

Моносахаридный состав полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи

Корж А.П.¹, Гурьев А.М.¹, Белоусов М.В.¹, Юсубов М.С.^{1,2}, Белянин М.А.²

Monosaccharide composition of leaves *Tussilago farfara* the polysaccharide complex

Korzh A.P., Guriyev A.M., Belousov M.V., Yusubov M.S., Belyanin M.L.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Томский политехнический университет, г. Томск

© Корж А.П., Гурьев А.М., Белоусов М.В. и др.

Изучен состав водорастворимых полисахаридов листьев мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.), обладающих противоаллергическими свойствами. Показано, что данный полисахаридный комплекс состоит из галактуронана I (33%) и нейтральных полисахаридов (67%).

Ключевые слова: полисахариды растений, *Tussilago farfara*, уроновые кислоты, нейтральные полисахариды.

The composition of water-soluble polysaccharides of the leaves *Tussilago farfara* L., possessing anti-allergic properties. It is shown that the polysaccharide complex consists of galacturonic acid I (33%) and neutral polysaccharides (67%).

Key words: plant polysaccharides, *Tussilago farfara*, uronic acids, neutral polysaccharides.

УДК 615.322.074:547.455/.458:582.998.1

Введение

Мать-и-мачеха (*Tussilago farfara* L.) семейства *Asteraceae* — многолетнее травянистое растение высотой 10—25 см. Распространена мать-и-мачеха по всей европейской части России, на Кавказе, в Сибири, горных районах Казахстана и Средней Азии. Растет на глинистой почве на полях и в оврагах [3].

Листья мать-и-мачехи содержат горькие гликозиды (до 2,63%), полисахариды, ситостерин, галловую, яблочную и винную кислоты, сапонины, каротиноиды (5,18%), аскорбиновую кислоту (5 мг%), инулин и др. [4, 5, 8]. Углеводные цепи полисахаридов этого растения содержат остатки гликуроновых кислот, арабинозы, галактозы, рамнозы, ксилозы, глюкозы и маннозы. В качестве нейтральных моносахаридов в их состав входят рамноза, арабиноза и галактоза [7].

В ранее проведенных исследованиях установлено, что водорастворимые полисахариды листьев мать-и-мачехи проявляют выраженные иммуноотропные свойства и перспективны для терапии иммуноглобулин Е-зависимых заболеваний (атопического дерматита, бронхиальной

астмы, атопического ринита, крапивницы, пищевых аллергий и др.) [2]. Наряду с этим известно, что химическая структура полисахаридов природного происхождения тесно связана с их биологическими свойствами.

Цель настоящей работы — изучение мономерного состава комплекса водорастворимых полисахаридов листьев мать-и-мачехи.

Материал и методы

В работе использованы листья мать-и-мачехи (*Tussilago farfara* L.), собранные в местах естественного произрастания на территории Томской области и Алтайского края в 2009—2010 гг. После сбора растительное сырье высушивали на воздухе, под навесом, при температуре 15—25 °С в течение 3—10 сут.

Полисахаридный комплекс (ПСК) выделяли из растительного сырья по следующей методике: 20 г листьев мать-и-мачехи экстрагировали раствором 2 мл концентрированной кислоты хлористо-водородной в 400 мл воды очищенной (рН 4,0) при соотношении сырья и экстрагента, равном 1 : 20 при нагревании на кипящей

водяной бане и периодическом перемешивании в течение 3—4 ч. После отделения частиц сырья путем фильтрования через многослойный тканевый фильтр фильтрат упаривали на роторном испарителе при температуре не более 50 °С до 1/5 от исходного объема. К полученному раствору добавляли трехкратный объем 96%-го спирта этилового и отстаивали 24 ч при температуре 2—4 °С, затем осадок отфильтровывали через бумажный фильтр и растворяли в 100 мл воды очищенной при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 ч при комнатной температуре. Нерастворившийся остаток, представляющий собой мельчайшие частицы сырья и денатурированный белок, отделяли центрифугированием (4 000 об/мин в течение 30 мин). Центрифугат диализовали через полупроницаемую мембрану с диаметром пор 15 кДа (Orange Scientific, Бельгия) в течение 48 ч в 5 л воды очищенной с добавлением 0,01%-го раствора натрия азида в качестве консерванта при комнатной температуре и перемешивании на магнитной мешалке, меняя воду через 24 ч. После диализа раствор замораживали и лиофильно высушивали.

Содержание уроновых кислот (УК) в ПСК определяли спектрофотометрическим методом по реакции с карбазолом (модификация с добавлением кислоты сульфаминовой) с применением градуировочного графика, построенного для кислоты галактуроновой [10]. Содержание белка определяли по методу Лоури с применением градуировочного графика для бычьего сывороточного альбумина [12]. Содержание нуклеиновых кислот устанавливали методом Спирина [9]. Оптическую плотность растворов измеряли на спектрофотометре Unicо 2800 (США).

Разделение ПСК на фракции проводили на колонке с DEAE-целлюлозой (Servacelle DEAE-52, США). Навеску ПСК (0,3 г) растворяли в воде очищенной (25 мл) при перемешивании на магнитной мешалке в течение 3 ч, далее центрифугировали при 5 000 об/мин в течение 30 мин. Полученный раствор наносили на колонку (24 × 2,5 см) с DEAE-целлюлозой. Колонку последовательно промывали растворами натрия хлорида с возрастающей концентрацией — 0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0 моль. Скорость элюента 46 мл/ч, отбирали фракции по 20 мл. Наличие полисахаридов во фракциях детектировали по положительной реакции с фенолом в присутствии концентрированной серной кислоты [11]. Фракции концентрировали на концентраторах Vivaspin 20 (Sartorius, Германия) с диаметром пор 5 кДа до 0,5—1,0 мл

при 5 000 об/мин, промывая 2—3 раза водой очищенной, после чего лиофилизировали и взвешивали.

Кислотный гидролиз: 3—5 мг полисахаридной фракции нагревали в запаянной ампуле 5 ч при температуре 100 °С с 1 мл кислоты трифторуксусной (ТФУ) концентрацией 2 моль, содержащей миоинозит (0,3 мг) в качестве внутреннего стандарта. Трифторуксусную кислоту удаляли многократным упариванием досуха с добавлением метанола.

Получение триметилсилильных (ТМС) производных моносахаридов: к полученной в результате кислотного гидролиза смеси моносахаридов добавляли 80 мкл безводного пиридина, смесь выдерживали в сушильном шкафу при температуре 50 °С в течение 20 мин. Затем добавляли 30 мкл N-триметилсилилимидазола (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Германия), смесь выдерживали в сушильном шкафу при температуре 70 °С в течение 40 мин. К полученной смеси ТМС-производных добавляли 1 мл гексана, интенсивно взбалтывали. После расслоения смеси верхний слой (сумма ТМС-производных) отбирали.

Полученные ТМС-производные моносахаридов анализировали на хроматографе Agilent 7890А с масс-селективным детектором Agilent 5975С, капиллярной колонкой HP5MS (30 м × 0,25 мм), газ-носитель — гелий (скорость потока 1 мл/мин). Температурный режим: 80 °С (1 мин) → 220 °С (2 мин) → 310 °С. Температура испарителя — 280 °С. Количество вводимой пробы — 1 мкл.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятым методом с определением среднего арифметического \bar{X} и ошибки среднего m . Достоверность результатов оценивали параметрически по t -критерию Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Полученный из листьев мать-и-мачехи ПСК представляет собой белую пористую массу, медленно растворимую в воде с образованием вязкого раствора. Выход ПСК составляет (3,25 ± 0,05)% в пересчете на абсолютно-сухое сырье. Содержание УК в ПСК — (26,35 ± 0,19)%, белка — (0,16 ± 0,01)%, нуклеиновых кислот — (0,029 ± 0,001)%.

Для выяснения природы водорастворимых полисахаридов мать-и-мачехи ПСК был подвергнут колоночной ионообменной хроматографии на DEAE-целлюлозе (Cl-форма). В результате ступенчатого элюирования

растворами натрия хлорида получено 32 фракции, из которых выбирали шесть основных фракций с наибольшим выходом: PST-1, PST-2, PST-3, PST-4, PST-5, PST-6. Полученные полисахаридные фракции были охарактеризованы по содержанию белка и уоновых кислот, которое устанавливали спектрофотометрическим методом. Характеристика полученных фракций представлена в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика фракций полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи по результатам спектрофотометрического анализа

Фракции ПСК	Выход, % от массы ПСК	Содержание во фракциях, %	
		УК	белка
PST-1	18,34 ± 1,36	1,13 ± 0,02	0,91 ± 0,02
PST-2	13,29 ± 0,23	2,60 ± 0,03	0,95 ± 0,02
PST-3	17,29 ± 2,17	1,02 ± 0,02	1,21 ± 0,01
PST-4	31,83 ± 1,07	57,69 ± 0,10	0,90 ± 0,03
PST-5	8,05 ± 0,25	3,14 ± 0,03	0,81 ± 0,02
PST-6	8,78 ± 0,85	4,40 ± 0,01	0,47 ± 0,01

Установлено, что все фракции содержат незначительные количества белка (0,47—1,21%) (табл. 1). Минорные количества УК (от 1,13 до 4,40%), установленные во фракциях PST-1, PST-2, PST-3, PST-5, PST-6 (табл. 1), указывают на то, что преобладающими компонентами ПСК листьев мать-и-мачехи являются нейтральные полисахариды. Суммарный выход этих фракций от массы ПСК, нанесенного на колонку с DEAE-целлюлозой, составляет 67%. Фракция PST-4 характеризуется высоким содержанием УК (около 58%). Выход этого полисахарида от массы

ПСК, нанесенного на колонку с DEAE-целлюлозой, составляет 33%.

Изучение мономерного состава фракций методом хромато-масс-спектрометрии показало, что фракции PST-1, PST-2, PST-3, PST-4, PST-5 и PST-6 отличаются друг от друга как по природе мономерных звеньев, так и по их соотношению (табл. 2). Гидролизат полисахарида PST-1 состоит преимущественно из галактозы, арабинозы и рамнозы в соотношении 3,9 : 3,2 : 1, а манноза и ксилоза содержатся в минорном количестве. Гидролизат полисахарида PST-2 состоит из галактозы, арабинозы, рамнозы, маннозы и глюкозы в соотношении 3,6 : 3,1 : 2,5 : 2,2 : 1. Гидролизат PST-3 состоит преимущественно из галактозы, глюкозы и арабинозы в соотношении 3,7 : 1,5 : 1,0. Таким образом, в основе структуры фракций PST-1, PST-2, PST-3, вероятно, лежит арабиногалактан. Указанные фракции отличаются друг от друга содержанием рамнозы, маннозы и глюкозы. Гидролизат фракции PST-4 состоит из рамнозы, галактозы и D-галактуроносовой кислоты в соотношении 1,75 : 1,2 : 1,0. Учитывая результаты анализа и опираясь на теорию о строении пектиновых веществ [6], можно предположить, что по химической структуре фракция PST-4 представляет собой рамногалактуронан I. Гидролизат PST-5 состоит только из рамнозы и, вероятно, представляет собой рамнан. Полисахарид PST-6 состоит преимущественно из галактозы и рамнозы в соотношении 2 : 1 и по химической структуре, вероятно, является галакторамнаном.

Таким образом, установлено, что полисахаридный комплекс листьев мать-и-мачехи состоит из рамногалактуронана I (33%) и нейтральных полисахаридов (67%), которые представлены суммой арабиногалактана, рамнана и галакторамнана.

Таблица 2

Мономерный состав полисахаридных фракций листьев мать-и-мачехи по результатам хромато-масс-спектрометрии

Фракции ПСК	Относительное содержание, %						
	Gal A	Rha	Ara	Xyl	Gal	Man	Glu
PST-1	0	11,90	38,08	1,02	46,41	2,59	0
PST-2	0	19,98	24,86	0	29,58	17,48	8,11
PST-3	0	4,33	14,49	0	53,24	6,14	21,81
PST-4	25,20	44,16	0	0	30,63	0	0
PST-5	0	100,00	0	0	0	0	0
PST-6	0	27,02	7,10	0	57,62	0	8,26

Примечание. Gal A — кислота галактуроносовая, Rha — рамноза, Ara — арабиноза, Xyl — ксилоза, Gal — галактоза, Man — манноза, Glu — глюкоза.

Заключение

Выход полисахаридного комплекса, выделенного из листьев мать-и-мачехи, составляет $(3,25 \pm 0,05)\%$.

При изучении компонентного состава полисахаридного комплекса листьев мать-и-мачехи установлено, что он состоит из двух основных компонентов: рамногалактуронана I (33%) и нейтральных полисахаридов (67%), представленных суммой арабиногалактана, рамнана и галакторамнана.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009—2013 гг. (ГК 02.740.11.5211, шифр заявки «2010-1.5-000-010».

Литература

1. Государственная фармакопея СССР. 11-е изд., доп. М.: Медицина, 1987. Вып. 1. 337 с.
2. Данилец М.Г., Гурьев А.М., Бельская Н.В. и др. Влияние растительных полисахаридов на NO-синтазу и аргиназу макрофагов мыши // Вестн. Ур. мед. акад. науки. 2009. № 2 (25). С. 49—50.
3. Ильина Т.А. Большая иллюстрированная энциклопедия лекарственных растений. М.: Эксмо, 2008. 320 с.
4. Лебеда А.Ф., Джуренко Н.И., Исайкина А.П., Собко В.Г. Лекарственные растения. Самая полная энциклопедия. М.: АСТ-пресс Книга, 2004. 912 с.
5. Мазнев Н.И. Большая энциклопедия высокоэффективных лекарственных растений. М.: Эксмо, 2007. 656 с.
6. Оводов Ю.С. Современные представления о пектиновых веществах // Биоорганическая химия. 2009. Т. 35, № 3. С. 293—310.
7. Полле А.Я., Оводова Р.Г., Попов С.В. Выделение и общая характеристика полисахаридов из пижмы обыкновенной, мать-и-мачехи и лопуха войлочного // Химия раст. сырья. 1999. № 1. С. 27-32.
8. Сафонов Н.Н. Полный атлас лекарственных растений. М.: Эксмо, 2009. 312 с.
9. Стифин А.С. Спектрофотометрическое определение суммарного количества нуклеиновых кислот // Биохимия. 1958. Т. 23. С. 656—662.
10. Bitter T., Muir H.M. A modified uronic acid carbazole reaction // Anal. Biochem. 1962. V. 4. P. 330—334.
11. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. and al. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances // Analyt. Chem. 1956. V. 28. P. 350—356.
12. Lowry O., Rosenbrogh N., Farr A. and al. Protein measurement with the Folin reagent // I. Biol.Chem. 1951. V. 1. P. 265-275.

Поступила в редакцию 10.04.2011 г.

Утверждена к печати 01.06.2011 г.

Сведения об авторах

А.П. Корж — аспирант кафедры фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

А.М. Гурьев — канд. фарм. наук, докторант кафедры фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

М.В. Белоусов — д-р фарм. наук, зав. кафедрой фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

М.С. Юсубов — д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой химии СибГМУ, профессор кафедры органической химии и органического синтеза ТПУ (г. Томск).

М.А. Белянин — канд. хим. наук, доцент кафедры органической химии и органического синтеза ТПУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Корж Анна Петровна, тел. 8-903-950-0015; e-mail: floristic@list.ru