае кислых гликозидов с глюкуроновой кислотой и гликозидов не содержащих глюкуроновой кислоты – с использованием системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной 5 %-ным водным раствором муравьиной кислоты с соответствующей полярностью (соотношение хлороформ-этанол от 5:1 до 1:1) (вариант А).

Альтернативно (вариант Б) для разделения фракций, содержащих гликозиды с глюкуроновой кислотой и гликозиды без глюкуроновой кислоты фракции, растворенные в метаноле (1:100), обрабатывались избытком эфирного раствора диазометана (до устойчивой желтой окраски и прекращения выделения азота) с последующим упариванием досуха и разделением на силикагеле (при соотношении адсорбент-адсорбат от 100:1 до 50:1) с использованием элюирующей системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной водой с соответствующей полярностью (соотношение хлороформ-этанол от 5:1 до 1:1).

При наличии во фракциях гликозидов с различающейся кислотностью в качестве альтернативной методики (вариант В) использовалось дополнительное хроматографическое разделение на оксиде магния или основном карбонате магния (в случае гликозидов с ацетатными группами) при соотношении адсорбент-адсорбат от 100:1 до 50:1 и использовании элюирующей системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной водой, с соотношением хлороформа и этанола от 10:1 до 1:1 с учетом полярности разделяемых гликозидов.

Дополнительную очистку индивидуальных гликозидов или хроматографически неразделимых смесей гликозидов проводили хроматографированием на силикагеле (соотношение адсорбент-адсорбат от 100:1 до 50:1) при элюировании системой растворителей хлороформ-этанол, насыщенной 10 %-ным водным амиаком, с соответствующей полярностью (соотношение хлороформ-этанол от 10:1 до 1:1) для гликозидов без ацетатных групп или неметилированных кислых гликозидов. В случаях гликозидов с ацетатными группами и метилированных гликозидов при элюировании использовали соответствующую по полярности нейтральную систему растворителей хлороформ-этанол, насыщенную водой, с соотношением хлороформ-этанол от 5:1 до 1:1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подготовка растительного сырья, выделение и предварительная очистка суммы гликозидов

Для выделения гликозидов воздушно-сухое сырье тщательно измельчали, обрабатывали смесью бензола с хлороформом для удаления восков, жиров и прочих малополярных соединений и затем исчерпывающе экстрагировали гликозиды 80 %-ным водным изопропиловым спиртом. Объединенные спиртовые экстракты

упаривали досуха, остаток растворяли в бутаноле, насыщенном водой, и для удаления сильнополярных соединений (свободных моно- и олигосахаридов, солей и некоторых фенольных соединений) бутанольный слой промывали водой или водным аммиаком.

Промывка водным аммиаком в сравнении с водой дает значительно лучшие результаты, так как при этом удаляется и большая часть фенольных гликозидов, переходящих при этом в водно-аммиачный слой в виде сильнополярных фенолятов. Однако при наличии в сырье гликозидов с ацетильными группами (что следует из результатов предварительного двумерного ТСХ-анализа) метод промывки водным аммиаком неприменим, так как даже при использовании охлажденных растворов наблюдается значительное дезацетилирование и нарушение нативного соотношения компонентов. Определенные трудности возникали и при промывке бутанольного слоя аммиаком при наличии в экстрактах сильнополярных кислых (с глюкуроновой кислотой) гликозидов, для которых коэффициент распределения образующихся аммонийных солей близок к единице, и при промывке водным аммиаком наблюдались значительные потери. В подобных случаях промывка бутанольного слоя осуществлялась лишь водой. Упариванием промытого бутанольного слоя досуха получали исходную очищенную сумму тритерпеновых гликозидов, которую затем подвергали хроматографическому разделению на силикагеле.

Следует отметить, что получаемая из промытого бутанольного экстракта очищенная сумма тритерпеновых гликозидов все еще содержит значительные количества фенольных гликозидов, особенно если промывка проводилась лишь водой. Для количественной оценки содержания тритерпеновых гликозидов в этой сумме (и в растении в целом) и дополнительной очистки от фенольных соединений остаток от упаривания промытого бутанольного слоя растворяли в минимальном (двух-трех кратном) количестве 90 %-ного метанола и тритерпеновые гликозиды осаждали десятикратным объемом ацетона. При этом фенольные соединения, обладающие значительно лучшей растворимостью в ацетоне, остаются в супернатанте и соосаждаются лишь в незначительной степени. Дополнительная очистка суммы гликозидов переосаждением использовалась лишь в случае высокого содержания фенольных соединений. Полученную очищенную сумму тритерпеновых гликозидов далее подвергали хроматографическому разделению на силикагеле. Предложенный способ определения содержания тритерпеновых гликозидов в растительных экстрактах методом осаждения опубликован в [2].

Следует отдельно отметить, что измельчение свежесобранного (не высушенного) растительного материала и выделение гликозидов по вышеописанной схеме приводит к существенному преобладанию в экстракте монодесмозидных гликозидов, тогда как получение экстрактов из высушенного перед измельчением сырья дает сумму гликозидов с существенным преобладанием бисдесмозидных гликозидов. Этот эффект объясняется тем, что в растительных тканях имеется специфическая гликозидаза, расщепляющая ацилгликозидную связь, что и приводит к превращению бисдесмозидных гликозидов в монодесмозидные. В тканях данный фермент и гликозиды локализуются в различных местах и лишь при измельчении, а также механическом повреждении или значительном смятии влажного сырья,

приводящим к разрушению тканей, наблюдается ферментолиз и, как следствие, увеличение количества монодесмозидных гликозидов. Измельчение сухого сырья не приводит к ферментолизу, поскольку фермент действует только в водном растворе (или тканевой жидкости), а последующие обработки органическими растворителями и экстракция спиртом полностью денатурируют ферменты и не вызывают последующих превращений. Несомненно, что бисдесмозидные гликозиды являются нативной формой гликозидов во всех органах растения и лишь в семенах наряду с бисдесмозидными гликозидами в нативном виде в значительных количествах присутствуют и монодесмозидные гликозиды. Хотя наличие подобных ферментов в растениях и характер их действия на нативные гликозиды известны достаточно давно [3, 4], но этому факту обычно не уделялось должного внимания.

Разделение суммы гликозидов на фракции и индивидуальные компоненты

Очищенная сумма тритерпеновых гликозидов подверглась препаративному хроматографическому разделению на силикагеле с использованием градиентного элюирования нейтральной системой растворителей хлороформ-этанол (10:1→1:1), насыщенной водой. В результате получали индивидуальные гликозиды или узкие фракции близких по хроматографической подвижности гликозидов.

Фракции, содержащие по данным ТСХ гликозиды одного типа разделяли рехроматографированием на высокоэффективном микросферическом силикагеле при элюировании нейтральной системой растворителей с соответствующей полярностью (хлороформ-этанол от 10:1 до 1:1, насыщенной водой), на индивидуальные гликозиды. Фракции наиболее полярных тритерпеновых гликозидов, плохо разделяющиеся на силикагеле, удавалось разделить на индивидуальные компоненты с использованием обращенно-фазовой хроматографии на силикагеле с привитыми алкильными (гептильными, октильными, децильными) группами при элюировании системами растворителей с убывающей полярностью вода-этанол (6:4→4:6) или вода ацетонитрил (7:3→1:1).

Фракции, содержащие по данным ТСХ гликозиды разных групп, разделяли рехроматографированием на силикагеле в случае сульфатированных и несульфатированных гликозидов или в случае моно- и бисдесмозидных гликозидов с использованием элюирующей системы хлороформ-этанол, насыщенной 10 %-ным водным аммиаком, с соответствующей полярностью, а в случае кислых гликозидов с глюкуроновой кислотой и гликозидов, не содержащих глюкуроновой кислоты, – с использованием системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной 5 %-ным водным раствором муравьиной кислоты с соответствующей полярностью (вариант А). В качестве альтернативной методики (вариант Б) для разделения фракций, содержащих гликозиды с глюкуроновой кислотой и гликозиды без глюкуроновой кислоты использовалось метилирование фракций, растворенных в метаноле, избытком эфирного раствора диазометана с последующим разделением на силикагеле с использованием элюирующей системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной водой, с соответствующей полярностью. При наличии во фракциях гликозидов с различающейся кислотностью в качестве альтернативной

методики (вариант В) показана эффективность использования в качестве адсорбента оксида или основного карбоната магния (в случае гликозидов с ацетатными группами) при использовании нейтральной элюирующей системы растворителей хлороформ-этанол, насыщенной водой, что опубликовано в опубликованы в [5].

Дополнительную очистку индивидуальных тритерпеновых гликозидов от примесей фенольных соединений проводили рехроматографированием на силикагеле при элюировании системой растворителей хлороформ-этанол, насыщенной 10 %-ным водным аммиаком, с соответствующей полярностью для гликозидов без ацильных групп или для неметилированных кислых гликозидов. В остальных случаях при элюировании использовали соответствующую по полярности нейтральную систему растворителей хлороформ-этанол, насыщенную водой. В результате получали индивидуальные гликозиды или хроматографически неразделимые смеси гликозидов с чистотой по данным ТСХ и ЯМР более 90–95 % основного вещества. Хроматографически неразделимые смеси обычно возникают для изомерных гликозидов олеананового и урсанового рядов, различающихся лишь положением метильной группы (С-29) у атома С-20 или С-19 кольца Е их агликонной части, или для частично ацетилированных гликозидов с разным расположением ацильной группы у одного и того же углеводного остатка. Такие смеси успешно анализировались с использованием различных вариантов одно- и двумерной спектроскопии ЯМР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Рассмотрены способы подготовки растительного сырья к извлечению суммы тритерпеновых гликозидов.
2. Описаны методы экстракции и предварительной очистки суммы тритерпеновых гликозидов.
3. Предложены различные варианты препаративного хроматографического разделения сумм гликозидов на индивидуальные компоненты или узкие фракции и окончательное разделение узких фракций на индивидуальные гликозиды с их дополнительной очисткой от негликозидных примесей.

Список литературы

1. Гришковец В. И. Тритерпеновые гликозиды Araliaceae. I. Методы предварительного анализа тритерпеновых гликозидов растений семейства Аралиевые / В. И. Гришковец // Ученые записки Крымского федерального университета имени В. И. Вернадского. Биология. Химия. – 2025. – Т. 11 (77), № 3. – С. 273–282.
2. Гришковец В. И. Весовой и спектрофотометрический методы количественного определения тритерпеновых гликозидов в плодах *Sophora japonica* и других растениях. / В. И. Гришковец, Л. А. Горбачева // Химия природ. соедин. – 1997. – № 1. – С. 68–70.
3. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy / E. Schlosser // Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz. – 1973. – Vol. 80. – P. 704–710.
4. Domon B. New saponins from *Phytolacca dodecandra* L'HERIT. / B. Domon, K. Hostettmann // Helv. Chim Acta. – 1984. – Vol. 67. – P. 1310–1315.
5. Гришковец В. И. Использование оксида магния и основного карбоната магния в качестве сорбентов в хроматографии тритерпеновых гликозидов / В. И. Гришковец // Химия природ. соедин. – 2001. – № 2. – С. 171–172.

TRITERPENE GLYCOSIDES OF ARALIACEAE. II. PREPARATION OF PLANT MATERIALS, ISOLATION OF GLYCOSIDE SUMS, THEIR PURIFICATION AND SEPARATION INTO INDIVIDUAL COMPONENTS

Grishkovets V. I.

*Institute of biochemical technologies, ecology and pharmacy (structural division) of the Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «V. I. Vernadsky Crimean Federal University», Simferopol, Russia
E-mail: vladgr56@yandex.ru*

This article discusses methods for preparing plant raw materials for the extraction of triterpene glycosides, methods for the extraction and pre-purification of triterpene glycosides, various options for the preparative chromatographic separation of glycoside amounts into individual components or narrow fractions by type of glycosides or chromatographically inseparable amounts and the final separation of narrow fractions into individual glycosides, their additional purification from non-glycoside impurities and evaluation their purity.

The proposed optimal schemes for preparing plant raw materials, extracting ballast compounds, the sum of target glycosides and its purification from phenolic compounds are considered, taking into account the nature of the predominant glycosides, as well as methods for chromatographic distribution of the sum of glycosides into narrow fractions and individual compounds using various chromatographic systems or adsorbents. The proposed use of magnesium oxide and basic carbonate for the separation of triterpene glycosides, which differ in acidity, is justified.

As a result, individual glycosides or chromatographically inseparable mixtures of glycosides with a TLC and NMR purity of more than 90–95 % of the basic substance were obtained. Chromatographically inseparable mixtures usually occur for isomeric glycosides of the oleanane and ursan series differing only in their aglycone part by position of the methyl group (C-29) in the ring E at C-20 or C-19 atom, or for partially acetylated glycosides with different positions of the acyl group in the same carbohydrate residue. Such mixtures have been successfully analyzed using various variants of one- and two-dimensional NMR spectroscopy.

Keywords: Araliaceae, triterpene glycosides, preparative chromatography.

References

1. Grishkovets V. I. Triterpene glycosides of Araliaceae. I. Preliminary analysis methods of Araliaceae plants triterpene glycosides, *Scientific notes of the Crimean Federal University named after V. I. Vernadsky. Biology. Chemistry*, **11** (3), 273 (2025). (in Russ.).
2. Grishkovets V. I., Gorbacheva L. A., Gravitational and spectrophotometric methods for quantitative determination of triterpene glycosides in Sophora japonica fruits and other plants, *Chemistry of natural compounds*, (1), 68 (1997). (in Russ.)
3. Schlosser E. Role of saponins in antifungal resistance. II. The hederasaponins in leaves of English ivy, *Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz*, (80) 704 (1973)
4. Domon B., Hostettmann K., New saponins from Phytolacca dodecandra L'HERIT., *Helv. Chim Acta*, (67), 1310 (1984).
5. Grishkovets V. I. Use of magnesium oxide and basic magnesium carbonate as sorbents in chromatography of triterpene glycosides, *Chemistry of natural compounds*, (2), 171 (2001). (in Russ.).