

ДОСЛІДЖЕННЯ ПОЛІСАХАРИДНИХ КОМПЛЕКСІВ ТА ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ ЛИСТЯ ТА ПАГОНІВ СМОРОДИНИ ЧОРНОЇ

Суцук Н.А., Кисличенко В.С., Кузнєцова В.Ю.

Національний фармацевтичний університет

Вступ. Вуглеводи на ряду з білками і пептидами становлять клас природних сполук, які, в значній мірі, входять до складу рослинного організму і становлять його основну масу. Крім того, їм притаманний різноманітний спектр фармакологічної дії. Полісахариди впливають на різні фізіологічні та біохімічні процеси в рослинах, а також в організмах людей і тварин. Екзогенні полісахариди при введенні в організм можуть зменшувати запалення, прискорювати репаративні процеси, гальмувати ріст пухлин. Вуглеводи можуть також взаємодіяти з іонами важких металів, за рахунок чого їх використовують для лікування і профілактики свинцевих отруєнь та токсикозів, викликаних радіологічними ізотопами. В літературі є відомості про створення на основі пектинових речовин гіполіпідемічних препаратів, а також кровозамінників на основі альгінатів [2].

Об'єктами досліджень були обрані листя та пагони смородини чорної – *Ribes nigrum L.*, родини Grossulariaceae.

Мета та завдання досліджень. Метою нашої роботи було дослідження полісахаридних комплексів, вільних цукрів і органічних кислот листя та пагонів смородини чорної, що є фрагментом науково-дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (номер державної реєстрації 0103U000476). Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

- одержати полісахаридні фракції з лікарської рослинної сировини;
- визначити моносахаридний склад полісахаридних фракцій;
- визначити якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів та органічних кислот.

Матеріали і методи. Об'єктами дослідження були повітряно-сухі подрібнені листя та пагони смородини чорної, заготовлені в серпні 2010 року в Харківській області після збору врожаю плодів смородини чорної.

Для видалення полісахаридних сполук повітряно-суху сировину обох видів подрібнювали до розміру часток, які проходять крізь сито з діаметром отворів 5 мм. 100 г досліджуваної сировини вичерпно екстрагували хлороформом в апараті Сокслета для видалення ліпофільних сполук. Сировину висушували, зважували, спирторозчинні полісахариди (СПП) виділяли 82% спиртом етиловим, екстракцію проводили двічі по дві години.

Для одержання водорозчинних полісахаридів (ВРПС) використовували повітряно-сухий шрот сировини після екстракції 82% спиртом етиловим і видалення спирторозчинних полісахаридів. Повітряно-сухий шрот екстрагували гарячою водою при нагріванні до 95°C протягом 1 год при постійному перемішуванні. Екстракцію ВРПС проводили двічі в тих самих умовах. Рослинний матеріал відділяли центрифугуванням, а об'єднані водні екстракти упарювали на ротацийному випаровувачі до 1/5 об'єму.

Полісахариди висаджували трикратним (по відношенню до водного залишку) об'ємом 96% спирту етилового при кімнатній температурі. Осад, який випав, відфільтровували, промивали спиртом етиловим і ацетоном, потім висушували і зважували [1].

Із шроту, що залишився після видалення ВРПС, виділяли пектинові речовини (ПР). Екстракцію ПР проводили двічі сумішшю 0,5% розчинів кислоти шавлевої і амонію оксалату у співвідношенні 1:1 при 80-85°C впродовж 2-х год. Об'єднані екстракти концентрували і висаджували чотирикратним об'ємом 96% спирту етилового. Одержані осадки відфільтровували, промивали спиртом етиловим, висушували і зважували.

Із шроту, який залишився після видалення пектинових речовин, виділяли геміцелюлози А і Б (ГЦ А і ГЦ Б). Екстракцію проводили 7% розчином натрію гідроксиду у співвідношенні 1:5 впродовж 12 год при кімнатній температурі. При додаванні кислоти оцтової льодяної утворювався осад ГЦ А, який відфільтровували, висушували і зважували. До фільтрату додавали двократний об'єм 96% спирту етилового, при цьому утворювався осад ГЦ Б, який відфільтровували, промивали спиртом етиловим, висушували і зважували [1,2,4].

Для встановлення моносахаридного складу ВРПС, ПР проводили їх гідроліз кислотою сульфатною (1 моль/л) [3,4].

Гідролізати нейтралізували барію карбонатом до нейтральної реакції за універсальним індикатором, розчини фільтрували, фільтри і осадки на фільтрах промивали водою. Фільтрати випарювали під вакуумом до сухого залишку, який розчиняли в 0,5 мл етанолу. Отримані розчини наносили на хроматографічний папір та хроматографували у системі розчинників ацетон-н-бутанол-вода (7:2:1) нисхідним способом у присутності вірогідних зразків моносахаридів. Для ідентифікації вільних цукрів паралельно досліджували фугат, отриманий у ході осадження полісахаридів. Хроматограми після висушування на повітрі обробляли анілінфталатним реактивом і нагрівали в сушильній шафі при температурі 100-105 °С. Моносахариди проявлялися у вигляді червоно-коричневих плям.

Визначення вуглеводів і органічних кислот методом високоефективної рідинної хроматографії. Подрібнену, як зазначено вище, досліджувану сировину близько 10 г (точна наважка) знежирювали петролейним етером тричі по 50 мл впродовж 30 хв при температурі не вище 50 °С. Сировину висушували, зважували і екстрагували 1% розчином натрію ацетату тричі по 30 мл впродовж 30 хв при температурі не вище 50 °С, фільтрували, перенесли в мірну колбу на 100 мл і доводили об'єм розчину до позначки 1% розчином натрію ацетату. Після фільтрування (мембранні фільтри Chromafil GF/PET-45/25) проводили визначення вмісту вуглеводів та органічних кислот за допомогою системи рідинного хроматографа високороздільної здатності Smartline (Knauer, Німеччина) з прямою фазою на колонці 300 × 8 мм, яка була заповнена на-

бивочним матеріалом Eurokat H, 10 мкм. Рухом фаза – 0,01 н розчин кислоти сульфатної, швидкість потоку – 1,0 мл/хв., об'єм проби – 20 мкл. Кількісне визначення – за допомогою рефрактометричного детектора RI Detector 2300 (Knauer, Німеччина). Тиск в колонці підтримувався на рівні 6,3 МПа, температура – 50 °С. Управління хроматографічною системою, отримання хроматограм та обчислювання результатів проводилось за допомогою ПЗ ClarityChrom. Статистичну обробку отриманих даних проводили, використовуючи програму Statistica. В якості стандартів для калібрування хроматографу використовували набір достовірних зразків вуглеводів і органічних кислот, приготування яких здійснювали в 1 % розчині натрію ацетату.

Результати досліджень, їх обговорення. В результаті проведених досліджень були виділені СРП, ВРПС, ПР, ГЦ А, ГЦ Б з листя та пагонів смородини чорної. Вихід для листя смородини чорної СРП склав 3,46 %, ВРПС – 4,84 %, ПР – 2,41 %, ГЦ А – 3,08 %, ГЦ Б – 6,25 %; для пагонів смородини чорної СРП склав 2,84 %, ВРПС - 1,59 %, ПР – 0,67 %, ГЦ А – 2,38 %, ГЦ Б – 3,11 %.

ВРПС, виділені з листя смородини чорної, це аморфний порошок кремового кольору; він добре розчиняється в воді, в водних розчинах кислот і лугів і не розчиняється в органічних розчинниках. Полісахаридний комплекс дає позитивні реакції висадження спиртом, ацетоном, реакцію з реактивом Фелінга після кислотного гідролізу полісахаридів [3,4].

ВРПС, виділені з пагонів смородини чорної – це аморфний порошок світло-коричневого кольору; добре розчиняється в воді, в водних розчинах кислот і лугів і не розчиняється в органічних розчинниках. Полісахаридний комплекс дає позитивні реакції висадження спиртом, ацетоном, реакцію з реактивом Фелінга після кислотного гідролізу полісахаридів [3,4].

ПР з листя смородини чорної – це аморфний порошок кремового кольору, який повільно розчиняється в воді. З водного розчину ПР висаджуються 1% розчином алюмінію сульфату з утворенням пектатів [].

ПР з пагонів смородини чорної – це аморфний порошок кремового кольору, який повільно розчиняється в воді. З водного розчину ПР висаджуються 1% розчином алюмінію сульфату з утворенням пектатів [].

Методом нисхідної паперової хроматографії паралельно з достовірними зразками моносахаридів ВРПС з листя смородини чорної було ідентифіковано арабінозу, галактозу, глюкозу, ксилолу,

рамнозу; в пагонах смородини чорної – глюкозу, арабінозу, ксилолу.

В виділених ПР з листя та пагонів смородини чорної виявлена галактуронова кислота.

Геміцелюлози (ГЦ А і ГЦ Б) являють собою аморфні порошки від світло-коричневого до коричневого кольору. В гідролізаті ГЦ А і ГЦ Б знайдено глюкозу, арабінозу, галактозу.

За розміром плям і інтенсивністю їх забарвлення домінуючим моносахаридом є арабіноза.

Методом високоефективної рідинної хроматографії були визначені вуглеводи і солі органічних кислот в листі та пагонах смородини чорної. Схема хроматограми листя смородини чорної представлена на рис. 1.

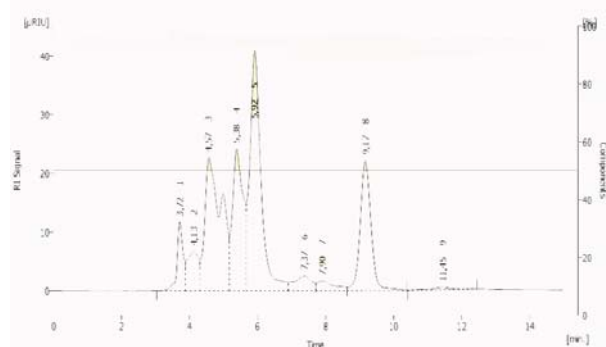


Рис. 1. Схема хроматограми вуглеводів і солей органічних кислот листя смородини чорної.

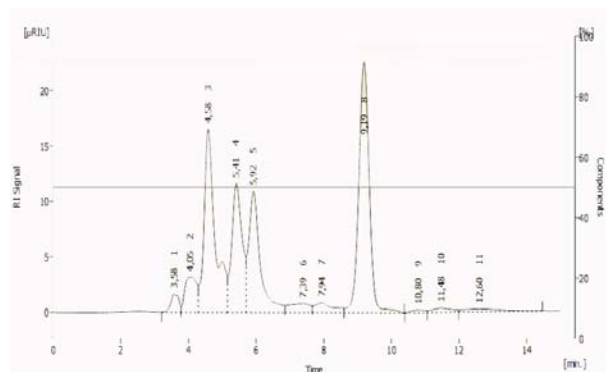


Рис. 2. Схема хроматограми вуглеводів і солей органічних кислот пагонів смородини чорної.

Результати дослідження вуглеводів і солей органічних кислот в листі смородини чорної представлені в таблиці 1.

Таблиця 1. Вміст вуглеводів і солей органічних кислот в листі смородини чорної

	Сахароза + мальтоза	Цитрати	Глюкоза	Фруктоза +х-компонент	Сукцинати
Площа піків, [mRIU/s]	0,436	0,317	0,495	0,917	0,091
C, мг/мл	1,98	1,84	2,30	4,34	0,62
Площа піків, [mRIU/s]	0,42	0,307	0,48	0,891	0,087
C, мг/мл	1,91	1,78	2,23	4,21	0,60
X _{сер.} [mRIU/s]	0,428	0,312	0,488	0,904	0,089
X _{сер.} C, мг/мл	1,95	1,81	2,27	4,27	0,61

Як видно з таблиці 1 в листі смородини чорної присутні такі вуглеводи як сахароза + мальтоза в кількості 1,91 мг/мл; глюкоза – 2,23 мг/мл; фруктоза + х-компонент – 4,21 мг/мл; та солі органічних кислот: цитрати – 1,78 мг/мл; сукцинати – 0,60 мг/мл.

Схема хроматограми вуглеводів і солей органічних кислот пагонів смородини чорної представлена на рис. 2.

Результати дослідження вуглеводів і солей органічних кислот в пагонах смородини чорної наведені в табл. 2.

Таблиця 2. Вміст вуглеводів і солей органічних кислот в пагонах смородини чорної

	Сахароза + мальтоза	Цитрати	Глюкоза	Фруктоза +x-компонент	Сукцинати	Оксалати
Площа піків, [mRIU/s]	0,29	0,081	0,243	0,245	0,043	0,074
C, мг/мл	1,32	0,47	1,13	1,16	0,30	0,53
Площа піків, [mRIU/s]	0,293	0,082	0,247	0,243	0,037	0,077
C, мг/мл	1,33	0,48	1,15	1,15	0,25	0,55
X _{сер.} [mRIU/s]	0,292	0,082	0,245	0,244	0,040	0,076
X _{сер.} C, мг/мл	1,33	0,48	1,14	1,15	0,27	0,55

Як видно з таблиці 2 в пагонах смородини чорної присутні такі вуглеводи, як сахароза + мальтоза в кількості 1,33 мг/мл; глюкоза – 1,15 мг/мл; фруктоза + x-компонент – 1,15 мг/мл; та солі органічних кислот: оксалати - 0,55 мг/мл, цитрати – 0,48 мг/мл; сукцинати – 0,25 мг/мл.

Висновки: 1. Виділено полісахаридні комплекси з листя та пагонів смородини чорної: водорозчинні полісахариди (ВРПС), пектинові речовини (ПР), геміцелюлози (ГЦ) А і Б. Вихід для листя смородини чорної СРП склав 3,46 %, ВРПС – 4,84 %, ПР – 2,41 %, ГЦ А – 3,08 %, ГЦ Б – 6,25 %; для пагонів смородини чорної СРП склав 2,84 %, ВРПС - 1,59 %, ПР – 0,67 %, ГЦ А – 2,38 %, ГЦ Б – 3,11 %.

2. Методом паперової хроматографії паралельно з достовірними зразками моносахаридів в досліджуваних ВРПС, ПР та ГЦ А і Б листя та пагонів смородини чорної визначено мономерний склад цукрів.

3. Методом високоефективної рідинної хроматографії були визначені вуглеводи і органічні кислоти в листі та пагонах смородини чорної. Встановлена наявність сахарози, мальтози, глюкози, фруктози, цитратів, сукцинатів, оксалатів.

4. Одержані результати можуть бути використані при розробці методик контролю якості на лікарську рослинну сировину та отримані з неї субстанції.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Бубенчикова В.Н., Чушенко В.Н. Полисахаридный и аминокислотный состав белокопытника гибридного. Науч. Труды НИИ Фармации МЗ РФ. Москва. – 1995, №34. – С. 193-196.
2. Криворучко О.В., Кисличенко В.С., Ткаченко О.Ю. Кількісне визначення флавоноїдів і полісахаридів у листі чорної смородини, яка культиву-

ється в різних областях України. // Фармацевтичний журнал. - № 5. - 1999. - С. 89-90.

3. Прохорова М.И. Методы биохимических исследований. / М.И. Прохорова – Л.: Химия, 1982. – 272 с.

4. Степаненко Б.Н. Химия и биохимия углеводов / Полисахариды / М., 1978. – 256 с.

Суцук Н.А., Кисличенко В.С., Кузнецова В.Ю. Дослідження полісахаридних комплексів та органічних кислот листя та пагонів смородини чорної // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 6. – С. 188-190.

З листя та пагонів смородини чорної одержані полісахаридні комплекси. Методом нисхідної паперової хроматографії досліджено їх мономерний склад. Високоефективною рідинною хроматографією досліджено склад вуглеводів та органічних кислот.

Ключові слова: полісахаридний комплекс, водорозчинні полісахариди, пектинові речовини, геміцелюлози, смородина чорна, паперова та високоефективна рідинна хроматографія.

Суцук Н.А., Кисличенко В.С., Кузнецова В.Ю. Исследование полисахаридных комплексов и органических кислот листьев и побегов смородины черной // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 6. – С. 188-190.

Из листьев и побегов смородины получены полисахаридные комплексы. Методом нисходящей бумажной хроматографии исследован их мономерный состав. Высокоэффективной жидкостной хроматографией исследован состав углеводов и органических кислот.

Ключевые слова: полисахаридный комплекс, водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, геміцеллюлозы, смородина черная, бумажная и высокоэффективная жидкостная хроматография.

Sushchuk N.A., Kyslychenko V.S., Kuznetsova V.Yu. Research of polysaccharide complexes and organic acids of black currant // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 6. – С. 188-190.

The polysaccharide complexes from black currant were obtained and fractionalized. The monomer content of sugars was studied using paper chromatography. The content of carbohydrates and organic acids was determined by the means of HPLC.

Key words: polysaccharides complexes, water soluble polysaccharides, pectin substances, hemicelluloses, black currant, paper chromatography, HPLC.

Надійшла 11.09.2011 р.

Рецензент: проф. Л.В.Савченкова