

КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ РІЗНИХ ГРУП ВУГЛЕВОДІВ У ЛИСТІ, СТЕБЛАХ ТА СУЦВІТТЯХ ВІТЕКСУ СВЯЩЕННОГО (*VITEX AGNUS-CASTUS* L.) ТА ВІТЕКСУ КОНОПЛЕВИДНОГО (*VITEX CANNABIFOLIA* SIEB.)

Ключові слова: *Vitex agnus-castus* L., *Vitex cannabifolia* Sieb., полісахариди, пектини, геміцелюлоза, водорозчинні полісахариди, метод Дрейвуда

Перспективною лікарською сировиною для створення нових лікарських форм є надземна частина вітексу священного (*Vitex agnus-castus* L.) та вітексу коноплевидного (*Vitex cannabifolia* Sieb.). Однак біологічно активні речовини у цій сировині вивчено недостатньо [1, 2], тому метою роботи було кількісне визначення групового вмісту її вуглеводного комплексу.

На сьогодні відомі методики кількісного визначення полісахаридів, засновані на взаємодії з ароматичними фенолами (резорцин, антрон, фенол) у присутності концентрованої сірчаної кислоти, на здатності відновлювати в лужному середовищі пікринову кислоту до пікрової, на здатності утворювати забарвлення з етилгідразином у лужному середовищі [3].

Матеріали та методи дослідження

Кількісне визначення полісахаридів виконано методом, що базується на об'єднанні схеми розділення вуглеводів по Бейлі і модифікованого спектрофотометричного методу Дрейвуда [4]. З метою порівняння отриманих результатів здійснили також визначення їх загальновідомим відтворюваним методом гравіметрії [5].

Об'єктом дослідження були листя, стебла та суцвіття вітексу священного та вітексу коноплевидного, заготовлені у липні 2012 р. у фазі цвітіння на території Національного ботанічного саду НАН України імені М. М. Гришка.

Підготовка матеріалу. Аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру частинок, що проходять через сито з отворами діаметром 1,0 мм.

Визначення вмісту водорозчинних полісахаридів (ВРПС), пектинових речовин (ПР) та геміцелюлоз (ГЦ) спектрофотометричним методом. Для визначення ВРПС біля 2 г (точна наважка) подрібненої сировини екстрагували 50 мл води очищеної на киплячій водяній бані протягом 1 год. Після охолодження витяг фільтрували в мірну колбу ємність 100 мл. Екстракцію повторювали у тих самих умовах ще раз. Об'єм об'єднаного фільтрату доводили водою очищеною до мітки (розчин А). Для екстракції ПР залишок сировини обробляли сумішшю рівних частин 0,5% розчину кислоти щавлевої та 0,7% розчину амонію за тих самих умов (розчин Б). Сумарний вміст геміцелюлоз витягали 5%-м розчином калію гідроксиду за тих самих умов (розчин В). По 1 мл розчинів А, Б і В переносили у центрифужну пробірку, приливали 4 мл 95%-го спирту етилового, перемішували і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 10 хв. Після охолодження вміст пробірки центрифугували протягом 10 хв зі швидкістю обертання 3 000 об/хв. Надосадову рідину зливали, а осад продували в пробірці гарячим повітрям до видалення слідів етанолу. До осаду приливали

4 мл 0,2%-го розчину антрону в кислоті сірчаній концентрованій, нагрівали на киплячій водяній бані протягом 10 хв. Вміст пробірки після охолодження переносили в мірну колбу об'ємом 25 мл і доводили до мітки 95%-м спиртом етиловим. Для визначення вмісту ГЦ групи А до 1 мл розчину В приливають 2 мл 5%-ї кислоти сульфатної, перемішували і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 5 хв і далі за загальною схемою. Кількісне визначення ГЦ Б робили по різниці значень загального вмісту і ГЦ А.

Оптичну густину отриманих розчинів вимірювали на спектрофотометрі Hewlett Packard 8453 (США) в кюветі з шаром завтовшки 10 мм за довжини хвилі 414 нм (ВРПС) та 430 нм (ПР і ГЦ). Як компенсаційний розчин використовували 4 мл антронсірчаного реактиву, витриманого в тих самих умовах. Розрахунок вмісту полісахаридів здійснювали у перерахунку на домінуючий моносахарид, визначений методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) після гідролізу. Тому вміст ВРПС обчислювали у перерахунку на арабінозу, ПВ і ГЦ – на галактуронову кислоту, використовуючи відомі значення питомих показників поглинання названих моносахаридів [4].

Визначення вмісту водорозчинних полісахаридів (ВРПС) гравіметричним методом. Близько 1 г сировини (точна наважка) вміщували в конічну колбу, приливали 50 мл води очищеної і здійснювали визначення за методикою, наведеною в Державній фармакопеї СРСР (Х видання) [5].

Ідентифікація моносахаридів методом ТШХ з попереднім гідролізом. Витяги, виготовлені для визначення ВРПС, ГЦ і ПР, випаровували до об'єму 1 мл. До 1 мл витягу додавали 4 мл 96%-го етанолу і витримували на водяній бані (70 °С) 10 хв. Охолоджували пробірки і центрифугували протягом 10 хв за 3 000 об/хв. Спирт зливали, осад переносили у віали, приливали по 3 мл трифтороцтової кислоти. Віали герметично закупорювали і термостатували за температури 110 °С протягом 6 год. Після цього випаровували залишки трифтороцтової кислоти під витяжною шафою і приливали по 2 мл суміші метанол–вода (2:1), фільтрували через вологий фільтр і досліджували методом ТШХ на пластинках із силікагелем 60 F₂₅₄ 10 x 10 см у системі розчинників ацетонітрил–вода (85:15) [6], використовуючи як розчини порівняння 0,05%-ні водні розчини вуглеводів. Проявлення хроматограми здійснювали тимолсірчанним реактивом, детекцію здійснювали у видимому світлі.

Результати дослідження та обговорення

Результати кількісного визначення вуглеводів у різних видах досліджуваної сировини представлено в таблиці та на рис. 1.

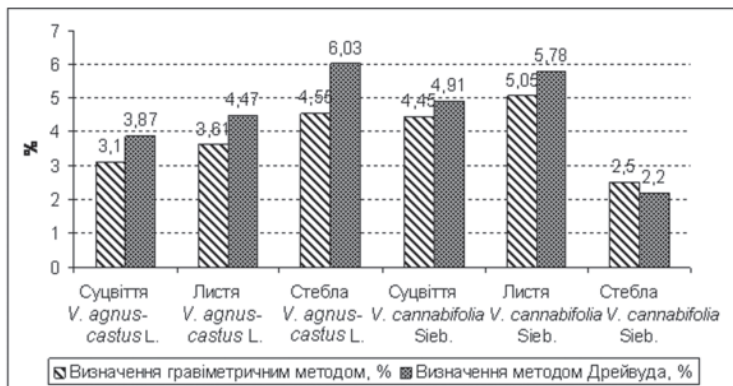


Рис. 1. Кількісний вміст водорозчинних полісахаридів у різних органах вітексу священного та вітексу коноплевидного (визначений спектрофотометричним та гравіметричним методами)

Як свідчать отримані дані, результати кількісного визначення сумарної кількості ВРПС, отримані гравіметричним та спектрофотометричним методами, відрізняються на 10–25% залежно від виду сировини. Вищі показники результатів гравіметричного визначення можуть свідчити про меншу точність останнього за рахунок осадження 96%-м етанолом інших груп речовин, окрім ВРПС, а також можливості наявності механічних включень у витягу, недостатньому видаленню вологи з фільтрів тощо. Проте, для скринінгових досліджень перспективної з точки зору вмісту ВРПС сировини, ця методика не має заперечень для застосування з огляду на її простоту й доступність.

Т а б л и ц я

Кількісний вміст різних груп вуглеводів у листі, суцвіттях та стеблах вітексу священного та вітексу коноплевидного

Об'єкт	Середній вміст груп вуглеводів, %				
	Водорозчинні полісахариди	Пектинові речовини	Геміцелюлози	Геміцелюлоза А	Геміцелюлоза Б
Суцвіття <i>V. agnus-castus</i> L.	3,87	2,78	1,19	1,06	0,13
Листя <i>V. agnus-castus</i> L.	4,47	3,76	1,22	1,07	0,15
Стебла <i>V. agnus-castus</i> L.	6,03	2,23	0,98	0,88	0,10
Суцвіття <i>V. cannabifolia</i> Sieb.	4,91	2,86	2,54	2,33	0,21
Листя <i>V. cannabifolia</i> Sieb.	5,78	3,25	2,49	2,26	0,23
Стебла <i>V. cannabifolia</i> Sieb.	2,20	1,56	0,67	0,64	0,03

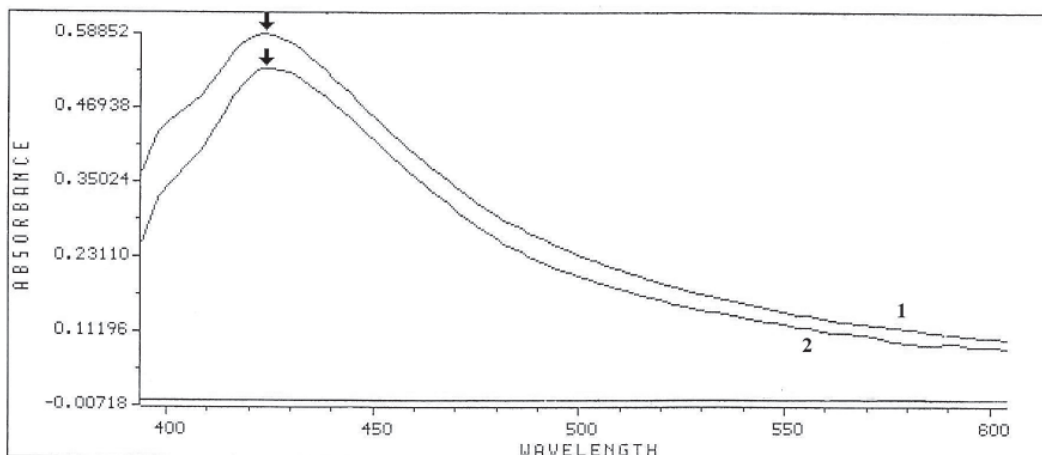


Рис. 2. Спектр поглинання ПР екстрактів суцвітть (1) та листя (2) вітексу коноплевидного

На ТШХ-пластинах виявлено рожеві плями, які за кольором і значенням R_f відповідають розчинам порівняння: серед гідролізату ВПРС виявлено глюкозу ($R_f = 0,48$), галактозу ($R_f = 0,34$) і арабінозу ($R_f = 0,71$), серед ПР та ГЦ – галактуронову кислоту ($R_f = 0,09$) (рис. 3).

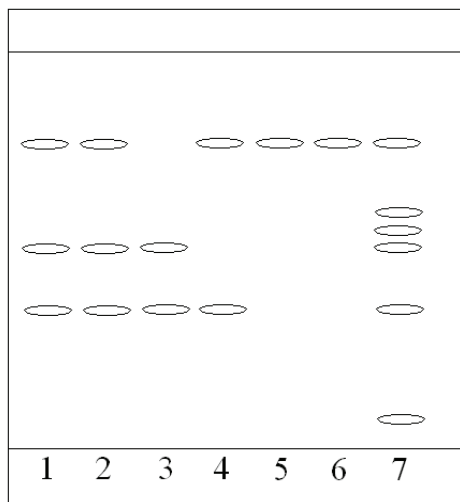


Рис. 3. ТШХ-хроматограма досліджуваних розчинів:

1 – гідролізат ВПРС витягу суцвіть вітексу священного, 2 – гідролізат ВПРС витягу листа вітексу священного, 3 – гідролізат ВПРС витягу стебел вітексу священного, 4 – гідролізат ВПРС витягу суцвіть вітексу коноплевидного, 5 – гідролізат ВПРС витягу листа вітексу коноплевидного, 6 – гідролізат ВПРС витягу стебел вітексу коноплевидного, 7 – розчини порівняння: галактуронова кислота, галактоза, глюкоза, маноза, арабіноза, рамноза

В и с н о в к и

1. Вперше визначено кількісний вміст ВПРС, пектинів та геміцелюлоз А і Б у листі, стеблах та суцвіттях вітексу священного та вітексу коноплевидного.

2. Вперше встановлено компонентний склад гідролізатів вуглеводневих комплексів. Найбільший вміст пектинів знайдено в листі та суцвіттях *V. cannabifolia* Sieb. (відповідно 2,49% і 2,54%). Також в листі останнього виявлено найвищий вміст пектинів (3,25%). А найбільшу кількість ВПРС (6,03%) виявлено в стеблах *V. agnus-castus* L.

3. Встановлено відчутну розбіжність (10–25%) в абсолютних значеннях сумарного вмісту ВПРС у разі визначення спектрофотометричним та гравіметричним методами, хоча відносні показники однакові у результатах обох досліджень.

4. Для порівняльного аналізу сумарного вмісту водорозчинних полісахаридів можна рекомендувати гравіметричний метод з огляду на його простоту, для абсолютного визначення – спектрофотометричний метод за Дрейвудом.

Л І Т Е Р А Т У Р А

1. *Chantaronthai P.* A Revision of the Genus *Vitex* (Lamiaceae) in Thailand // *Tropical Natural History*. – 2011. – V. 11, N 2. – P. 91–118.

2. *Ganapaty S., Vidyadhar K. N.* Phytoconstituents and biological activities of *Vitex* – a review // *J. Natural Remedies*. – 2005. – V. 5, N 2. – P. 75–95.

3. Цуркан О. О., Ковальчук Т. В., Бурмака О. В. Ідентифікація та кількісне визначення полісахаридів у квітках конюшини лучної // Фармац. журн. – 2008. – № 6. – С. 109–113

4. Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // Химия раст. сырья. – 2006. – № 4. – С. 29–33.

5. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. – 10-е изд., доп. – М.: Медицина, 1968. – 815 с.

6. Коновалова О. Ю., Джан Т. В., Шураева Т. К. та ін. Дослідження вмісту полісахаридів і танінів у квітках різних видів і сортів хеномелесу *Chaenomeles* Lindl. // Фітотерапія – 2009. – № 3. – С. 64–65.

Надійшла до редакції 21. 06. 2013.

О. В. Ющишена, А. А. Цуркан

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», г. Киев

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗНЫХ ГРУПП УГЛЕВОДОВ В ЛИСТЬЯХ, СТЕБЛЯХ И СОЦВЕТИЯХ *VITEX AGNUS-CASTUS* L. И *VITEX CANNABIFOLIA* SIEB.

Ключевые слова: *Vitex agnus-castus* L., *Vitex cannabifolia* Sieb., полисахариды, пектины, гемицеллюлоза, водорастворимые полисахариды, метод Дрейвуда

А Н Н О Т А Ц И Я

Известно, что витекс священный (*Vitex agnus-castus* L.) и витекс коноплевидный (*Vitex cannabifolia* Sieb.) проявляют различные виды фармакологической активности, однако химический состав их биологически активных соединений изучен недостаточно.

Проведено количественное определение группового состава углеводного комплекса (водорастворимые полисахариды, пектины, гемицеллюлозы) листьев, стеблей и соцветий витекса священного и витекса коноплевидного, для чего использовалась методика, основанная на объединении схемы разделения углеводов по Бейли и спектрофотометрического метода Дрейвуда. Также проведено количественное определение водорастворимых полисахаридов гравиметрическим методом. Изучен компонентный состав гидролизатов углеводных комплексов методом тонкослойной хроматографии.

В гидролизате водорастворимых полисахаридов обнаружены арабиноза, галактоза и глюкоза, пектинов и гемицеллюлоз – галактуроновая кислота. Наибольшее содержание пектинов и гемицеллюлоз обнаружено в листьях *V. cannabifolia* (соответственно 2,49% и 3,25%), а водорастворимых полисахаридов (6,03%) – в стеблях *V. agnus-castus*.

Сопоставление результатов количественного анализа водорастворимых полисахаридов гравиметрическим и спектрофотометрическим методами показало меньшую точность первого, однако мы можем рекомендовать гравиметрический метод для проведения скрининговых исследований.

O. V. Yushchishena, O. O. Tsurkan

State Institution «Institute of Pharmacology and Toxicology of National Medical Academy of Sciences of Ukraine», Kyiv

THE QUANTITATIVE ANALYSE OF SUMMARY AMOUNT OF
POLYSACCHARIDES IN LEAVES, STEMS AND INFLORESCENCES OF
VITEX AGNUS-CASTUS L. AND *VITEX CANNABIFOLIA* SIEB.

Key words: *Vitex agnus-castus* L., *Vitex cannabifolia* Sieb., polysaccharides, pectins, hemicelluloses, water-soluble polysaccharides, Dreiwood's method

A B S T R A C T

Vitex agnus-castus L. and *Vitex cannabifolia* Sieb. are reported to have a plenty of pharmacological activities, but their biologically active compounds are not discovered enough. The aim of present study was quantitative analysis of summary amount of water-soluble polysaccharides, pectines and hemicelluloses in leaves, stems and inflorescences of these herbals.

We applied method based on combination of separation by Beily method and Dreiwood's spectrophotometric analysis of polysaccharides. Also we made quantitative analysis of water-soluble polysaccharides in these raw material using gravimetric method. The components of carbohydrate complexes after hydrolysis have been researched by thin layer chromatography.

We have found arabinose, galactose and glucose in hydrolysate of water-soluble polysaccharides, and galacturonic acid – in those of pectines and hemicelluloses. The highest amounts of pectines and hemicelluloses were found in leaves of *V. cannabifolia* (accordingly 2,49% and 3,25%), while the highest range of water-soluble polysaccharides (6,03%) was found in stems of *V. agnus-castus*.

Also it was noticed, that gravimetric method of quantitative analysis of water-soluble polysaccharides is less accurate, than combined Beily-Dreiwood one, although it could be recommended as a fast analysis in screening researches. We realized inflorescences and leaves of *V. cannabifolia* have the highest amount of polysaccharides among discovered types of raw material.

Електронна адреса для листування з авторами: yuov@meta.ua