

Э.Х. Галияхметова<sup>1</sup>, А.А. Низамова<sup>1</sup>, Н.В. Кудашкина<sup>1</sup>,  
Р.Р. Галияхметова<sup>1</sup>, С.Р. Хасанова<sup>1</sup>, Т.В. Булгаков<sup>2</sup>  
**РАЗРАБОТКА КРИТЕРИЕВ ПОДЛИННОСТИ  
И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ САПОНИНОВ  
В ТРАВЕ GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»,

Минздрава России, г. Уфа

<sup>2</sup>ФГБОУ ВО «Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова», г. Москва

*Цель работы:* разработка критериев подлинности сырья и количественного определения суммы сапонинов в траве *Gynostemma pentaphyllum*.

*Материал и методы.* Объектом изучения явилась трава *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino, заготовленная в фазу цветения с 2017 по 2020 гг. на территории Республики Башкортостан из культивируемого вида. Подлинность изучаемого объекта и определение количественного содержания тритерпеновых сапонинов проводили спектрофотометрическим методом по реакции с серной кислотой.

*Результаты.* Критерием подлинности сапонинов в траве *Gynostemma pentaphyllum* является качественная реакция с серной кислотой концентрированной с последующим измерением УФ-спектров полученных комплексов. Разработку количественного определения суммы сапонинов проводили, подбирая наилучшие критерии экстрагирования: тип экстрагента, соответствие массы растительного материала и объема экстрагента, время извлечения, уровень измельчения сырья и стабильность реакции с серной кислотой концентрированной. По результатам исследования содержание суммы сапонинов в траве *G. pentaphyllum* составляет в среднем  $17,24 \pm 0,07\%$ .

*Выводы.* Разработаны критерии подлинности и методика количественного определения суммы сапонинов в сырье в пересчете на  $\beta$ -эсцин, которая легко воспроизводима, доступна и не трудоемка. Методика позволяет оценивать качество травы *Gynostemma pentaphyllum* по содержанию одной из групп основных биоактивных соединений – сапонинов.

*Ключевые слова:* *Gynostemma pentaphyllum* трава, сапонины,  $\beta$ -эсцин, серная кислота концентрированная, спектрофотометрический метод.

E.Kh. Galiakhmetova, A.A. Nizamova, N.V. Kudashkina,  
R.R. Galiakhmetova, S.R. Khasanova, T.V. Bulgakov  
**DEVELOPMENT OF CRITERIA FOR AUTHENTICITY  
AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE AMOUNT  
OF SAPONINS IN GYNOSTEMMA PENTAPHYLLUM HERB**

*The purpose of the work:* development of criteria for the authenticity of raw materials and the quantitative determination of the amount of saponins in *Gynostemma pentaphyllum* herb.

*Material and methods.* The object of study was *G. pentaphyllum* (Thunb.) Makino herb harvested in the flowering phase from 2017 to 2020 on the territory of the Republic of Bashkortostan from a cultivated species. The determination of the authenticity of raw materials and the quantitative content of the amount of triterpene saponins in *G. pentaphyllum* was carried out by the spectrophotometric method based on the reaction with sulfuric acid.

*Results.* The criterion for the authenticity of saponins in *Gynostemma pentaphyllum* is a qualitative reaction with concentrated sulfuric acid followed by measurement of the UV spectra of the obtained complexes. The development of the quantitative determination of the amount of saponins was carried out by selecting the optimal extraction conditions: the type of extractant, the ratio of the weight of the raw material and the volume of the extractant, the extraction time, the degree of grinding of the raw material and the reaction time with concentrated sulfuric acid. In accordance with the selected conditions, the amount of saponins in *G. pentaphyllum* herb averages  $17.24 \pm 0.07\%$ .

*Conclusions.* Authenticity criteria and a method for quantifying the amount of saponins in raw materials in terms of  $\beta$ -escin, which is easily reproducible, accessible and not time-consuming, have been developed. The technique allows to evaluate the quality of *Gynostemma pentaphyllum* herb by the content of one of the groups of the main bioactive compounds – saponins.

*Key words:* *Gynostemma pentaphyllum* herb, saponins,  $\beta$ -escin, concentrated sulfuric acid, spectrophotometric method.

В состав рода *Gynostemma* Blume входит около 17 видов, встречающихся в Юго-Восточной Азии, 14 из которых – в Китае (*G. pentagynum*, *G. yixingense*, *G. cardiospermum*, *G. microspermum*, *G. aggregatum*, *G. laxiflorum*, *G. simplicifolium*, *G. laxum*, *G. burmanicum*, *G. pentaphyllum*, *G. guangxiense*, *G. compressum*, *G. longipes*, *G. caulopterum*) и 9 из них являются эндемичными видами (рис. 1) [6,7,8].

*Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino («второй женьшень») привлекает пристальное внимание зарубежных ученых из-за схожести компонентного состава с женьшенем настоящим. Оба растения принадлежат к

разным семействам и у них в качестве лекарственного сырья используются разные морфологические органы (*Gynostemma pentaphyllum*, Cucurbitaceae – трава; *Panax ginseng*, Araliaceae – корни), но их химический состав очень схож [1].

*G. pentaphyllum* применяется как источник полезных активных и синергических компонентов, в числе которых содержатся важные сапонины – гипенозиды с даммарановым скелетом в структуре (рис. 2).

*G. pentaphyllum* используется для получения чая «Jiaogulan» (Китай, сертификат № AR-16-SU-040016-01-EN) и капсулированных

биологических добавок *Paradise Herbs* (Гино-стемма, 60 вегетарианских капсул) и *Solaray* (экстракт корня гиностеммы, 410 мг, 60 растительных капсул). Лекарственные средства на

основе сырья гиностеммы пятилистной обладают тонизирующими, адаптогенными, антиоксидантными, общеукрепляющими и другими фармакологическими свойствами [1,4,9].



Рис. 1. Ареал распространения рода *Gynostemma* (использован из открытого доступа The International Plant Names Index)

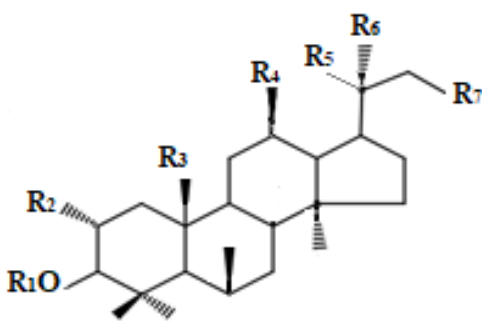


Рис. 2. Даммарановый скелет

*G. pentaphyllum* используется для получения чая «Jiaogulan» (Китай, сертификат № AR-16-SU-040016-01-EN) и капсулированных биологических добавок *Paradise Herbs* (Гино-стемма, 60 вегетарианских капсул) и *Solaray* (экстракт корня гиностеммы, 410 мг, 60 растительных капсул). Лекарственные средства на основе сырья гиностеммы пятилистной обладают тонизирующими, адаптогенными, антиоксидантными, общеукрепляющими и другими фармакологическими свойствами [1,4,9].

*G. pentaphyllum*, адаптированная к умеренно континентальному климату Республики Башкортостан (географические координаты: 54°49'4" с. ш., 55°34'15" в. д.), представляет особый интерес. Доказано, что *G. pentaphyllum* содержит целый комплекс биологических соединений, таких как: полисахариды, витамины, фенольные соединения, сапонины, аминокислоты, макро- и микроэлементы [4]. Существенный вклад в химический состав и фармакологическую активность *G. pentaphyllum* вносят тритерпеновые сапонины – гипенозиды [5].

Применение в химико-фармацевтической практике нового вида лекарственного растительного сырья возможно при наличии разработанного нормативного документа, регламентирующего стандарты качества сырья.

Цель работы – разработка критериев подлинности и количественного определения суммы сапонинов в траве *G. pentaphyllum*.

#### Материал и методы исследования

Объектом экспериментальных исследований явилась трава *G. pentaphyllum*, заготовленная в фазу цветения с 2017 по 2020 гг. в Ботаническом саду-институте и на частных участках Уфимского района. В основе определения критерия подлинности по спектральным характеристикам и количественному содержанию суммы сапонинов в *G. pentaphyllum* траве лежит спектрофотометрический метод. Для исследований использовался двухлучевой спектрофотометр модели SHIMADZU UV-1800. В качестве стандартного образца (СО) был использован β-эсцин (CAS № 11072-93-8, производитель Santa Cruz Biotechnology). Статистический анализ результатов химического эксперимента проводили математическими методами, используя критерий Стьюдента по ГФ XIV [3].

В ходе эксперимента были изучены условия экстрагирования сапонинов из травы *G. pentaphyllum* и реакции сапонинов с серной кислотой концентрированной: размер частиц растительного материала (0,5;3;7 мм), вид экстрагента (30%;70%;95% спирт этиловый) и его количество (30;50;100;200;300 мл), время

экстракции (30;50;90;120 мин) и время реакции с серной кислотой (5;10;15;20 мин) [4,5].

### Результаты и их обсуждения

Ранее нами методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии установлено, что доминирующим тритерпеновым сапонином в траве *G. pentaphyllum* является  $\beta$ -эсцин [2].

Далее проводили спектральный анализ водно-спиртовых извлечений на спирте этиловом 70% *G. pentaphyllum* травы с растворами:

- 1) серной кислоты, концентрированной (1:5);
- 2) со смесью ледяной уксусной кислоты и серной кислотой концентрированной

(2:4) по фармакопейной статье (ФС.2.5.0039.15 «Синюхи голубой корневища с корнями»), в которой также доминирующим является сапонин  $\beta$ -эсцин (рис. 3) [3].

Рис. 3 демонстрирует совпадение максимумов поглощения спектра извлечения (кривая 2) с максимумами раствора стандарта (кривая 1) (262, 322, 384 нм). Выделение сапонинов согласно методике ФС «Синюхи голубой корневища с корнями» не показало совпадения максимумов спектров извлечения из травы и раствора стандарта. Поэтому было решено при разработке методики использовать способ образования окрашенных соединений сапонинов с серной кислотой концентрированной.

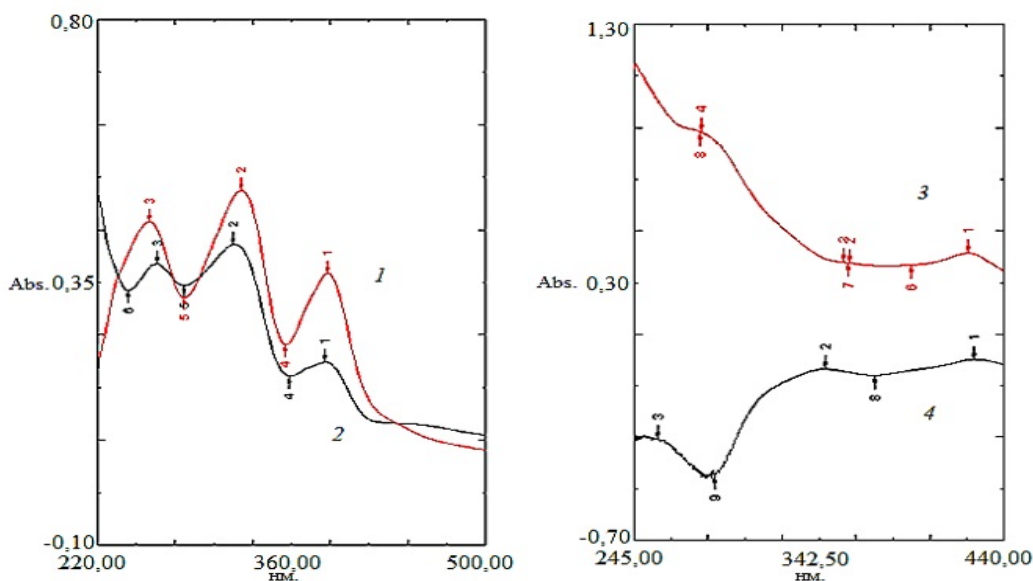


Рис. 3. Спектры поглощения исследуемых растворов: 1 – раствор СО  $\beta$ -эсцина; 2 – извлечение *G. pentaphyllum* травы с серной кислотой; 3 – раствор СО  $\beta$ -эсцина; 4 – извлечение *G. pentaphyllum* травы со смесью кислот

Рис. 3 демонстрирует совпадение максимумов поглощения спектра извлечения (кривая 2) с максимумами раствора стандарта (кривая 1) (262, 322, 384 нм). Выделение сапонинов согласно методике ФС «Синюхи голубой корневища с корнями» не показало совпадения максимумов спектров извлечения из травы и раствора стандарта. Поэтому было решено при разработке методики использовать способ образования окрашенных соединений сапонинов с серной кислотой концентрированной.

Для разработки критериев подлинности сапонинов в траве *G. pentaphyllum* предлагается использовать качественную реакцию с серной кислотой концентрированной с последующим изучением спектральных характеристик. Спектр поглощения полученного раствора с серной кислотой (аналитический эффект: при нагревании раствора происходит красно-оранжевое окрашивание) обнаруживает максимум поглощения при  $262 \pm 2$ ,  $322 \pm 2$ ,  $384 \pm 2$  нм и соответствует раствору СО  $\beta$ -эсцина (рис. 4).

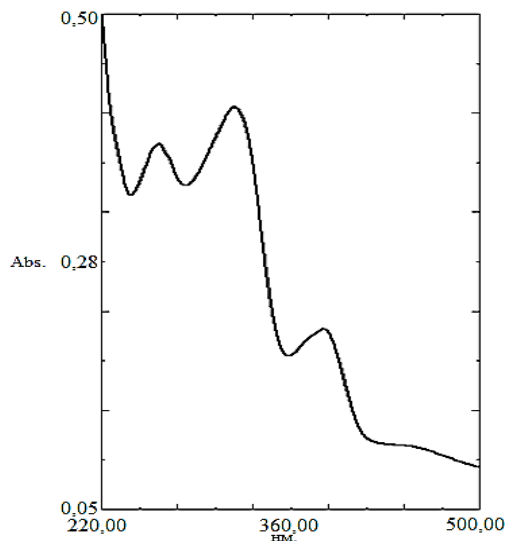


Рис. 4. Спектр водно-спиртового извлечения *G. pentaphyllum* травы с серной кислотой

Проведенные исследования доказывают рациональность определения суммы сапонинов в пересчете на  $\beta$ -эсцин. Поэтому следующим этапом исследований была разработка

методики количественного определения сапонинов в траве *G. pentaphyllum*.

В табл. 1 приведены оптимальные условия, необходимые для полного истощения сырья и извлечения сапонинов из *G. pentaphyllum* травы.

Таким образом, в ходе экспериментального исследования были определены оптимальные параметры количественного определения тритерпеновых сапонинов в объекте изучения.

В связи с тем, что при использовании многостадийного процесса пробоподготовки вероятность возникновения относительной ошибки возрастает, был сделан альтернатив-

ный выбор в пользу одностадийного процесса экстракции сырья, при котором происходит максимальный выход сапонинов.

Результаты количественного определения разработанной методики в *G. pentaphyllum* траве проводили в трех сериях и шести повторностях (табл. 2).

Из экспериментальных данных следует, что сумма сапонинов в пересчете на  $\beta$ -эсцин в *G. pentaphyllum* траве составляет в среднем  $17,24 \pm 0,07\%$ . Относительная погрешность средних результатов анализа не превышает 5%.

Таблица 1

Оптимальные условия для количественного определения суммы сапонинов в <i>G. pentaphyllum</i> траве (N=6)			
Условия	Содержание суммы сапонинов, %	Условия	Содержание суммы сапонинов, %
Экстрагент (спирт этиловый), %		Степень измельченности, мм	
30	9,42±0,47	0,5	9,67±0,48
70	11,41±0,57	3	11,41±0,57
95	9,95±0,50	7	10,72±0,53
Время экстракции, мин		Время реакции с концентрированной серной кислотой, мин	
30	12,17±0,61	5	16,76±0,33
50	16,39±0,81	10	17,26±0,07
90	17,26±0,07	15	16,28±0,81
120	17,01±0,05	20	16,35±0,82
Соотношение сырье-экстрагент			
	1:30		11,41±0,57
	1:50		12,36±0,61
	1:100		15,77±0,78
	1:200		17,26±0,07
	1:300		16,85±0,05

Таблица 2

Результаты определения суммы сапонинов в <i>G. pentaphyllum</i> траве		
№ серии	Среднее значение, %	Метрологические характеристики
1	17,24	f=5 S $\bar{y}$ =0,01663 Ea=0,04 Eотн=0,23
2	17,22	f=5 S $\bar{y}$ =0,02251 Ea=0,06 Eотн=0,34
3	17,26	f=5 S $\bar{y}$ =0,02677 Ea=0,07 Eотн=0,40

### Выводы

1. В процессе экспериментальных исследований разработаны критерии подлинности сырья и количественного определения суммы сапонинов в *G. pentaphyllum* траве.

2. Установлено, что критерием подлинности для сапонинов в *G. pentaphyllum* траве является качественная реакция с серной кислотой концентрированной. Полученные продукты реакции тритерпеновых сапонинов с серной кислотой при спек-

тральном анализе имеют максимумы поглощения  $262 \pm 2$ ,  $322 \pm 2$ ,  $384 \pm 2$  нм, соответствующие раствору стандартного образца  $\beta$ -эсцина.

3. Разработанные методики качественного и количественного анализа легко воспроизводимы, доступны, не трудоемки и позволяют оценивать подлинность и качество *G. pentaphyllum* травы по содержанию одной из основных биоактивных соединений – сапонинов ( $17,24 \pm 0,07\%$ ).

### Сведения об авторах статьи:

**Галияхметова Эльвира Халитовна** – к. фарм. н., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: galiahmetova.elvi@yandex.ru.

**Низамова Альфина Ансафовна** – к. фарм. н., доцент кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: alфина.nizamova@bk.ru.

**Кудашкина Наталья Владимировна** – д. фарм. н., профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: phytoart@mail.ru.

**Галияхметова Рената Ринатовна** – студентка педиатрического факультета ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. Тел.: 8(347)271-22-85. E-mail: farmakognosia@yandex.ru.

**Хасанова Светлана Рашитовна** – д. фарм. н., профессор кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3. E-mail: svet-khasanova@yandex.ru.

**Булгаков Тимур Вилюрович** – к. фарм. н., ведущий специалист допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (института) ФГБОУ ВО МГУ им. М.В. Ломоносова. Адрес: 105005, г. Москва, Елизаветинский переулок, 10, стр. 1. E-mail: tricster@inbox.ru.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Беленовская, Л.М. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): компонентный состав и биологическая активность / Л.М. Беленовская, А.Л. Буданцев, Н.В. Битюкова // Растительные ресурсы. – 2018. – Т. 54, № 4. – С. 443-495.
2. Высокоэффективная тонкослойная хроматография при анализе тритерпеновых сапонинов *Gynostemma pentaphyllum* / А.А. Низамова, Э.Х. Галияхметова, Н.В. Кудашкина [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. – 2021. – Т. 16, № 5. – С. 21-26.
3. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. [Электронный ресурс] // Федеральная электронная медицинская библиотека, 2018. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/>.
4. Низамова, А.А. Фармакогностическое изучение травы гиностеммы пятилистной (*Gynostemma pentaphyllum* THUNB.): автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пермь, 2022. – 24 с.
5. Пат. RU 2 790 821 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/15, A61K 36/42. Способ количественного определения сапонинов в траве гиностеммы пятилистной / Э.Х. Галияхметова, А.А. Низмова, Н.В. Кудашкина; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. – № 2022118006; заявл. 01.07.2022; опубл. 28.02.2023, Бюл. № 7.
6. Craib, W.G. Cucurbitaceae. *Flora Siamensis Enumeratio I* / W.G. Craib. – 1931. – Vol.1. – P. 750-770.
7. *Flora of China* [Электронный ресурс], 2011. URL: <http://www.efloras.org/>. (дата обращения 11.09.2023).
8. The International Plant Names Index. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ipni.org> (дата обращения 08.07.2020).
9. Wang, T-X. Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and antioxidant compounds from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino / T-X. Wang, M-M. Shi, J-G. Jiang // RSC Advances. – 2018. – Vol. 8, № 21. – P. 23181-23190.

## REFERENCES

1. Belenovskaya L.M., Budantsev A.L., Bitjukova N.V. *Gynostemma pentaphyllum* (Cucurbitaceae): component composition and biological activity. *Rastitelnye resursy*. 2018; 54(4): 443-495. (In English).
2. Nizamova A.A., Galiakhmetova E.Kh., Kudashkina N.V. [et al.] High-performance thin-layer chromatography in the analysis of triterpene saponins *Gynostemma pentaphyllum*. *Bashkortostan Medical Journal*. 2021; 16 (5): 21-26. (In Russ).
3. State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV Edition: Scientific Center for Expertise of Medical Devices. Link: Available from URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (as of December 10, 2021). (In English).
4. Nizamova, A.A. *Farmakognosticheskoe izuchenie travy ginostemmy pyatilistnoi* (*Gynostemma pentaphyllum* THUNB.): avtoref. dis. ... k-ta farm. nauk. Perm'. 2022: 24. (In Russ).
5. Pat. RU 2 790 821 C1 Russian Federation, MPK G01N 33/15, A61K 36/42. Method for the quantitative determination of saponins in *Gynostemma pentaphyllum* / E.Kh. Galiakhmetova, A.A. Nizamova, N.V. Kudashkina; zayavitel' i patentoobladatel' federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vysshego obrazovaniya "Bashkirskij gosudarstvennyj meditsinskij universitet" Ministerstva zdavoookhraneniya Rossijskoj Federatsii. – № 2022118006; zayavl. 01.07.2022; opubl. 28.02.2023, Byul. № 7. (In Russ).
6. Craib, W.G. Cucurbitaceae. *Flora Siamensis Enumeratio I* / W.G. Craib. 1931; 1: 750-770. (In English).
7. *Flora of China*. 2011. Link: Available from URL: <http://www.efloras.org/>. (In English). The determination of antioxidant activity of ethanol extracts of *Gynostemma pentaphyllum* / A.A. Nizamova, E.Kh. Galiakhmetova, K.S. Mochalov, N.V. Kudashkina // *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021; 17 (1): 91-98. (In English).
8. The International Plant Names Index. Link: Available from URL: <https://www.ipni.org> (as of July 08, 2020). (In English).
9. Wang, T-X. Bioassay-guided isolation and identification of anticancer and antioxidant compounds from *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino / T-X. Wang, M-M. Shi, J-G. Jiang // RSC Advances. 2018; 8 (21): 23181-23190. (In English).

УДК 547.775, 615.214.2

© Коллектив авторов, 2023

С.О. Шепилова, Е.Э. Клен, А.Ф. Идрисова, И.Л. Никитина  
**РАЗРАБОТКА МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ**  
**3-БРОМ-1-(1,1-ДИОКСОТИЕТАН-3-ИЛ)-**  
**4-НИТРО-N-ФЕНИЛ-1H-ПИРАЗОЛ-5-АМИНА**  
*ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»*  
*Минздрава России, г. Уфа*

Производные пиразола нашли широкое применение как антикоагулянты, противоопухолевые, психотропные и противоспазмолитические средства. Среди тиаптаносодержащих пиразолов найдены соединения с антидепрессивной активностью, перспективные для дальнейших углубленных исследований, одним из которых является 3-бром-1-(1,1-диоксотиетан-3-ил)-4-нитро-N-фенил-1H-пиразол-5-амин (I).

*Цель работы.* Исследование физических, физико-химических свойств и спектральных характеристик перспективной субстанции 3-бром-1-(1,1-диоксотиепан-3-ил)-4-нитро-N-фенил-1H-пиразол-5-амина для разработки методов определения ее подлинности.

*Материал и методы.* Объектом исследования явились 3 опытные партии 3-бром-1-(1,1-диоксотиепан-3-ил)-4-нитро-N-фенил-1H-пиразол-5-амин (I). Растворимость определена в воде и различных органических растворителях. Инфракрасные спектры (ИК-спектры) зарегистрированы на спектрофотометре «Инфралюм ФТ-02», УФ-спектры – на приборе «Shimadzu UV-1800». Для определения подлинности проводили реакцию с раствором натрия гидроксида 20%. Температура плавления