

ПОЛИСАХАРИДНЫЙ И АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ ВИДОВ ЛАБАЗНИКА

М.Ю. Круглова¹, Д.С. Круглов¹, М.А. Ханина¹, Н.С. Фурса²

*¹ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России (г. Новосибирск)*

*²ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия»
Минздравсоцразвития России (г. Ярославль)*

В статье приведены результаты сравнительного анализа полисахаридного и аминокислотного состава лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного. С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) установлена близость моносахаридного и аминокислотного состава рассматриваемых видов лабазника. Моносахаридный состав полисахаридов представлен глюкозой, арабинозой, ксилозой и галактозой с несколько различающимся количественным соотношением. Аминокислотный состав представлен 19-ю аминокислотами, общее содержание которых несколько выше в лабазнике вязолистном 10,3% против 8,3% у лабазника шестилепестного.

Ключевые слова: лабазник вязолистный, лабазник шестилепестный, полисахариды, моносахара, аминокислотный состав, ВЭЖХ.

Круглова Мария Юрьевна — аспирант, преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, e-mail: masher8607@mail.ru

Круглов Дмитрий Семенович — кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, e-mail: kruglov_DS@mail.ru

Ханина Миниса Абдуллаевна — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития России, e-mail: khanina06@mail.ru

Фурса Николай Сергеевич — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии и фармацевтической технологии ГБОУ ВПО «Ярославская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, e-mail: rector@yuma.ac.ru

Терапевтическая эффективность растений обусловлена содержанием в них разнообразных биологически активных соединений. Большое значение для нормальной жизнедеятельности организма человека имеют не только вторичные метаболиты растений, но и первичные, такие как полисахариды и аминокислоты. Лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* Maxim.) применяется в официальной медицине для приготовления фитопрепаратов, используемых в качестве ранозаживляющих и противовоспалительных средств. Водные извлечения: отвар и настой цветков проявили в эксперименте выраженный гастро-, гепато-, вазо-, церебропротективное, ноотропное и противодиабетические свойства [1,6].

Наряду с *F. ulmaria* широко распространен лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.). Исходя из принципа филогенетического родства, можно предположить, что *F. hexapetala* будет обладать сходным составом биологически активных соединений и, следовательно, близкой фармакологической активностью.

Целью настоящей работы является сравнительный анализ полисахаридного и аминокислотного состава л.вязолистного и л.шестилепестного.

Материал и методы. Для исследования использовали воздушно-сухое сырье, заготовленное на территории Новосибирской области в фазе цветения.

Общее содержание полисахаридов (ПСХ) определяли гравиметрическим методом. Получали извлечения методом последовательной экстракции водой (водорастворимые полисахариды (ВРПСХ)) и водой, подкисленной кислотой хлористоводородной (пектиновые вещества) с последующим осаждением указанных групп соединений трехкратным объемом 96 % спиртом этиловым [3].

Для определения свободных сахаров [5] навеску измельченного сырья массой 1,0 г помещают в колбу с обратным холодильником и трехкратно экстрагируют свободные углеводы 80 %-ным спиртом этиловым на кипящей водяной бане в течение 1 ч. После охлаждения и фильтрования 0,5 мл раствора переносят в пробирку, приливают 0,5 мл 10 %-ного раствора свинца ацетата, перемешивают и нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения к содержимому пробирки приливают 0,5 мл 10 %-ного раствора натрия сульфата и через 20 мин центрифугируют в течение 10 мин со скоростью вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в другую пробирку, приливают 4 мл 0,2 %-ного раствора антраона в кислоте серной концентрированной, нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. Содержимое пробирки после охлаждения переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл 95 %-ным спиртом этиловым и доводят до метки.

Для определения ВРПСХ остаток сырья после спиртовой экстракции помещают в колбу с обратным холодильником и трехкратно экстрагируют ВРПСХ водой очищенной на кипящей водяной бане. Полученные извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 200 мл. С 2 мл раствора и 4 мл 0,2 %-ного раствора антраона проводят реакцию в кислоте серной концентрированной по вышеописанной схеме.

Остаток сырья после выделения ВРПСХ заливают водой очищенной подкисленной кислотой хлористоводородной до $\text{pH} < 3,5$ и извлекают пектиновые вещества по схеме для ВРПСХ и также проводят реакцию с 0,2 %-ного раствора антраона в кислоте серной концентрированной.

В результате взаимодействия с концентрированной серной кислотой полисахариды и пектины гидролизуются до моносахаридных фракций, которые в свою очередь вступают в реакцию с антроном и образуют хромогенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 424 нм [5]. Содержание групп свободных сахаров, а также полисахаридов и пектинов (X, %) в пересчете на доминирующий моносахарид и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{D \cdot f}{m \cdot E_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot \frac{100}{100 - w}$$

где D — оптическая плотность исследуемого раствора;

f — коэффициент разбавления;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$ — коэффициент экстинкции доминирующего моносахарида;

w — потеря сырья в массе при высушивании, %.

Для определения моносахаридов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) 300 мг сырья помещали в пробирку с завинчивающейся пробкой, добавляли 10 мл воды и нагревали при 90 °С до набухания сырья а затем экстрагировали углеводы 1 час при непрерывном встряхивании при комнатной температуре. Полученное извлечение центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин, и надосадочную жидкость разделяли на две части по 5 мл. К первым 5 мл раствора для осаждения добавляли полисахаридов 300 мг активированного угля и снова центрифугировали 10 мин при 14 000 об/мин. Для определения свободных сахаров аликвоту 20 мкл супернатанта анализировали методом прямофазовой ВЭЖХ с рефрактометрической детекцией с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил/вода в соотношении 70:30 при скорости потока 1 мл/мин.

Определение связанных сахаров производили после кислотного гидролиза оставшейся части исходного раствора по методике [4]. К 20 мкл раствора смеси стандартов в концентрации 1 г/л каждого углевода (внешний стандарт) и исследуемого раствора добавляли 20 мкл раствора внутреннего стандарта (раствор глюкозамина с концентрацией 1 г/л) и высушивали. К высушенной пробе добавляли 20 мкл 0,5 М раствора РМР (1-фенил-3-метил-5-пиразолон) в метаноле и 20 мкл 0,3 М раствора калия гидроксида, тщательно встряхивали и термостатировали при 70 °С в течение 2 часов. После нейтрализации пробы 20 мкл 0,3 М кислотой хлористоводородной и удаления избытка реагента РМР остаток упаривали и растворяли в 500 мкл смеси ацетонитрил/вода (1:9) и анализировали методом ВЭЖХ как описано выше.

Определение аминокислотного состава проводили с помощью аминокислотного анализатора «Hitachi» модели 835 на стальной колонке (0,26 × 15 см), заполненной катионнообменной смолой марки 2619 (Hitachi Custon Ion-Exchange Resin) по методике [2]. Количественная оценка содержания аминокислот проводилась автоматически с измерением площади пиков идентифицированной аминокислоты. Расчёт каждой из них проводили в наномолях в аликвоте, непосредственно использованной для анализа, и в дальнейшем пересчитывали на процентное содержание. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Как следует из приведенных в табл. 1 результатов, количественное содержание различных углеводных фракций в сырье *F. ulmaria* и *F. hexapetala*, определенное разными методами, значимо не различается. Полисахариды имеют одинаковый моносахаридный состав,

представленный глюкозой, арабинозой, галактозой, ксилозой с несколько различающимся количественным соотношением моносахаров.

На основании проведенных исследований аминокислотного состава видно, что в анализируемых образцах сырья аминокислотный состав представлен 19-ю аминокислотами, из которых 8 незаменимых. Количественное содержание суммы аминокислот (в том числе и незаменимых) несколько выше (10,3 и 3,9 %) у *F. ulmaria*, в то время как для сырья *F. hexapetala* содержание аминокислот составляет 8,3 % и незаменимых 3,2 % соответственно (табл. 2).

Таблица 1

Сравнительное содержание углеводов в сырье *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

Растение	Метод анализа	Свободные сахара, %	Пектины, %	ПСХ, %	Glu, %	Ara, %	Gal, %	Xyl, %
<i>F. ulmaria</i>	Гравиметрия	–	4,4	9,2	–	–	–	–
	СФМ	7,2*2	3,8*1	5,5*3	–	–	–	–
	ВЭЖХ	6,1	–	8,5	2,3	3,2	1,4	1,6
<i>F. hexapetala</i>	Гравиметрия	–	5,2	8,1	–	–	–	–
	СФМ	6,3*2	4,6*1	4,8*1	–	–	–	–
	ВЭЖХ	5,7	–	7,0	1,4	2,7	1,6	1,3

Примечание: *1 — в пересчете на галактуроновую кислоту;

*2 — в пересчете на глюкозу;

*3 — в пересчете на арабинозу;

— — определение не проводилось.

Таблица 2

Сравнительное содержание аминокислот в сырье *F. ulmaria* и *F. hexapetala*

Аминокислота	Содержание аминокислот абсолютное (мг) в 1 г сырья и относительное в сумме аминокислот (%)			
	<i>F. ulmaria</i>		<i>F. hexapetala</i>	
	мг	%	мг	%
Аланин	6,13	5,89	4,92	5,90
Глицин	5,44	5,23	4,37	5,24
Серин	5,64	5,42	4,53	5,43
Тирозин	3,43	3,30	2,75	3,30
Цистеин	0,1	0,10	0,08	0,10
Валин	6,22	5,98	4,99	5,99
Изолейцин	4,84	4,65	3,88	4,65
Треонин	4,76	4,58	3,82	4,58
Лейцин	8,44	8,11	6,77	8,12
Метионин	1,11	1,07	0,9	1,08
Фенилаланин	5,93	5,70	4,75	5,70
Аспарагиновая кислота	16,43	15,79	13,19	15,82
Глутаминовая кислота	12,02	11,55	9,65	11,58
Аргинин	5,95	5,72	4,69	5,63
Лизин	7,03	6,76	5,64	6,77
Оксилизин	0,96	0,92	0,77	0,92
Пролин	5,68	5,46	4,56	5,47
Гистидин	2,85	2,74	2,29	2,75
Оксипролин	1,07	1,03	0,81	0,97
Сумма аминокислот	104,03	10,3	83,36	8,3
В т.ч. незаменимых	39,29	37,7	31,52	37,8

Преобладающими компонентами являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты. В то же время аминокислотный спектр, т. е. относительное соотношение аминокислот в сырье исследуемых видов лабазника идентично. В результате проведенных исследований изучен полисахаридный и аминокислотный состав двух, наиболее распространенных видов лабазника. Установлено, что качественный состав первичных метаболитов *F. ulmaria* и *F. hexapetala* сходен. Имеются лишь незначительные отличия в количественном содержании компонентов.

Список литературы

1. Авдеева Е. Ю. Исследование лабазника вязолистного как источника эффективного ноотропного средства : автореф. дис. ... канд. фарм. наук / Е. Ю. Авдеева. — Пермь, ПГФА, 2004. — 24 с.
2. Дармограй С. В. Определение экологической чистоты, заменимых и незаменимых аминокислот в траве волдырника и мягковолосника / С. В. Дармограй, Н. С. Фурса // Рос. мед.-биол. вестн. им. акад. И. П. Павлова. — 2008. — № 4. — С. 130–136.
3. Кочетков Н. К. Химия биологически активных природных соединений / Н. К. Кочетков. — М. : Химия, 1970. — 387 с.
4. Мартынов А. М. Фенольные соединения и водорастворимые полисахариды фиалки Патрэна / А. М. Мартынов, Т. Д. Даргаева // Сиб. мед. журн. — 2009. — № 7. — С. 213–215.
5. Оленников Д. Н. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов / Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева // Химия растительного сырья. — 2006. — № 4. — С. 29–33.
6. Растительные ресурсы России : дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 2. Семейства Actinidiaceae — Malvaceae, Euphorbiaceae — Haloragaceae / Отв. ред. А. Л. Буданцев. — СПб. ; М. : Товарищество научных изданий КМК, 2009. — 513 с.

POLYSACCHARIDIC AND AMINO-ACID STRUCTURE OF THE MOST WIDESPREAD KINDS OF MEADOWSWEET

M.Y. Kruglova¹, D.S. Kruglov¹, M.A. Khanina¹, N.S. Fursa²

¹*SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment» (Novosibirsk c.)*

²*SEI HPE «Yaroslavl State Medical Academy Minhealthsocdevelopment» (Yaroslavl c.)*

The results of comparative analysis of polysaccharides and amino-acid structure of meadowsweet and meadowsweet hexapetalous are presented in the article. Using the HELC method the affinity of monosaccharides and amino-acid structure of surveyed meadowsweets kinds was established. The monosaccharides structure of polysaccharides is presented with glucose, arabinose, xylose and galactose with a little differing quantitative parity. The amino-acid structure is presented by 19 amino acids. Their general maintenance is 10,3 % at meadowsweet and 8,3 % at meadowsweet hexapetalous.

Keywords: meadowseet, meadowsweet hexapetalous, polysaccharides, monosaccharum, amino-acid structure, HELC.

About authors:

Kruglov Dmitry Semenovich — candidate of technical science, senior teacher of pharmacognosy and botany chair at SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment» e-mail: kruglov_DS@mail.ru

Fursa Nikolay Sergeevich — doctor of pharmaceutical sciences, professor, head of pharmacognosy and pharmaceutical technology chair at SEI HPE «Yaroslavl State Medical Academy Minhealthsocdevelopment», e-mail: rector@yma.ac.ru

Kruglova Maria Yurevna — postgraduate, teacher of pharmacognosy and botany chair at SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment», e-mail: masher8607@mail.ru

Khanina Minisa Abdullaevna — doctor of pharmaceutical sciences, professor, head of pharmacognosy and botany chair at SEI HPE «Novosibirsk State Medical University Minhealthsocdevelopment», e-mail: khanina06@mail.ru

List of the Literature:

1. Avdeeva E.Y. Research meadowsweet as a source of effective nootropic agents: an autoref. dis. ... cand. pharm. sciences / E. Y. Avdeev. — Perm, PSPA, 2004. — 24 P.
2. Darmogray S. V. Definition of ecological cleanliness, replaceable and irreplaceable amino acids in a campion grass and myosoton / S. V. Darmogray, N. S. Fursa // Rus. Medical — biol. Bullet. n. a.acad. P.Pavlov. — 2008. — № 4. — P. 130–136.

3. Kochetkov. N. K. Chemistry of biologically active natural bandings / N. K. Kochetkov. — M: Chemistry, 1970. — 387 P.
4. Martynov A. M. Phenolic bandings and water-soluble polysaccharides of violet of Patrena / A. M. Martynov, T. D. Dargaeva //Sib. Medical. magaz. — 2009. — № 7. — P. 213–215.
5. Olennikov D. N. Quantitative definition technique of group structure of vegetative objects carbohydrate complex / D. N. Olennikov, L. M. Tankhaeva // Chemistry of vegetative raw materials. — 2006. — № 4. — P. 29–33.
6. Vegetative resources of Russia: wild-growing floral plants, their compositional analysis and biological activity. V. 2. Families Actinidiaceae — Malvaceae, Euphorbiaceae — Haloragaceae / Ex. edit. A. L. Budantsev. — SPb