

УДК 582.736.3:547.596/597:582

А.Е. Палий, Е.А. Сластья, В.Н. Ежов

Никитский ботанический сад ■ Национальный научный центр УААН
пгт Никита, г. Ялта, АР Крым, 98648 Украина

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВ *MELILOTOIDES CRETACEA* (M. BIEB.) SOJÁK

Тритерпеновые гликозиды, агликоны, *Melilotoides cretacea*

СЕЗОННА ДИНАМІКА НАКОПИЧЕННЯ ТРИТЕРПЕНІВ *MELILOTOIDES CRETACEA* (M. BIEB.) SOJÁK. А.Е. Палий, Є.А. Сластья, В.М. Єжов. – Методом ВЕРХ проведено вивчення сезонної динаміки накопичення тритерпенових сполук у різних органах *Melilotoides cretacea*. Встановлено, що максимальний вміст тритерпенових глікозидів спостерігався у коренях в період цвітіння. Біосинтез тритерпенових агліконів відбувається у надземній частині рослини, а тритерпенові глікозиди накопичуються у коренях та насінні *M. cretacea*.

СЕЗОННАЯ ДИНАМИКА НАКОПЛЕНИЯ ТРИТЕРПЕНОВ *MELILOTOIDES CRETACEA* (M. BIEB.) SOJÁK. А.Е. Палий, Е.А. Сластья, В.Н. Ежов. – Методом ВЭЖХ проведено изучение сезонной динамики накопления тритерпенов в разных органах *Melilotoides cretacea*. Установлено, что максимальное содержание тритерпеновых гликозидов наблюдалось в корнях в период цветения. Биосинтез тритерпеновых агликонов происходит в надземной части растения, а тритерпеновые гликозиды накапливаются в корнях и семенах *M. cretacea*.

THE SEASONAL DYNAMICS OF ACCUMULATION OF TRITERPENE IN DIFFERENT ORGANS OF *MELILOTOIDES CRETACEA* (M. BIEB.) SOJÁK. А.Е. Paliy, Е.А. Slastja, V.N. Ezhov. – The seasonal dynamics of accumulation of triterpene in different organs of *Melilotoides cretacea* has been studied by the HPLC method. It was found the maximum content of triterpene glycosides in roots was in the blooming period. The biosynthesis of triterpene aglycones proceeded in above-ground parts of the plant. Triterpene glycosides were accumulated in roots and seeds of *M. cretacea*.

Тритерпеновые гликозиды относятся к биологически активным веществам, они широко распространены в растительном мире (Максютина и др., 1985; Кинтя и др., 1990). Физико-химические свойства, структурные особенности агликона и состав углеводной части определяют разнообразие их физиологического действия. Это обуславливает растущий интерес к тритерпеноидам как лекарственным, антибиотическим и пищевым средствам. Для тритерпеновых гликозидов характерны противовоспалительный, антимикробный и отхаркивающий эффекты, антиоксидантные и гемолитические свойства; проявляя фунгицидную активность, они играют важную роль в устойчивости ряда растений к грибковым болезням.

Практический интерес представляет поиск источников тритерпеноидов, выявление новых представителей данной группы соединений и оценка их биологической активности (Schopke et al., 1990).

Ранее сотрудниками отдела биохимии растений Никитского ботанического сада были проведены исследования растений семейства бобовых, произрастающих в Крыму (Фадеев, Голубев, 1985). В результате этого исследования выявлены виды, перспективные в качестве сырья для получения тритерпеновых гликозидов, в том числе и *Melilotoides cretacea* (M. Bieb.) Soják (Mosyakin et al., 1999).

Содержание тритерпеновых гликозидов в корнях *M. cretacea* составляет 2,0-2,5%. Состав и структура комплекса тритерпеноидов *M. cretacea* ранее не изучались.

Целью данного исследования являлось изучение сезонной динамики накопления веществ тритерпеновой природы в различных органах *Melilotoides cretacea*.

Материалы и методы

Melilotoides cretacea (сем. Fabaceae) – многолетняя трава, полукустарничек с восходящими травянистыми побегами высотой 10-30 см и мощной корневой системой. Произрастает на сухих известковых и шиферных склонах в Крыму и на северо-западном Кавказе (Васильченко, 1987).

Для исследования комплекса тритерпеноидов были собраны растения в районе с. Малого Садового Бахчисарайского района АР Крым в период с сентября 2000 г. по август 2001 г. Образцы растений разделялись по органам: корни, листья, стебли и семена. Экстракты готовили мацерацией измельченных проб в 70% этиловом спирте в течение 5 суток, отношение сырья и растворителя 1:7. Состав экстрактивных веществ изучали методом ВЭЖХ на колонке с обращенно-фазовым сорбентом в режиме градиентного элюирования (Стыскин и др., 1986).

Для предварительной оценки природы изучаемых компонентов проводили колоночное разделение сконцентрированных экстрактов на силикагеле. Это позволило отделить тритерпеновые гликозиды от агликонов, эффективность разделения контролировали с помощью ВЭЖХ. Тритерпеновая природа компонентов была установлена с использованием ТСХ и хромогенных реактивов (Деканосидзе и др., 1982). Для этого фракции хроматографировали на пластинках «Silufol» в системах хлороформ-метанол-вода (65:35:10), хлороформ-метанол (9:1) и бензол-этилацетат (4:1). Хроматограммы опрыскивали 25% спиртовым раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты или ванилин-серноокислотным реактивом, прогревали в течение 5 мин. при 110°C.

ВЭЖХ-анализ проведен на микроколоночном хроматографе «Милихром» (Россия) с колонкой “Nucleosil C18” 82*2 мм, зерно 5 мкм, $t=22\text{eC}$. Детектирование проводили по поглощению при 210 нм. Элюирование строилось по принципу многоступенчатого градиента раствора А в В с увеличением на 5% доли раствора А, по 100 мкл от 5% до 100% раствора А и затем в изократическом режиме 100% раствора А 800 мкл при скорости потока 30 мкл/мин. Раствор А: смесь ацетонитрила с метанолом (1:1). Раствор В: 0,03 М раствор однозамещенного фосфата калия и фосфорной кислоты до pH 2,5. Объем пробы 3 мкл. Интегрирование хроматографических данных проведено с использованием автоматического цифрового интегратора ИЦ26 (Чехия). Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием корреляционного анализа (Менчер, Земшман, 1986). Повторность опытов трехкратная.

Результаты и обсуждение

При изучении сезонной динамики накопления веществ тритерпеновой природы в различных органах *Melilotoides cretacea* было установлено, что в исследуемых экстрактах преобладают тритерпеноиды, особенно высоким их содержанием отличаются корни (табл. 1).

Таблица 1. Содержание компонентов в экстрактах частей растения на разных стадиях вегетации *Melilotoides cretacea*

Вещество, %	Органы растения									
	корень, июнь	корень, июль	корень, август	листья, июнь	листья, июль	листья, август	стебли, июнь	стебли, июль	стебли, август	семена, август
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
А	11,37	2,79	0,00	0,00	0,00	2,96	0,00	0,00	5,47	0,00
В	9,06	8,96	1,63	2,68	0,00	9,89	2,29	1,63	7,82	8,00
С	0,00	0,00	8,32	1,22	13,03	0,00	6,69	8,32	0,00	0,00
Д	16,43	14,04	17,86	9,23	21,64	12,56	11,40	17,86	15,47	18,42
Е	0,00	7,07	2,17	0,00	0,00	0,00	0,72	2,17	0,00	0,00
Ф	1,93	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,30	0,00	0,00	0,00

Окончание таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
G	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
H	3,66	2,99	5,16	2,52	7,55	4,63	2,23	4,38	4,83	5,48
I	1,85	0,00	0,00	2,25	0,00	3,58	0,35	0,00	2,48	1,34
J	1,46	2,34	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,84
K	0,00	3,92	1,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,39	1,36
L	1,80	7,28	1,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,59
M	25,94	43,19	29,86	3,78	8,03	9,94	18,82	21,70	13,21	20,84
N	7,38	2,65	10,26	2,15	3,75	5,86	0,00	1,06	0,86	2,98
O	5,82	0,00	6,09	2,12	1,96	1,95	0,99	0,93	0,94	2,36
P	6,68	0,00	6,20	15,38	20,76	16,14	4,64	3,61	4,12	2,38
Q	0,00	0,00	0,00	13,26	9,92	9,05	3,26	3,31	9,30	0,00
R	0,00	0,00	0,00	6,56	4,37	6,67	10,16	14,58	8,34	0,00
S	0,00	0,00	0,00	15,48	2,13	4,82	14,19	11,92	3,49	0,00

При помощи ТСХ- и ВЭЖХ-методов нами обнаружено шестнадцать тритерпеноидов в корнях *Melilotoides cretacea*. Обнаруженные вещества были обозначены буквами латинского алфавита по мере увеличения полярности. Вещества тритерпеновой природы, обладающие низкой полярностью, отнесены к группе агликонов (мелилотоидогенины А - Е). В составе агликонов методом тонкослойной хроматографии, путем сравнения с заведомо известным образцом, идентифицирована олеаноловая кислота – мелилотоидогенин С.

Вещества, обладающие большей полярностью и дающие характерные реакции на тритерпеноиды, отнесены к группе тритерпеновых гликозидов (мелилотоидозиды F - S). Основываясь на результатах ВЭЖХ-анализа, была рассчитана корреляционная матрица для тритерпенов корней *Melilotoides cretacea* (табл. 2).

Таблица 2. Коэффициенты корреляции данных ВЭЖХ-анализа на процентное содержание тритерпенов *Melilotoides cretacea*

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
A		0,69	-0,07	-0,09	-0,56	0,97	0,97	-0,44	0,97	0,37	-0,57	-0,17	-0,48	-0,1	0,24	0,34
B	0,69		-0,99	-0,78	0,21	0,22	0,51	-0,95	0,51	0,92	0,2	0,59	0,29	0,78	-0,52	-0,43
C	-0,69	-0,99		0,79	-0,22	-0,50	-0,50	0,95	-0,5	-0,93	-0,21	-0,6	-0,3	0,79	0,53	0,44
D	-0,09	-0,78	0,78		-0,78	0,14	0,14	0,76	0,14	-0,96	-0,77	-0,97	-0,83	0,99	0,94	0,9
E	-0,56	0,21	-0,22	-0,78		-0,74	-0,74	-0,50	-0,74	0,57	0,99	0,91	0,99	-0,77	-0,94	-0,97
F	0,97	0,21	-0,50	0,14	-0,74		0,98	-0,22	0,98	0,14	-0,74	-0,4	-0,68	0,14	0,14	0,56
G	0,97	0,51	-0,50	0,14	-0,74	0,98		-0,22	0,98	-0,74	0,14	-0,74	-0,4	-0,68	0,47	0,56
H	-0,44	-0,95	0,95	0,76	-0,51	-0,22	-0,22		-0,22	-0,99	-0,74	-0,81	-0,57	0,94	0,47	0,69
I	0,97	0,51	-0,50	0,14	-0,74	0,98	0,98	-0,22		0,14	-0,99	-0,4	-0,68	0,14	0,77	0,56
J	0,37	0,92	-0,93	-0,96	0,57	0,14	-0,74	-0,99	0,14		0,57	0,85	0,63	-0,96	0,47	-0,75
K	-0,57	0,20	-0,21	-0,77	0,99	-0,74	0,14	-0,49	-0,74	0,56		0,91	0,99	0,77	-0,96	-0,97
L	-0,17	0,59	-0,60	-0,97	0,91	-0,40	-0,74	-0,81	-0,40	0,85	0,91		0,95	-0,96	-0,94	-0,98
M	-0,48	0,29	-0,3	-0,83	0,99	-0,68	-0,40	-0,57	-0,68	0,63	0,99	0,95		-0,82	-0,99	-0,99
N	-0,10	-0,78	0,79	0,99	-0,77	0,14	-0,68	0,94	0,14	-0,96	-0,77	-0,96	-0,82		0,94	0,90
O	0,24	-0,52	0,53	0,95	-0,94	0,47	0,47	0,77	0,47	-0,96	-0,94	-0,99	-0,97	0,94		0,99
P	0,34	-0,43	0,44	0,91	-0,97	0,56	0,58	0,70	0,56	-0,75	-0,97	-0,98	-0,99	0,90	0,99	

Выяснено, что процентное содержание мелилотоидогенина С коррелирует с мелилотоидогенином D ($K_{CD}=0,79$). Это говорит о том, что генины С и D имеют структурное сходство. Коэффициенты корреляции между мелилотоидогенином А и мелилотоидозидами F, G, I ($K_{AF}=K_{AG}=K_{AI}=0,97$) равны между собой и составляют 0,97. Коэффициенты корреляции между мелилотоидогенином С и мелилотоидозидами H, N: $K_{CH}=0,95$; $K_{CN}=0,79$, соответственно; мелилотоидогенина D с мелилотоидозидами H, N, O, P: $K_{DH}=0,76$; $K_{DN}=0,99$; $K_{DO}=0,95$; $K_{DP}=0,91$, соответственно. Кроме того, мелилотоидогенин

В коррелирует с мелилотоидозидом J ($K_{BJ} = 0,92$), а Е коррелирует с гликозидами К, L, М ($K_{EK}=0,99$; $K_{EL}=0,91$; $K_{EM}=0,99$).

На основании приведенных в таблице 2 коэффициентов можно утверждать, что мелилотоидогенин А является агликоном мелилотоидозидов F, G, I; мелилотоидогенин В – мелилотоидозидом J, мелилотоидогенин С – гликозидами Н, мелилотоидогенин D – агликоном мелилотоидозидов N, O, P, а мелилотоидогенин Е – агликоном гликозидов К, L, М.

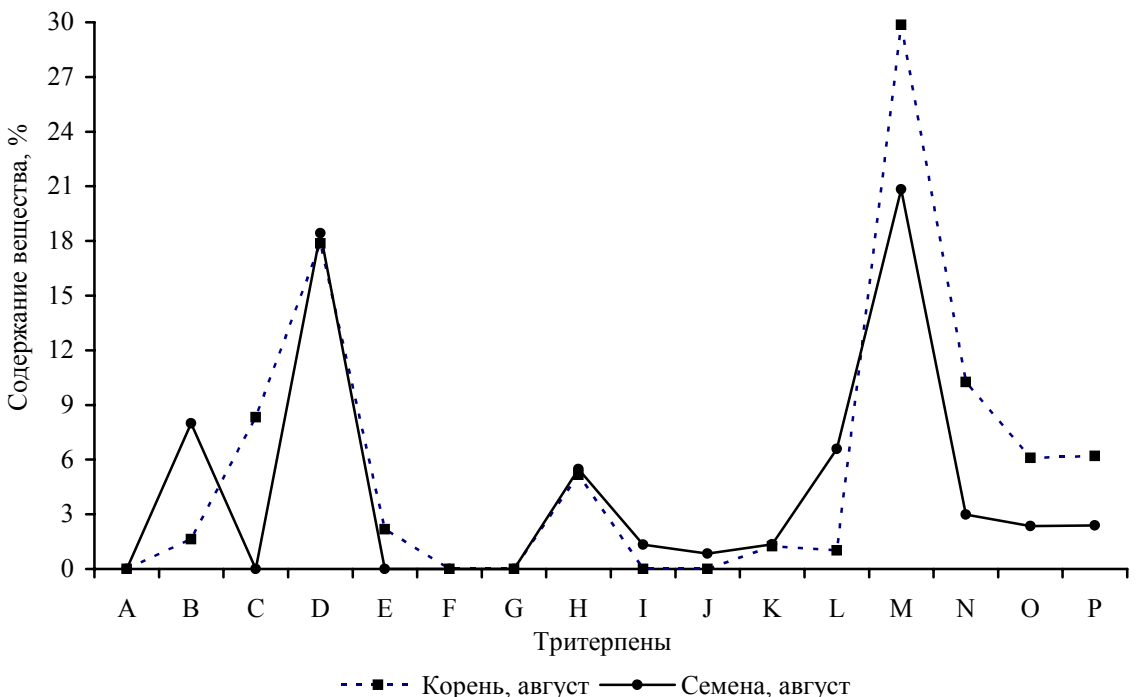
Сопоставляя данные о составе тритерпеноидов в экстрактах из листьев, стеблей и корней *M. cretacea*, мы установили, что в период активного вегетативного роста наблюдалось низкое содержание агликонов и гликозидов. Их концентрация возрастала, достигая максимума, в период цветения (июль), и снижалась к окончанию вегетации. Надземная часть растения отличалась высоким содержанием агликонов, а корни – тритерпеновых гликозидов.

Максимальное содержание агликонов в корнях отмечается в августе (17% для мелилотоидогенина D), а минимальное – в июне (начало вегетации). В листьях и стеблях максимум содержания агликонов приходится на период цветения (концентрация мелилотоидогенина D в листьях – около 22%), в период плодоношения их концентрация незначительно снижается.

Подземная часть растения в период активного вегетативного роста отличалась низким содержанием тритерпеновых гликозидов, их концентрация возрастала к моменту цветения (самая высокая концентрация выявлена для мелилотоидозидом М – более 43%) и снижалась в период окончания вегетации. В надземной части растения максимальное содержание тритерпеновых гликозидов также приходится на июль месяц, однако следует отметить, что наибольшая концентрация выявлена для мелилотоидозидом Р – 21%, содержание же мелилотоидозидом М составляло лишь 8%.

Можно предположить, что биосинтез тритерпеновых агликонов и их гликозидирование происходит в надземной части *M. cretacea*. В то же время тритерпеновые гликозиды, видимо, транспортируются в корневую систему, где и накапливаются.

Семена относятся к консервативным органам, сохраняющим лишь специфические для данного вида вещества вторичного метаболизма. Так как исследуемое растение является многолетним, динамическое сходство состава тритерпеноидов корней и семян является не случайным (рисунок). Подобно семенам, корни инициируют новый жизненный цикл в перезимовавшем или новом растении.



Содержание тритерпенов в корнях и семенах *Melilotoides cretacea* в период плодоношения

Выводы

В составе тритерпенов *M. cretacea* обнаружено 19 соединений, 16 из них характерны для корней. В процессе вегетации качественные и количественные характеристики тритерпеновых соединений *M. cretacea* возрастали к моменту цветения и снижались в период окончания вегетации, вне зависимости от этапа вегетации концентрация тритерпеноидов в корнях выше, чем в надземной части, и их качественный состав отличается большим разнообразием.

Васильченко И.Т. Крымка – *Crimea Vass.* // Флора европейской части СССР. – Л.: Наука, 1987. – Т. IV. – 187 с.

Деканосидзе Г.Е., Чирва В.Я., Сергиенко Т.В., Уварова Н.И. Исследование тритерпеновых гликозидов. – Тбилиси: Мицниереба, 1982. – 150 с.

Кинтя П.К., Фадеев Ю.М., Акимов Ю.А. Терпеноиды растений. – Кишинев: Штиинца, 1990. – 151 с.

Максютина Н.П., Комисаренко Н.Ф. и др. Растительные лекарственные средства. – Київ: Здоров'я, 1985. – 280 с.

Менчер Э.М., Земшман А.Я. Основы планирования эксперимента с элементами математической статистики в исследованиях по виноградарству. – Кишинев: Штиинца, 1986. – 238 с.

Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. – М.: Химия, 1986. – 288 с.

Фадеев Ю.М., Голубев В.Н. Распределение тритерпеновых гликозидов в растениях семейства Бобовые флоры Крыма // Сб. науч. тр. ГНБС "Биохимия плодовых и декоративных культур". – 1985. – Т. 95. – С. 54-61.

Mosyakin S.L., Fedoronchuk M.M. Vascular plants of Ukraine. A nomenclatural checklist. – Kiev, 1999. – 210 p.

Schopke T., Hiller K. Triterpenoid saponins. Part 6. // Pharmazie. – 1990. – Vol. 45, N 4. – P. 313-342.

Поступила 5.05.2003 г.