

ВИВЧЕННЯ ВОДОРОЗЧИННОГО ПОЛІСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСУ ТРАВИ ГАЛІНСОГИ ДРІБНОКВІТКОВОЇ

© В. І. Волочай, В. М. Чушенко, В. М. Ковальов, Т. О. Краснікова

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено виділення та дослідження водорозчинного полісахаридного комплексу трави галінсоги дрібноквіткової. Методом паперової хроматографії у складі полісахаридів ідентифіковано галактозу, глюкозу, арабінозу, рамнозу, галактуронову кислоту. Вивчено кінетику гідролізу водорозчинних полісахаридів. У комплексі визначено кількісний вміст відновлювальних та кислих моносахаридів. Методом Т. П. Афанасьєвої та Г. Н. Зайцевої розраховано співвідношення ідентифікованих моносахаридів у виділених полісахаридах. Встановлено вміст амінокислот та мінеральних речовин у полісахаридному комплексі.

Ключові слова: полісахариди, галінсога дрібноквіткова, арабіногалактани.

Вступ. Стандартизація лікарської рослинної сировини (ЛРС) передбачає визначення переважачого класу біологічно активних речовин (БАР), який зумовлює основний фармакологічний ефект. Одним з класів БАР, за вмістом яких можна вести стандартизацію, є полісахариди. Зважаючи на традиційний фітохімічний скринінг, полісахариди вилучають з рослинної сировини водою з подальшим їх висадженням та очищенням, проте разом з ними у цій фракції можуть міститися білкові сполуки та інші речовини [1–4]. Таким чином, сумарний фармакологічний ефект полісахаридної фракції може бути пов'язаний з вмістом супутніх речовин. За літературними даними полісахаридні фракції виявляють широкий спектр активності: відхаркуювальну, протизапальну, противиразкову, ентеросорбційну, імунотропну, противірусну, антимікробну, гемостатичну, ранозагоювальну, гепатопротекторну та інші [1–3, 5–7].

Галінсога дрібноквіткова (*Galinsoga parviflora* Cav.) – поширена в Україні рослина. В країнах Південної Америки, Європи, Африки настої з її трави використовують при цинзі, асциті, токсичному зобі, застуді, болю в спині, маткових кровотечах, ранах та інших патологіях [8, 9].

Полісахариди галінсоги дрібноквіткової мало вивчені. В літературі є повідомлення, що надземна частина цієї рослини містить 10,7 % інуліну [8].

Мета нашого дослідження – виділення водорозчинного полісахаридного комплексу з трави галінсоги дрібноквіткової, вивчення його моносахаридного складу, встановлення кількісного вмісту суми відновлювальних, суми кислих та окремих моносахаридів, дослідження амінокислотного та мінерального складу одержаного комплексу.

Методи дослідження. Об'єкт дослідження трава галінсоги дрібноквіткової, заготовлена на початку цвітіння в червні 2010 року в Полтавській області.

Для виділення полісахаридного комплексу подрібнену сировину тричі екстрагували водою (1:10) на водяній бані протягом години. Витяги об'єднували та концентрували під вакуумом до 1/10 початкового об'єму. Отриманий розчин поміщали у центрифужну пробірку, додавали 96 % етанол у співвідношенні 1:4, перемішували, нагрівали на водяній бані при температурі 60 °С протягом 5 хв і центрифугували зі швидкістю 5000 об./хв протягом 30 хв. Надосадову рідину фільтрували під вакуумом за залишкового тиску від 13 кПа до 16 кПа крізь скляний фільтр ПОР16. Осад переносили на фільтр за допомогою суміші вода–96% етанол (1:2) і послідовно промивали 96 % етанолом, ацетоном, етилацетатом. Фільтр із осадом сушили на повітрі, потім до постійної маси при температурі від 100 до 105 °С. Кількісний вихід комплексу розраховували гравіметричним методом [10].

Для попередньої оцінки природи полісахаридів та присутності домішок проводили якісні реакції їх водного розчину з розчином Люголя; 1% розчином заліза хлориду; 10% розчином купрумсульфату та натрію гідроксиду.

Якісний склад моносахаридів вивчали методом паперової хроматографії на папері FN-1(ПХ) після 0,5, 1, 2 та 3-годинного гідролізу 10% сульфатною кислотою при температурі 100–105 °С [3,11].

Кінетику часткового кислотного гідролізу вивчали за виходом суми нейтральних відновлювальних моносахаридів (СНВМ) спектрофотометричним методом за реакцією з пікриною кис-

лотою в перерахунку на арабінозу. Гідроліз полісахаридів проводили хлороводновою кислотою, розведеною при температурі 100–105 °С, проби контролювали через 0,5, 1, 2 та 3 год [3,11].

Вміст суми кислих моносахаридів розраховували спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з карбазолом в кислому середовищі в перерахунку на галактуронову кислоту [3,11].

Співвідношення моносахаридів в полісахаридному комплексі визначали методом Т. П. Афанасьєвої та Г. Н. Зайцевої після кислотного гідролізу в описаних вище умовах та розділенні суміші нейтральних моносахаридів в тонкому шарі сорбенту [11].

Кількісний вміст білка в полісахаридах визначали за методом Лоурі [12].

Якісний склад та кількісний вміст амінокислот у досліджуваному комплексі визначали за допомогою автоматичного аналізатора амінокислот Т 339 після гідролізу 6М кислотою хлористоводновою, при 130 °С протягом 20 год [12].

Вивчення елементного складу виділеного комплексу проводили методом атомно-емісійної спектрофотометрії за методикою, описаною раніше [12].

Результати й обговорення. Одержаний водорозчинний полісахаридний комплекс г. дрібноквіткової являє собою аморфний порошок світло-сірого кольору, розчинний у воді та нерозчинний в органічних розчинниках. Його вихід складає 12,7 % в перахунку на абсолютну суху сировину, загальна зола – 39,42 % [10].

За результатами якісних реакцій встановлено наявність домішок пептидів у досліджуваному комплексі та відсутність крохмалю і фенольних сполук.

Методом ПХ порівняно з вірогідними зразками моносахаридів після 0,5, 1, 2, 3-годинного гідролізу в полісахаридах були ідентифіковані галактоза, глюкоза, арабіноза, рамноза, галактуронова кислота та нейтральний моносахарид, природу якого не вдалося встановити. За співвідношенням розміру та інтенсивності забарвлення плям на хроматограмах було зроблено висновок, що переважаним моносахаридом комплексу є арабіноза, тому в подальшому всі розрахунки проводили в перерахунку на цю речовину.

Метод часткового розщеплення полімерного ланцюга на блоки – універсальний прийом для

встановлення будови будь-якого полімеру. В ході часткового кислотного гідролізу разом з окремими моносахаридами в розчині залишаються олігосахаридні фрагменти. Різна стійкість глікозидних зв'язків до гідролізу призводить до переважного розщеплення зв'язків, лабільних до кислот і накопичення фрагментів з міцнішими зв'язками [3, 4, 11]. У ході вивчення кінетики часткового кислотного гідролізу встановлено, що одержані полісахариди дуже чутливі до кислот, бо максимальна концентрація моносахаридів в гідролізаті спостерігається через 0,5 год (рис. 1). Подальше проведення гідролізу призводить до їх деструкції [3,11].

Згідно з отриманими даними вміст суми нейтральних відновлювальних моносахаридів в полісахаридному комплексі в перерахунку на арабінозу складає $51,25 \pm 1,53$, вміст суми кислих моносахаридів в перерахунку на галактуронову кислоту – $(2,1 \pm 0,64)$ %.

Співвідношення моносахаридів у досліджуваному комплексі, визначене за методом Т. П. Афа-

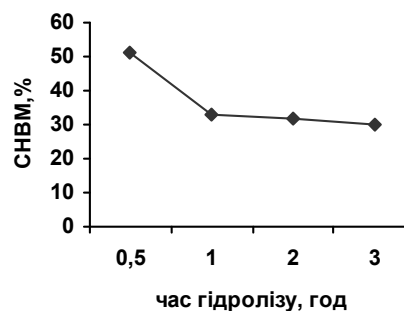


Рис. 1. Кінетика кислотного гідролізу полісахаридного комплексу галінсоги дрібноквіткової.

насьєвої та Г. Н. Зайцевої, представлено в таблиці 1. За отриманими результатами можна зробити висновок, що полісахариди, виділені з галінсоги дрібноквіткової, є сумішшю фітополісахаридів і належить до класу галактанів – арабіногалактанів [1–4, 6]. Цей хемотип зв'язаних резервних полісахаридів формує первинні клітинні стінки у вищих рослин та характеризується високою розгалудженістю молекули [1, 3, 4, 6]. Зважаючи на високу чутливість до кислот, характерну для глікозидних зв'язків фураноз, можна припустити, що приблизно дві третини залишків L-арабінофуранози утворюють бокові ланцюги, а основний скелет молекули формує

Таблиця 1. Вміст моносахаридів у полісахаридному комплексі трави галінсоги дрібноквіткової

№ за/п	Назва моносахариду	Вміст моносахариду, %
1	Галактоза	10,54±0,51
2	Глюкоза	3,80±0,07
3	Арабіноза	35,19±0,47
4	Рамноза	0,85±0,01

D-галактоза, інші моносахариди складають окремі фрагменти молекули [1, 3, 6, 13].

За результатами попередніх реакцій встановлено присутність пептидів в полісахаридному комплексі, тому було встановлено їх кількісний вміст та амінокислотний склад. Кількісний вміст білка в комплексі, визначений за методом Лоурі, склав $(4,92 \pm 0,41)$ %. У результаті вивчення якісного та кількісного складу амінокислот ідентифіковано 17 речовин, серед яких переважають

Таблиця 2. Вміст амінокислот у полісахаридному комплексі трави галінсоги дрібноквіткової

№ за/п	Назва амінокислоти	Вміст амінокислоти, мг/100мг
1	Глутамінова кислота	0,45
2	Лізин	0,36
3	Тирозин	0,36
4	Фенілаланін	0,3
5	Лейцин	0,2
6	Аспарагінова кислота	0,2
7	Гліцин	0,185
8	Валін	0,17
9	Аргінін	0,17
10	Ізолейцин	0,165
11	Серин	0,165
12	Гістидин	0,155
13	Треонін	0,150
14	Пролін	0,145
15	Аланін	0,125
16	Метіонін	0,06
17	Цистин	Сліди

Більшість арабіногалактанів вищих рослин є імуномодуляторами, тому перспективним є дослідження полісахаридного комплексу галінсоги дрібноквіткової на цей вид активності. За літературними даними ці сполуки активують ретикулоендотеліальну систему (РЕС), збільшують фагоцитарний індекс [1, 2, 6, 7]. Біологічна активність цих полісахаридів залежить від особливостей тонкої структури макромолекул, тобто від будови усіх бокових ланцюгів, їх розташування вздовж головного ланцюга, конформації макромолекули, механізму утворення агрегатів [1, 6, 7, 13].

Висновки. 1. Вперше з трави галінсоги дрібноквіткової виділено водорозчинний полісахаридний комплекс та розрахований його вихід – 12,7 %.

2. Методом паперової хроматографії після кислотного гідролізу полісахаридів ідентифіковано галактозу, глюкозу, арабінозу, рамнозу, галактуронову кислоту.

Література

1. Государственный научный центр лекарственных средств. Технология и стандартизация лекарств: сборник научных трудов. – Харьков: ИГ «РИРЕГ», 2000 – Т.2. – 784с.

фіковано 17 речовин, серед яких переважають глутамінова кислота, лізин, тирозин, фенілаланін (табл. 2).

Полісахаридний комплекс має високий показник загальної золи, тому в ході дослідження визначали якісний та кількісний вміст мінеральних речовин (табл. 3). У результаті аналізу встановлено, що комплекс містить значну кількість калію, кальцію та магнію.

Таблиця 3. Вміст мінеральних речовин у полісахаридному комплексі трави галінсоги дрібноквіткової

№ за/п	Назва елемента	Вміст елемента, мг/100мг
1	K	12
2	Ca	6,4
3	Mg	2,4
4	P	0,68
5	Si	0,64
6	Na	0,4
7	Mn	0,08
8	Fe	0,04
9	Al	0,032
10	Sr	0,012
11	Zn	0,004
12	Cu	0,001

3. Співвідношення моносахаридів у полісахаридному комплексі, визначене за методом Т. П. Афанасьєвої та Г. Н. Зайцевої, дає змогу віднести виділені полісахариди до арабіногалактанів.

4. Вміст суми нейтральних відновлювальних моносахаридів у комплексі в перерахунку на арабінозу склав $51,25 \pm 1,53$, вміст суми кислих моносахаридів в перерахунку на галактуронову кислоту – $(2,1 \pm 0,64)$ %.

5. Кількісний вміст білка в комплексі склав $(4,92 \pm 0,41)$ %. У ході вивчення його амінокислотного складу ідентифіковано 17 кислот, серед яких переважають глутамінова кислота, лізин, тирозин, фенілаланін.

6. У результаті вивчення мінерального складу комплексу встановлено, що він містить значну кількість калію, кальцію та магнію.

7. Результати досліджень полісахаридного комплексу галінсоги дрібноквіткової можуть бути викоистані при розробці МКЯ лікарської сировини та дають змогу прогнозувати імуномодульвальну активність виділеного комплексу.

2. Оводов Ю. С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность / Ю. С. Оводов // Биоорганическая химия. – 1998. – Т. 24, № 7. – С. 483-501

3. Химия углеводов / [Кочетков Н. К., Бочков А. Ф., Дмитриев Б. А. В и др.]. – М.: «Химия». – 672 с.
4. Derek Horton. Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry / D. Horton. – Academic Press, 2003. – 472p.
5. Криштанова Н. А. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств / Н. А. Криштанова, М. Ю. Сафонова, В. Ц. Болотова [и др.] // Вестник ВГУ. – 2005. – № 1. – С. 212–221.
6. Арифходжаев А. О. Галактаны и галактансодержащие полисахариды высших растений / А. О. Арифходжаев // Химия природных соединений. – 2000. – № 3. – С. 185–197.
7. Арабиногалактан лиственницы при коррекции фагоцитоза / Медведева С. А., Александрова Г. П., Тюкавкина Н. А. [и др.] // Тез. докл. Всеросс. конф. “Химия и технология растительных веществ” 25-30 сент. 2000. – Сыктывкар, 2000. – С. 103.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae. – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
9. H. M. Burkill The useful plants of West Tropical Africa: Volume 1. / H. M. Burkill – Kew Publishing, 1985. – 976p.
10. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-ше вид. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
11. Соболева В. А. Выделение комплекса полисахаридов каштана конского и изучение его химического состава / В. А. Соболева, В. Н. Чушенко, А. А. Коломиец [и др.] // Провизор. – 2009. – № 16. – С. 23–24.
12. Кошовий О. М. Амінокислотний та мінеральний склад екстрактів із листя евкаліпту/ О. М. Кошовий, А. М. Комісаренко // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 57-61.
12. R. Volk Characterization of an arabinogalactan protein from the pressed juice of Echinacea purpurea: investigations into the type of linkage between the protein and polysaccharide moieties / Rainer-B. Volk, Wolfgang Blaschek, Birgit Classen // Journal of Natural Medicine. – 2007. – Vol. 61. – P. 397 – 401.

ИЗУЧЕНИЕ ВОДОРАСТВОРИМОГО ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА ТРАВЫ ГАЛИНСОГИ МЕЛКОЦВЕТКОВОЙ

В. И. Волочай, В. Н. Чушенко, В. Н. Ковальов, Т. А. Красникова

Национальный фармацевтический университет, Харьков

Резюме: проведено выделение и исследование водорастворимого комплекса травы галинсоги мелкоцветковой. Методом бумажной хроматографии в составе полисахаридов идентифицированы галактоза, глюкоза, арабиноза, рамноза, галактуроновая кислота. Изучена кинетика гидролиза водорастворимых полисахаридов. В комплексе определено количественное содержание восстанавливающих и кислых моносахаридов. Методом Т. П. Афанасьевой и Г. Н. Зайцевой рассчитано соотношение идентифицированных моносахаридов в выделенных полисахаридах. Установлено содержание аминокислот и минеральных веществ в полисахаридном комплексе.

Ключевые слова: полисахариды, галинсога мелкоцветковая, арабиногалактаны.

THE STUDY OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDE COMPLEX OF THE HERB OF GALINSOGA PARVIFLORA

V. I. Volochay, V. M. Chushenko, V. M. Kovalyov, T. O. Krasnikova

National Pharmaceutical University, Kharkiv

Summary: there was conducted the excretion and investigation of water-soluble polysaccharide complex of the herb of Galinsoga parviflora. Using the method of paper chromatography there were identified galactose, glucose, arabinose, rhamnose, galacturonic acid within polysaccharides. Kinetics of hydrolysis of water-soluble polysaccharides was studied. There was determined the quantitative value of regenerative and acidic polysaccharides in the complex. Also there was calculated the content of identified monosaccharides in conducted polysaccharides by the method of T. P. Afanasieva and H. N. Zaytseva, and was determined the content of amino acids and minerals in the polysaccharide complex.

Key words: polysaccharides, Galinsoga parviflora, arabinogalactans.