

# ИССЛЕДОВАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ ТРАВЫ БОЛИГОЛОВА ПЯТНИСТОГО *CONIUM MACULATUM L.*

Т.В. Булгаков, Н.В. Кудашкина, С.Р. Хасанова, М.В. Белоусов, С.В. Кривощекhov  
ГБОУ ВПО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (г. Уфа)

## Study on the polysaccharides of *Conium maculatum L.* grass

T.V. Bulgakov, N.V. Kudashkina, S.R. Khasanova, M.V. Belousov, S.V. Krivoshchekov  
Bashkir state medical university (Ufa, Russia)

### РЕЗЮМЕ

Полисахариды обладают широким спектром фармакологической активности: противовоспалительной, иммуностимулирующей, ранозаживляющей, смягчительной, желчегонной, обволакивающей и противоопухолевой. Проведено исследование по выделению и изучению компонентного состава полисахаридного комплекса травы болиголова пятнистого, произрастающего на территории Республики Башкортостан. С использованием метода тонкослойной хроматографии после проведения кислотного гидролиза предварительно установлено присутствие моносахаридов: глюкозы, мальтозы, рамнозы, галактозы и сахарозы. Методом ГХ-МС по совпадению с библиотечными спектрами были идентифицированы в составе водорастворимых полисахаридов (ВРПС) – 5 моносахаридов. На основании проведенных исследований с использованием ВЭЖ установлено, что комплекс ВРПС травы болиголова пятнистого имеет распределение полисахаридов по молекулярной массе 1359 кДа и 9,5 кДа.

Полученные результаты могут быть использованы для разработки нормативной документации на траву болиголова пятнистого и препаратов, полученных на ее основе.

**Ключевые слова:** болиголов пятнистый, водорастворимые полисахариды, хроматография, моносахариды.

### RESUME

Polysaccharides have wide range pharmacological activity: anti-inflammatory, immune stimulating, wound healing, softening, cholagogue, encapsulating and antitumorigenic. Polysaccharides were isolated from *Conium maculatum L.* grass growing on the territory of the Republic of Bashkortostan. Using thin-layer chromatography after acid hydrolysis 5 monosaccharides were identified by comparison with library spectrums: glucose, maltose, rhamnose, galactose and saccharose. Using HPLC method water soluble polysaccharides with molecular mass 1359 and 9.5 kDa were identified.

The results can be used for preparation of normative documents describing *Conium maculatum L.* and preparations produced from it.

**Keywords:** *Conium maculatum L.*, water-soluble polysaccharides, chromatography, monosaccharides.

### ВВЕДЕНИЕ

Среди большого класса природных соединений внимание исследователей привлекают полисахариды, которые долгое время считались группой сопутствующих веществ. Полисахариды применяются в медицинской практике для профилактики и лечения ряда заболеваний различной этиологии. Они обладают широким спектром фармакологической активности – оказывают противовоспалительное, ранозаживляющее, смягчительное, желчегонное, обволакивающее и противоопухолевое

действие. Они повышают общую сопротивляемость организма, стимулируя ретикуло-эндотелиальную систему, и, хотя, ряд полисахаридов вызывают торможение роста опухоли Эрлиха, спонтанного рака молочной железы – все же только саркомы подвергаются эффективной регрессии вплоть до полного выздоровления животных [2, 3, 4].

Доказано, что полисахариды способны стимулировать клеточный и гуморальный иммунитет, проявлять иммуномодулирующие свойства при иммунодефицитных состояниях.

Кроме того, полисахариды потенцируют иммуностимулирующее действие флавоноидов. Смеси полисахаридов, содержащие D-глюкозу, D-галактозу, L-арабинозу, D-глюкуроновую кислоту, относятся к иммуностимуляторам, влияющим на иммунный ответ и фагоцитоз [1]. Однако в доступной литературе нами не обнаружено данных о содержании и характеристике полисахаридов в траве болиголова пятнистого.

**Целью данного исследования** явилось выделение полисахаридного комплекса из травы болиголова пятнистого, его количественное определение, а также исследование мономерного состава и молекулярно-массового распределения полисахаридов хроматографическими методами.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трава болиголова пятнистого была заготовлена в период цветения от дикорастущих растений, произрастающих в различных районах Республики Башкортостан в 2010–2014 гг. Сырье хранилось в соответствии с требованиями нормативной документации (ОСТ 64-4-143-75 и ГФ СССР XI изд.) при комнатной температуре, в сухом, хорошо вентилируемом помещении, не зараженном амбарными вредителями, без прямого попадания солнечных лучей.

Выделение водорастворимых полисахаридов (ВРПС) осуществляли путем двукратной экстракции водой очищенной, подкисленной 0,5 % раствором хлористоводородной кислоты до pH = 1-2 (нагревание 1 час; отстаивание 24 часа; далее нагревание 1 час) и последующим осаждением полисахаридов 95 % этиловым спиртом, с последующей фильтрацией, растворением осадка в воде и диализом через полупроницаемую мембрану с пропускающей способностью MWCO (Molecular weight cut-off) 3-6 кДа в течение 48 ч в 50-кратном объеме очищенной воды при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке, меняя воду через 24 ч. После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали.

Количественное содержание ВРПС определяли гравиметрическим способом после высушивания осадка [5]. В полученной фракции определяли общее содержание урановых кислот карбазол-серным методом, для количественного определения белковых примесей использовали метод Лоури в соответствии с ГФ СССР XI издания (1989) и по T. Bitter et al. (1962).

Для установления моносахаридного состава проводили гидролиз ВРПС раствором трифторуксусной кислоты (4 моль/л) при температуре 100 °С в течение 5 часов [6].

Моносахариды идентифицировали хромато-масс-спектрометрическим методом (ГХ-МС) в виде соответствующих триметилсилильных (ТМС) производных моносахаридов после предварительного гидролиза 4 М трифторуксусной кислотой. Кислотный гидролиз проводили следующим образом: точную навеску фракции полисахаридов (10 мг) помещали в ампулу объемом 10 мл, добавляли 2 мл 4 М трифторуксусной кислоты. Ампулу запаивали и выдерживали в сушильном шкафу при температуре 100 °С (5 часов). После охлаждения, содержимое ампулы переносили в колбу и упаривали на ротаторном испарителе, добавляя трижды по 0,5 мл метилового спирта для освобождения от остатков трифторуксусной кислоты. Сухой остаток растворяли в 95 % этиловом спирте, фильтровали и переносили в чистую колбу, в которой раствор высушивали до постоянной массы при температуре 50 °С.

Для получения ТМС-производных к остатку моносахаридов, полученному после кислотного гидролиза, добавляли безводный пиридин (100 мкл) и N-триметилсилилимидазол (30 мкл), закрывали плотно крышкой и оставляли на 25 минут в сушильном шкафу (75 °С), потом охлаждали и добавляли по 1 мл гексана, перемешивали и верхний слой отбирали на ГХ-анализ.

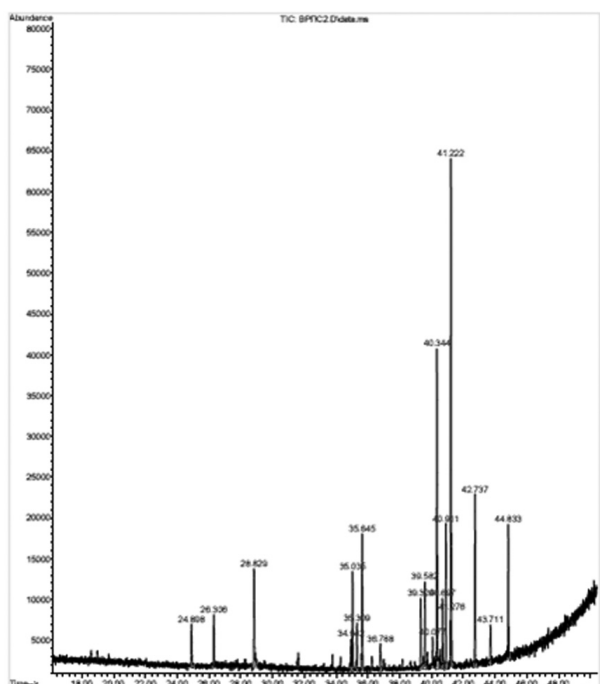
Разделение ТМС-образцов проводили на газовом хроматографе Agilent 7890A (США) на колонке HP-1MS 30 м, состоящей из полидиметилсилоксана, внутренний диаметр капилляра 0,25 мкм, скорость потока газа-носителя (He) 1 мл/мин., в градиенте температур: 70 град. – 2 минуты, далее 10 градусов в минуту (до 300 град.), температура инжектора 280 град., детектирование велось на масс-спектрометре Agilent 5975S (США) ионизация электронным ударом, сканирование m/z 33-600, температура ионного источника 120 град.

Анализ молекулярно-массового распределения проводили на жидкостном хроматогра-

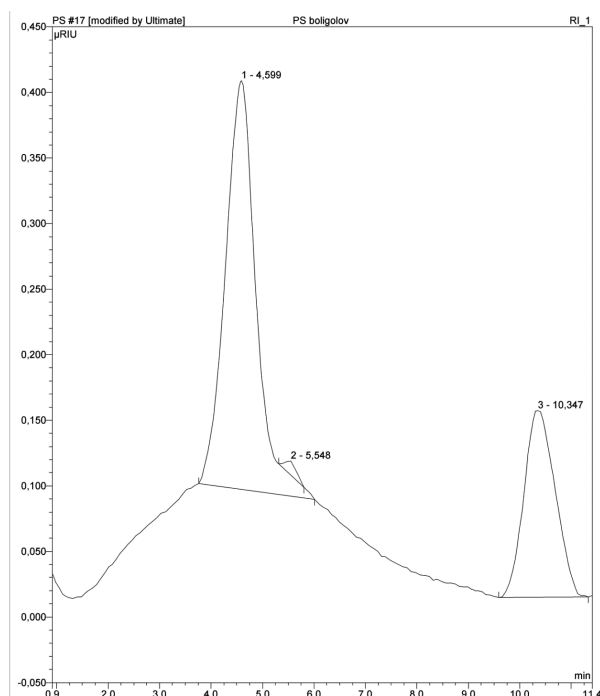
Таблица 1

#### Содержание белков и урановых кислот в ВРПС из травы болиголова пятнистого

Фракция полисахаридов	Содержание урановых кислот, %	Содержание белка, %
ВРПС	20,5 ± 0,3	5,74 ± 0,06



**Рис. 1.** Хроматограмма триметилсилильных производных моносахаридов ВРПС травы болиголова пятнистого (по оси абсцисс – время удерживания в мин, по оси ординат – интенсивность ионного тока в Abundance).



**Рис. 2.** Эксклюзионная хроматограмма образца ВРПС травы болиголова пятнистого (по оси абсцисс – время удерживания в мин., по оси ординат – показатель преломления в RIU).

фе Ultimate 3000 (Германия, «Dionex»), оснащенном рефрактометрическим детектором. Условия хроматографирования: колонка TSK GMPW<sub>XL</sub>, 300×78 мм, 13мкм, подвижная фаза – вода, скорость потока 1 мл/мин, температура термостата колонок – 30 °С. Детектирование рефрактометрическое, температура ячейки детектора 40 °С. При расчете молекулярно-массового распределения был использован калибровочный график, построенный по стандартам декстранов в диапазоне 1 – 2000 кДа (Sigma).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты выхода водорастворимых полисахаридов (ВРПС), содержание в них урсонных кислот и белковых примесей приведены в табл. 1. Согласно полученным данным (табл.1), фракция ВРПС содержит достаточно высокое количество примесей белковых соединений, что необходимо учитывать в дальнейших исследованиях, связанных с выделением и очисткой полисахаридов из лекарственного растительного сырья. По данным литературы значительное содержание урсонных кислот в полисахаридном комплексе (в ВРПС – 20,5 ± 0,3 %) может обуславливать терапевтический эффект, связанный с противовоспалительной и антимикробной активностью [5, 6].

Состав моносахаридов предварительно определяли после кислотного гидролиза методом хроматографии на бумаге в системе растворителей этилацетат – уксусная кислота – муравьиная кислота – вода (18:3:1:4) и в тонком слое сорбента (ТСХ) на пластинке «Silufol UV-254» в системе растворителей бутанол – ацетон – вода (4:5:1) с достоверными образцами моносахаридов. Хроматограммы после высушивания на воздухе обрабатывали анилинфталатным реактивом и нагревали в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С. Моносахариды проявлялись в виде красновато-коричневых пятен. В полисахаридном комплексе были обнаружены глюкоза, мальтоза, рамноза, галактоза и сахароза.

После предварительных исследований методом тонкослойной хроматографии мономерный состав полисахаридов изучали с использованием метода ГХ-МС полученных ТМС-производных (рис. 1).

По совпадениям с библиотечными масс-спектрами идентифицировано пять моносахаридов во фракции ВРПС (табл. 2). Согласно полученным данным, полисахаридный комплекс

Таблица 2

**Мономерный состав ВРПС травы болиголова пятнистого (результаты ГХ-МС)**

Фракция полисахаридов	Глюкоза, %	Галактоза, %	Арабиноза, %	Манноза, %	Галактуроновая кислота, %
ВРПС	16,22 ± 0,74	59,35 ± 2,7	10,39 ± 0,45	8,50 ± 0,32	5,54 ± 0,17

ВРПС в качестве макрокомпонентов содержит глюкозу, галактозу, арабинозу, маннозу и минорный моносахарид – галактуроновую кислоту (табл. 2).

При исследовании ВЭЖХ-граммы ВРПС травы болиголова пятнистого было установлено, что ВРПС имеют широкое молекулярно-массовое распределение, на хроматограмме детектируются два основных пика со временами удерживания 4,599 мин. и 10,347 мин. и состоят из полисахаридов с молекулярной массой 1359 кДа и 9,5 кДа с относительным содержанием 59,34 и 39,79 %, соответственно (рис. 2).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что фракция водорастворимых полисахаридов травы болиголова пятнистого представляет собой полисахаридный комплекс с примесью (5,74 ± 0,06 %) белка. Содержание уоновых кислот, в пересчете на галактуроновую кислоту, по данным спектрофотометрического метода определения составляет 20,5 ± 0,3 %. В состав ВРПС входят мажорные компоненты – глюкоза, галактоза, арабиноза, манноза и минорный моносахарид – галактуроновая кислота. Анализ молекулярно-массового распределения методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии показал, что комплекс ВРПС травы болиголова пятнистого имеет широкое распределение полисахаридов по молекулярной массе от 1359 кДа (основная фракция – 59,34 %) до 9,5 кДа (39,79 %).

**ВЫВОДЫ**

1. Выделен комплекс водорастворимых полисахаридов из травы болиголова пятнистого.
2. Спектрофотометрическим методом в нем установлено содержание уоновых кислот в пересчете на галактуроновую кислоту 20,5 ± 0,3 %.
3. Установлено, что полисахаридный комплекс состоит из следующих моносахаров: глюкозы, галактозы, арабинозы, маннозы, галактуроновой кислоты.
4. На основании ВЭЖХ-анализа установ-

лено, что комплекс водорастворимых полисахаридов травы болиголова пятнистого состоит из двух полисахаридов с молекулярной массой 1359 кДа и 9,5 кДа.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Бакуридзе А.Д. Иммуномодуляторы растительного происхождения (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – №8. – 1993. – С.43–48.
2. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.
3. Гончаров А.И., Исанова Г.И., Халеева Л.И. Исследование растительного полисахаридного комплекса. Актуальные вопросы поиска и технологии лекарств. – Харьков, 1981. – 238 с.
4. Турова А.Д., Гладких А.С. Биологическая активность полисахаридов растительного происхождения // Фармакология и токсикология. – 1965. – Т. 28. – С.498.
5. Соболева В.А., Чушенко В.Н., Коломиец А.А., Данькевич О.С. Выделение комплекса полисахаридов каштана конского и изучение его химического состава // Провизор. – 2009. – №16. – С.21–24.
6. Степаненко Б. Н. Химия и биохимия углеводов (полисахариды). – М.: Высш. школа, 1978. – 256 с.

**Адрес автора**

Д.фарм.н., профессор Кудашкина Н.В.  
phytoart@mail.ru