

АНАЛИЗ СОСТАВА ВЕЩЕСТВ ПЕРВИЧНОГО СИНТЕЗА РАСТИТЕЛЬНОГО СБОРА

В.Я.Яцюк, О.А. Елецкая

Курский государственный медицинский университет, Курск

Результатами качественного анализа, подтвержденного хроматографическими исследованиями, в составе мочегонного сбора обнаружены вещества первичного обмена: аминокислоты и полисахариды, а также установлен их качественный состав что позволяет прогнозировать возможные фармакологические эффекты, а также предложить выбор методов стандартизации.

Ключевые слова: качественный анализ, синтез, растительный сбор.

Возросший интерес к природным лекарственным средствам, привел к активизации исследований, связанных с разработкой и внедрением в научную медицину новых сборов для лечения различных заболеваний

Многокомпонентные смеси из ЛРС обладают ценным преимуществом перед другими фитопрепаратами: возможность обеспечить основной фармакологический эффект в сочетании с комплексным воздействием на организм больного в целом, а также мягкость действия и отсутствие, как правило, нежелательных побочных явлений. Они достаточно просты в промышленном производстве и относительно дешевы. Перспективность исследований в области разработки сборов определяется не только их терапевтической ценностью, но и наличием в России достаточной сырьевой базы по многим видам лекарственных растений

Для создания растительного препарата эффективного в комплексном лечении заболеваний урогенитального тракта в состав композиций целесообразно включать растения, обладающие противовоспалительным, бактерицидным, а также иммуномодулирующим действием, учитывая хронический характер течения заболеваний, связанный с развитием вторичных иммунодефицитов. На основе наименований лекарственного растительного сырья, обладающего мочегонным, бактерицидным, противовоспалительным и иммуностропным действием нами была составлена рецептура четырех пятикомпонентных мочегонных сборов, в состав которых включены растения, разрешенные к медицинскому применению на территории РФ [3].

По результатам доклинических испытаний наиболее выраженное диуретическое действие показал сбор состава: лист брусники, цветки календулы, трава пустырника, почки березы, листья смородины. Производящие растения достаточно хорошо и подробно изучены и давно применяются в научной медицинской практике.

Определение состава биологически активных веществ сбора было начато с изучения веществ первичного обмена (аминокислот и состава моно- и полисахаридов). Вещества первичного синтеза образуются в процессе ассимиляции, т.е. превращения веществ, поступающих в организм извне, в

вещества самого организма. К веществам первичного синтеза относят также белки, липиды, ферменты, витамины и органические кислоты.

Учитывая, что растительные сборы применяются в виде водных извлечений, в первую очередь, представляет интерес изучение состава тех групп биологически активных веществ, которые извлекаются водой, а именно полисахаридов и аминокислот [2].

Материалы и методы

В водных извлечениях из образцов сбора определяли свободные и связанные сахара. Свободные сахара определяли:

- по реакции Бертрана: 1 мл водного извлечения нагревали на водяной бане с 1 мл реактива Фелинга, при этом появлялся кирпично-красный осадок меди (I) оксида.

- по реакции с реактивом Несслера: к 1 мл очищенного водного извлечения прибавляли 1 мл реактива Несслера и нагревали на кипящей водяной бане, при этом выпадал черный осадок ртути (I) оксида .

Связанные сахара определяли:

- по реакции Бертрана: 1 мл водного извлечения нагревали на водяной бане с 1 мл кислоты серной 10% в течение 5 минут для достижения гидролиза. После охлаждения к гидролизату прибавляли 1 мл реактива Фелинга, при этом появлялся кирпично-красный осадок меди (I) оксида, по объему превышающий аналогичный при определении свободных сахаров.

- по реакции с α -нафтолом: к 1 мл водного извлечения прибавляли 20% этанольный раствор α -нафтола, а затем по каплям серную кислоту. На поверхности раздела фаз появлялось красное кольцо [2,5].

Для качественного обнаружения аминокислот в водном извлечении сбора использовали нингидриновую реакцию: к 1мл очищенного водного извлечения добавляли 1 мл 0,25% этанольного раствора нингидрина и осторожно нагревали. Появлялось красно-фиолетовое окрашивание, усиливающееся при охлаждении [6,7]

Для установления качественного состава сбора использовали методы хроматографии в тонком слое сорбента в различных системах растворителей в зависимости от физико-химических свойств определяемых БАВ.

Хроматографическое определение аминокислот проводили в системах растворителей бутанол-уксусная кислота ледяная - вода (4:1:2), (12:3:5), бутанол-диэтиловый эфир-уксусная кислота ледяная - вода (9:6:3:1), бутанол-пиридин-вода (6:4:3), используя очищенные водные извлечения [1,2,4,7].

На хроматографическую пластинку размером 150×120 мм «Силуфол» наносили на расстоянии 1 см от нижнего края по 0,2 мкг извлечения из сбора и по 0,2 мкг 0,5% водных растворов стандартных образцов аминокислот. Пластинку с нанесенными образцами помещали в хроматографическую камеру, предварительно в течение часа насыщенную парами смеси растворителей, и хроматографировали восходящим способом. После прохождения фронтом растворителя расстояния 10 см, пластинку извлекали из камеры, просушивали на воздухе. Затем пластику равномерно обрабатывали 0,25% раствором нингидрина в ацетоне, нагревали в сушильном шкафу при температуре 105°С в течение 2-3 минут. Аминокислоты в видимом свете визуализировались в виде розово-пурпурных пятен (табл.1) [1,6] .

Таблица 1.

Результаты тонкослойной хроматографии аминокислот водного извлечения мочегонного сбора в системах растворителей бутанол-уксусная кислота ледяная - вода (12:3:5) (I), бутанол-пиридин-вода (6:4:3) (II).

Номер пятна	R _f		Цвет пятна в после обработки 0,25% раствором нингидрина	Аминокислота
	Система (I)	Система (II)		
1	0,12	0,22	серовато-красный	гистидин
2	0,13	0,16	пурпурная	лизин
3	0,14	0,18	пурпурная	аргинин
4	0,23	0,27	пурпурная	серин
5	0,22	0,31	серовато-красный	глицин
6	0,25	0,19	синяя	аспарагиновая кислота
7	0,28	0,34	пурпурная	треонин
8	0,31	0,20	пурпурная	глутаминовая кислота
9	0,32	0,38	пурпурная	аланин
10	0,47	0,54	синяя	тирозин
11	0,51	0,37	пурпурная	валин
12	0,60	0,56	синяя	фенилаланин
13	0,72	0,63	пурпурная	лейцин

Идентификацию сахаров, входящих в состав полисахаридного комплекса (ПСК) проводили после кислотного гидролиза, в результате которого расщепляются гликозидные связи. Для полного гидролиза полисахаридов использовали серную кислоту, поскольку она вызывает наименьшие разрушения продуктов гидролиза и легко удаляется из гидролизата карбонатом бария. Оптимальные условия гидролиза полисахаридов устанавливали экспериментально. Для определения условий гидролиза применяли серную кислоту различной концентрации и определяли время полного гидролиза с через 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 часов по количеству восстанавливающих сахаров [6].

Для этого по 0,01 г (точные навески) ПСК помещали в ампулы и растворяли в 2,5 мл растворов кислоты серной различной концентрации (1-10%). Ампулы запаивали и нагревали при температуре 100°C в течение 2-8 часов. После указанного промежутка времени отбирали пробы гидролизата полисахаридного комплекса. После охлаждения содержимое ампул количественно переносили в стаканчик, разбавляли водой до 15 мл. Раствор нейтрализовали сухим бария карбонатом до нейтральной реакции. Осадок бария сульфата отфильтровали, промывали водой. Фильтрат сгущали под вакуумом на водяной бане до 5 мл.

Продукты гидролиза (нейтральные сахара) осаждали 15 мл этанола 96%. Сформировавшийся осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали до 2 мл (раствор А). Осадок бариевых солей кислых сахаров (уроновых кислот) диспергировали в 5 мл очищенной воды и фильтровали через слой катионита КУ-2 (H⁺). Элюат, содержащий кислые сахара концентрировали в вакууме при 40-50°C до 2 мл (раствор Б).

1. Раствор А хроматографировали на бумаге в системах растворителей этилацетат-пиридин-вода (12:5:4), пропанол-этилацетат-вода (7:1:2), н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3), а раствор Б в системе этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (18:3:1:4) с достоверными образцами сахаров. В качестве проявителя использовали раствор анилингидрофтала. Обработанные хроматограммы нагревали в сушильном шкафу в течение 15-20 минут при температуре 100°C [6,7] Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии [Текст] / М.Шаршунова, В.Шварц, У. Михалец.– М.: Мир, 1980. - Т.1.– 288 с.,– М.: Мир, 1980. - Т.2.– 319 с.

. В растворе А были идентифицированы лактоза, ксилоза, галактоза, глюкоза, арабиноза и рамноза. (табл. 2). Причем дисахарид лактоза обнаруживали только в пробах после 2-4 часового гидролиза ПСК.

Таблица 2.

Тонкослойная хроматография нейтральных моносахаров ПСК мочегонного сбора (раствор А) в системах растворителей: I – н-бутанол-пиридин-вода (6:4:3); II – этилацетат - пиридин -вода (12:5:4); III – пропанол-этилацетат-вода (7:1:2).

Номер пятна	Значение Rf в различных системах растворителей			Идентифицировано
	I	II	III	
1	0,29	0,42	0,84	галактоза
2	0,34	0,50	0,50	глюкоза
3	0,42	0,65	0,58	арабиноза
4	0,45	0,80	0,63	ксилоза
5	0,49	0,75	0,88	рамноза

При хроматографировании раствора Б в системе этилацетат-уксусная кислота-муравьиная кислота-вода (8:3:1:4) было идентифицировано одно вещество с R_f=0,32 – глюкуроновая кислота.

Выводы.

В ходе анализа в составе растительного сбора обнаружены вещества первичного обмена: аминокислоты и полисахариды, качественный состав которых подтвержден хроматографическими исследованиями. Полученные сведения о качественном составе веществ первичного обмена позволяют прогнозировать и объяснять некоторые аспекты разностороннего фармакологического воздействия сбора при различных патологических состояниях, в частности, именно полисахариды обладают противовоспалительными и иммуномодулирующими свойствами, влияют на процессы физиологической и репаративной регенерации, аминокислоты нормализуют обменные процессы и улучшают трофику тканей в месте воспаления. С другой стороны, на основе полученных сведений возможна

разработка метода стандартизации сбора, как лекарственного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Доржбал, Э. Изучение аминокислотного состава антимикробного сбора и сухого экстракта/ Э. Доржбал, Ермакова В.А. // Материалы V международного съезда «актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения».– СПб., 2001.– С.375– 379.
2. Елецкая, О.А. Фармакологические и фитохимические исследования по разработке рецептуры мочегонного сбора// О.А. Елецкая, В.Я.Яцок, Г.А.Чалый// Прикладные информационные аспекты медицины: научно–практический журнал. – Воронеж: ВГМА им. Н.Н. Бурденко, 2006. – Т.9.№2.- С.132–139
3. Киселева, Т.Л. Разработка алгоритма действия по составлению сборов на основе опыта традиционной медицины России/ Т.Л. Киселева, А.В. Чаузова, А.А. Карпеев //Фармация. – 2000.– №2. – С.15– 18
4. Лебедев, А.В. Аминокислотный состав зверобоя четырехгранного/ А.В. Лебедев //Современные проблемы фармакогнозии и фитотерапии: межвуз. сб. науч. трудов, посв. 15– летию каф. фармакогнозии ЯГМА. – Ярославль: ЯГТУ, 1999. – С. 21– 22.
5. Лобанчикова, Н.В. Разработка и стандартизация седативных растительных сборов: Автореф. дис. ...канд.ф. наук. (15.00.02) / Н.В. Лобанчикова; 1 ММИ. – М., 1991.– 27с.
6. Никитина, Л.Е. Физические методы идентификации органических соединений/ Л.Е. Никитина, В.В Племенков. – Казань, 2003. – 92с.
7. Шаршунова, М. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии / М.Шаршунова, В.Шварц, У. Михалец.– М.: Мир, 1980. - Т.1.– 288 с.,– М.: Мир, 1980. - Т.2.– 319 с.

THE ANALYSIS OF PRIMARY SYNTHESIS SUBSTANCES IN PLANT SPECIES

V.Ya. Yatzuk, O.A.Eletskaia

The results of the qualitative analysis confirmed by a chromatographic assay have revealed in the composition of a diuretic plant species some substances of primary metabolism: amino-acids and polysaccharides, their qualitative composition having been also determined, which gives the opportunity of predicting the possible pharmacological effects and offering a choice of standardization methods

Key words: *qualitative analysis, synthesis, vegetable collection*

Яцок Валентина Яковлевна – заведующая кафедрой биоорганической химии, д. фарм. наук, профессор Курского государственного медицинского университета; main@kgmu.kursknet.ru