

Л. Г. Шостак, С. М. Марчишин, М. І. Луканюк, О. Л. Демидяк
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО

ДОСЛІДЖЕННЯ ВМІСТУ АМІНОКИСЛОТ І ПОЛІСАХАРИДІВ У НАДЗЕМНИХ І ПІДЗЕМНИХ ОРГАНАХ ПЕРВОЦВІТУ ВЕСНЯНОГО

Досліджено амінокислотний склад та полісахаридний комплекс надземної і підземної частин первоцвіту весняного. Методом високоефективної рідинної хроматографії встановлено загальний вміст амінокислот у сировині та вміст вільних амінокислот. Виявлено від 21 до 23 амінокислот, 7 з яких є незамінними. Визначено їх кількісний вміст. З досліджуваної сировини виділено фракції водорозчинних полісахаридів та пектинових речовин, встановлено їх кількісний вміст. Методом газової хроматографії у листках, квітках і кореневищах з коренями первоцвіту весняного встановлено якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: первоцвіт весняний, полісахариди, амінокислоти, кореневища з коренями, листки, квітки, високоефективна рідинна хроматографія, газова хроматографія.

ВСТУП. Первоцвіт весняний (*Primula veris* L., син. *Primula officinalis* (L.) Hill) – багаторічна кореневищна ранньовесняна рослина родини Первоцвітих (*Primulaceae*), що зростає в Україні у лісових і лісостепових районах у лісах, на узліссях, серед чагарників, на галявинах, вологих луках [2, 5]. Первоцвіт весняний зустрічається по всій Європі (крім крайньої півночі й півдня). Сировина офіційна в Угорській Фармакопеї VI.

Первоцвіт весняний має цілющі властивості й здавна відомий у народній, а пізніше і в офіційній медицині. З лікувальною метою використовують кореневище з коренями, листки і квітки.

Відвар кореневищ з коренями первоцвіту весняного використовують як відхаркувальний засіб при захворюваннях дихальних шляхів (бронхітах, трахеїтах, ларингітах). Відвар кореневищ з коренями і листків рекомендують як болетамувальний (при ревматизмі) та сечогінний засіб (при хворобах нирок і сечового міхура) [3]. Настояє квіток у народній медицині лікують запалення горла і легень, мігрень, неврози та безсоння, подагру, виразки і висипи на шкірі.

У народній медицині листки застосовують для лікування гіпо- й авітамінозів А та С. Молоді листки використовують для приготування супів, борщів, салатів, омлетів. У деяких країнах Європи первоцвіт культивують як салатну рослину [3].

© Л. Г. Шостак, С. М. Марчишин, М. І. Луканюк, О. Л. Демидяк, 2015.

Враховуючи те, що у джерелах наукової літератури недостатньо відомостей про якісний склад і кількісний вміст полісахаридів та амінокислот у надземних і підземних органах первоцвіту весняного, метою наших досліджень було визначити якісний склад та кількісний вміст амінокислот і полісахаридних комплексів у досліджуваних органах рослини.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Для виявлення амінокислот використовували водні витяжки досліджуваних органів рослини. Реакція з 0,1 % свіжоприготовленим розчином нінгідрину (поява червоно-синього забарвлення) свідчила про наявність у досліджуваних витяжках амінокислот. Дану групу сполук, крім реакції ідентифікації, виявляли методом хроматографії на папері. Поява плям рожевого, червоно-фіолетового і фіолетового кольорів після обробки хроматограм 0,2 % розчином нінгідрину в етанолі та нагрівання в сушильній шафі також свідчила про наявність амінокислот у досліджуваній сировині.

Дослідження якісного складу та кількісного вмісту амінокислот у сировині здійснювали за допомогою ВЕРХ-аналізу на хроматографі фірми "Agilent Technologies" (модель 1100), укомплектованому проточним вакуумним дегазатором G1379A, 4-канальним насосом градієнта низького тиску G1311A, автоматичним інжектором G1313A, термостатом колонок G13116A, діодноматричним детектором G1316A.

Для проведення аналізу було використано хроматографічну колонку розміром 4,6×50 мм, заповнену октадецилсилильним сорбентом із зернистістю 1,8 мкм ("ZORBAX-XDB-C₁₈").

Умови хроматографування: робочий тиск елюенту – 220–275 кПа; температура термостата колонки – 50 °С; об'єм введеної проби – 2 мкл. Параметри детектування: масштаб вимірювань – 1,0; час сканування – 0,5 с. Довжина хвилі детектування – 265 нм [8, 9]. Ідентифікацію амінокислот здійснювали за часом утримування (RT) стандартів (рис. 1).

Для проведення якісних реакцій на полісахариди готували водні витяжки з досліджуваної сировини первоцвіту весняного. Поява плаваючих пластинчастих згустків, що при відстоюванні випадали в осад, при приливанні до витяжки 95 % етилового спирту, свідчила про наявність у досліджуваній сировині полісахаридів. Кількісне визначення вмісту полісахаридів проводили гравіметричним методом [6].

Вільні цукри в рослинній сировині визначали методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором (ГХ/МС). Метод ґрунтується на екстракції вільних цукрів та отриманні ацетатів їх альдонітрильних похідних з подальшим аналізом методом газової хромато-мас-спектрометрії.

Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert ("Agilent Technologies", USA).

Ідентифікацію вільних цукрів досліджуваної суміші здійснювали шляхом порівняння часів утримування стандартних вільних цукрів та з

використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувану пробу. Як внутрішній стандарт використовували розчин сорбітолу [7].

Обробку результатів експериментальних досліджень проводили статистичними методами за допомогою програми Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. За результатами ВЕРХ-аналізу, в надземних і підземних органах первоцвіту ідентифіковано від 21 до 23 амінокислот, 7 з яких є незамінними: валін, лейцин, ізолейцин, треонін, лізин, метіонін, фенілаланін. Відомо, що амінокислоти в медичній практиці застосовують завдяки їх здатності брати участь у синтезі білків, пептидів, ферментів, гормонів, в азотистому обміні та інших життєво важливих процесах, тому дані дослідження є актуальними.

Домінували в досліджуваних органах первоцвіту весняного моноамінодикарбонові кислоти – аспарагінова і глутамінова (рис. 2). Їх загальна кількість була найбільшою в листках рослини (1531,7 та 2051,4 мг/100 г відповідно), найменшою – у кореневищах з коренями (434,0 і 235,4 мг/100 г відповідно). Крім того, в листках у значній кількості виявлено аргінін (1158,4 мг/100 г), лейцин (908,6 мг/100 г), серин (696,3 мг/100 г) і лізин (606,4 мг/100 г); у квітках – гліцин (436,5 мг/100 г), серин (412,7 мг/100 г) та аланін (407,4 мг/100 г); у кореневищах з коренями – аргінін (330,3 мг/100 г). В усіх досліджуваних об'єктах не виявлено глутаміну.

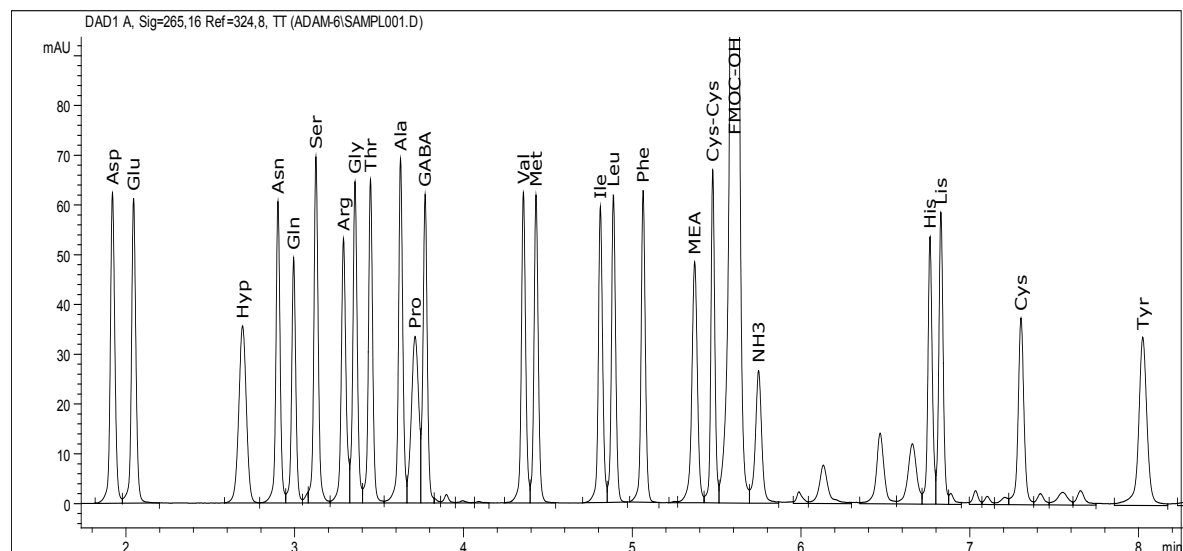


Рис. 1. Хроматограма стандартів амінокислот.

Примітки: Asp – аспарагінова кислота, Glu – глутамінова кислота, Hyp – 4-гідроксипролін, Asn – аспарагін, Gln – глутамін, Ser – серин, Arg – аргінін, Gly – гліцин, Thr – треонін, Ala – аланін, Pro – пролін, GABA – гамма-аміномасляна кислота, Val – валін, Met – метіонін, Ile – ізолейцин, Leu – лейцин, Phe – фенілаланін, Cys-cys – цистин, His – гістидин, Lis – лізин, Cys – цистеїн, Tyr – тирозин.

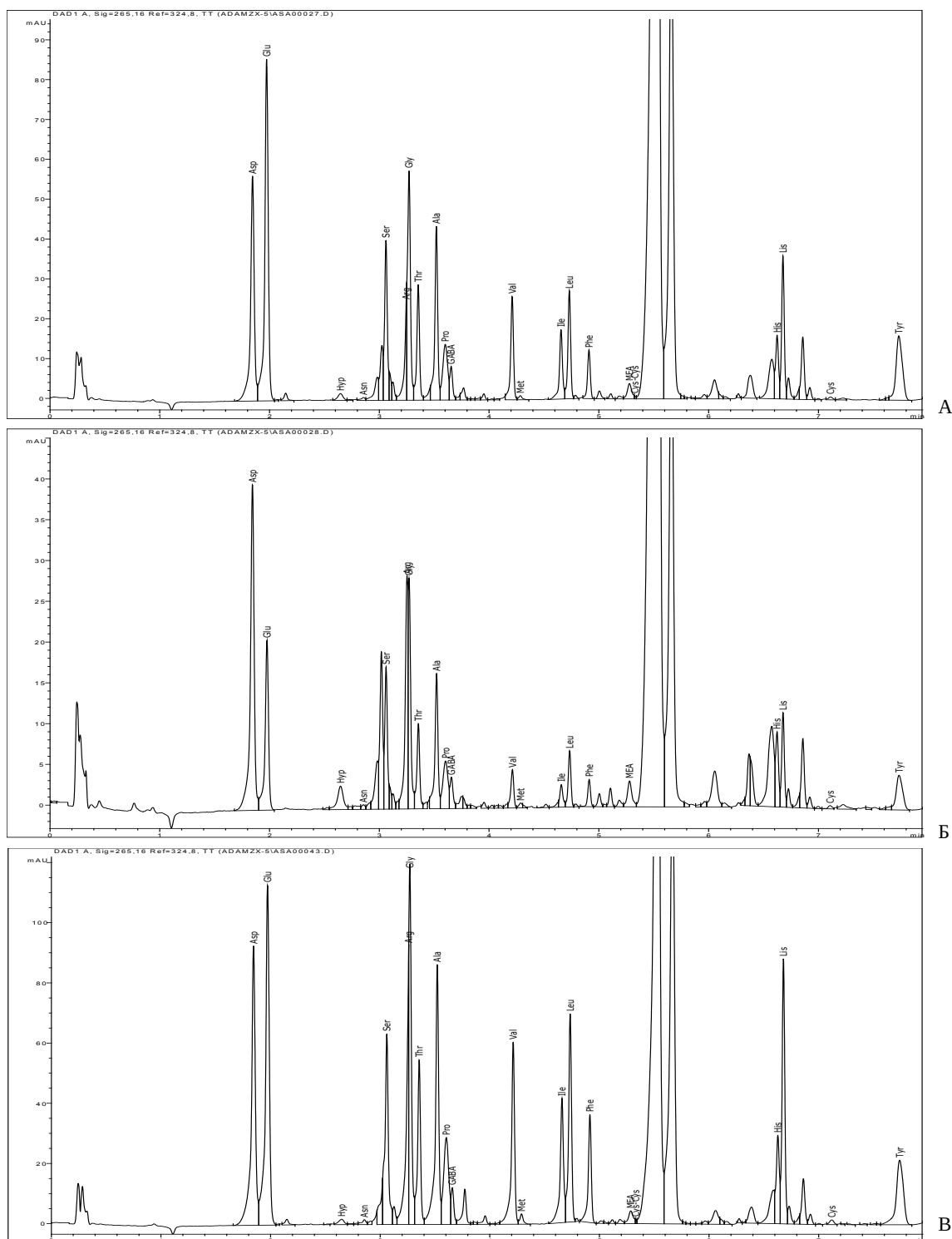


Рис. 2. Хроматограми загального вмісту амінокислот у квітках (А), кореневищах з коренями (Б) та листках (В) первоцвіту весняного (метод ВЕРХ).

Серед вільних амінокислот у квітках кількісно переважали аспарагін (341,0 мг/100 г) і глутамін (422,4 мг/100 г); у листках – аспарагін (860 мг/100 г), глутамін (622,2 мг/100 г) та валін (259,9 мг/100 г); у кореневищах з коренями – аспарагін (522,7 мг/100 г) і аргінін (315,8 мг/100 г). У квітках не виявлено метіоніну і цистину, в кореневищах з коренями – цистину і цистеїну.

Проведено дослідження полісахаридного комплексу первоцвіту весняного і встановлено кількісний вміст водорозчинних полісахаридів (ВРПС) та пектинових речовин (ПР) у квітках, листках і підземних органах рослини (табл. 1). Відомо, що полісахариди рослинного походження мають високу біологічну активність при різних захворюваннях, потенціюють фармакологічну

Таблиця 1 – Кількісний вміст водорозчинних полісахаридів та пектинових речовин у перерахунку на абсолютно суху сировину в надземних і підземних органах первоцвіту весняного

Назва об'єкта	Вміст ВРПС, %	Вміст ПР, %
Квітки	6,60	4,04
Листки	14,38	5,30
Кореневища з коренями	11,26	5,32

активність флавоноїдів та інших біологічно активних речовин, пролонгують дію і підвищують ефективність лікарських речовин, проявляють протизапальну, обволікаючу, муколітичну, радіопротекторну, імуномодельючу, протипухлинну дії [1, 4].

Як видно з таблиці, найбільшу кількість ВРПС спостерігали в листках первоцвіту (14,38 %), ПР – у кореневищах з коренями (5,32 %); найменший вміст ВРПС та ПР виявляли у квітках первоцвіту (6,06 і 4,04 % відповідно).

Виділені з досліджуваних об'єктів ВРПС – аморфні порошки без запаху, що легко розчиняються у воді й практично не розчиняються в органічних розчинниках, їх водні розчини з нейтральним або слаболужним значенням рН. Полісахариди дають позитивний результат при реакції осадження 96 % спиртом Р та з реактивом Фелінга після проведення кислотного гідролізу. Пектинові речовини – аморфні порошки майже без запаху, що не розчиняються в органічних розчинниках та мало розчиняються у холодній воді, при нагріванні утворюють гелеподібні колоїдні розчини з нейтральним або кислим значенням рН.

Результати визначення вільних цукрів у досліджуваній рослинній сировині представлено на рисунках 3–5 та в таблицях 2–4.

Методом ГХ у листках і квітках первоцвіту виявлено по 8 цукрів, основними з яких є глюкоза (1,76 і 0,80 мг/кг), фруктоза (24,61 і 3,74 мг/кг) та сахароза (35,73 і 0,70 мг/кг) (табл. 2 і 3, рис. 3

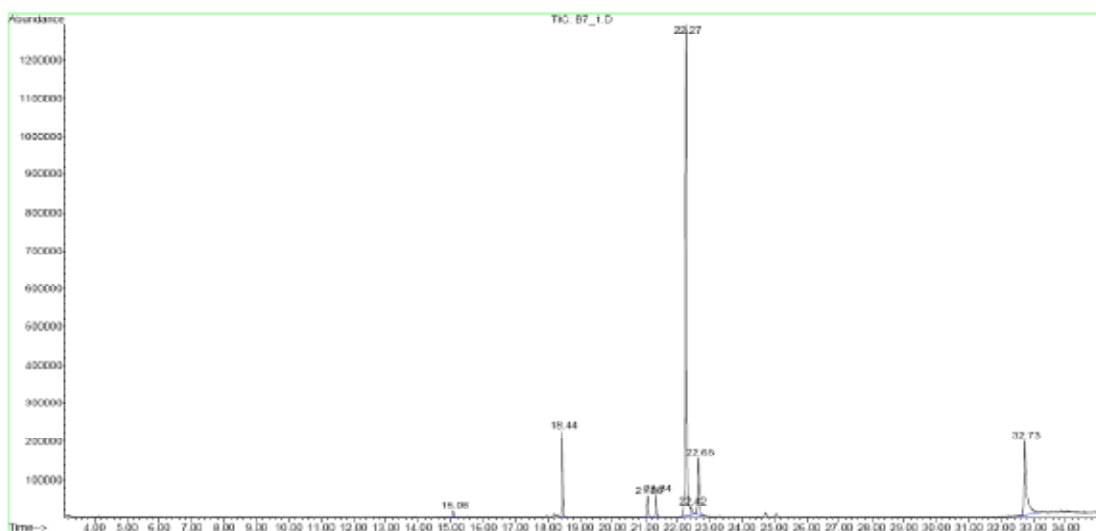


Рис. 3. Хроматограма вільних цукрів листків первоцвіту весняного.

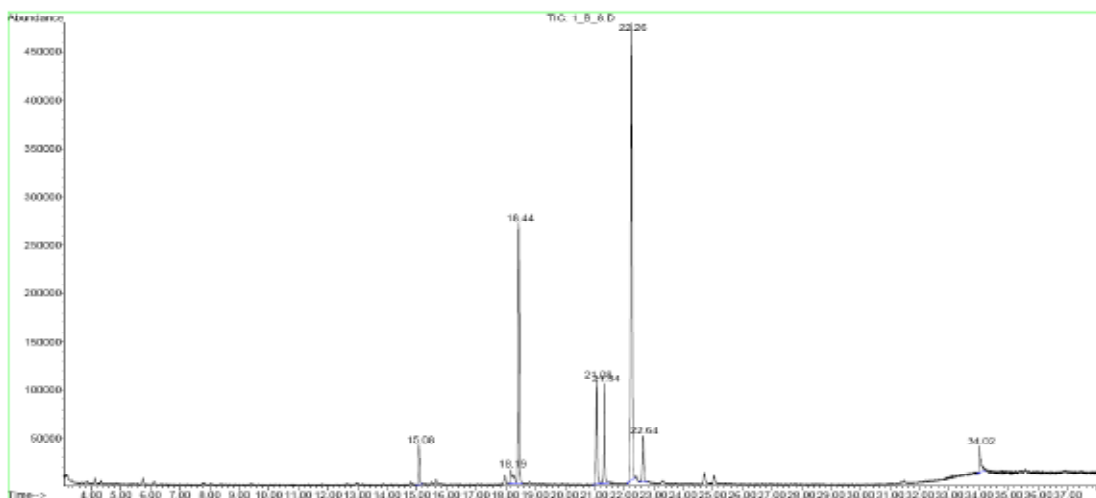


Рис. 4. Хроматограма вільних цукрів квіток первоцвіту весняного.

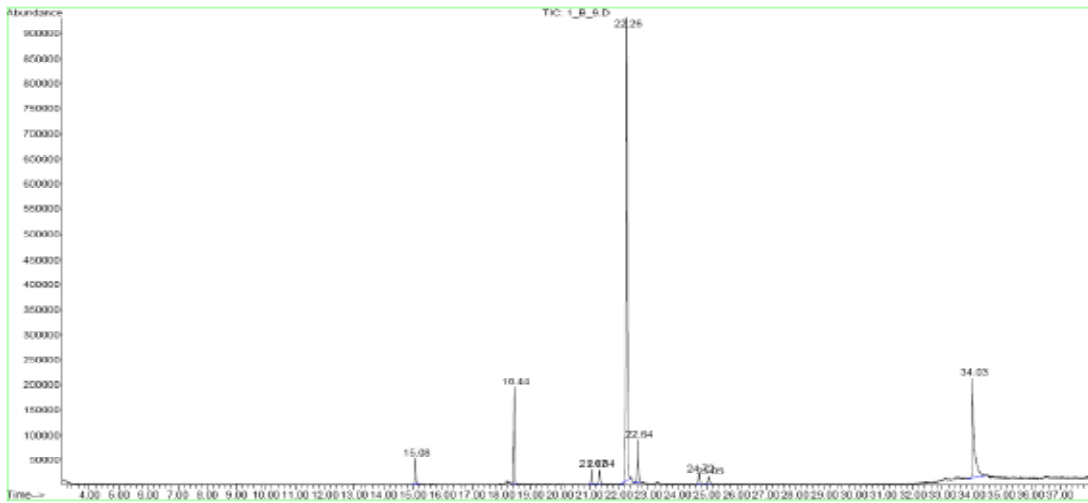


Рис. 5. Хроматограма вільних цукрів кореневищ з коренями первоцвіту весняного.

і 4) відповідно; у кореневищах з коренями – 9 цукрів, основними з яких є глюкоза (1,76 мг/кг), фруктоза (1,74 мг/кг) та сахароза (8,74 мг/кг) (табл. 4, рис. 5).

ВИСНОВКИ. 1. Уперше вивчено амінокислотний склад квіток, листків і кореневищ з коренями первоцвіту весняного.

2. Встановлено наявність у досліджуваних органах первоцвіту від 21 до 23 амінокислот. Найвищий загальний вміст амінокислот виявлено в листках рослини, найнижчий – у кореневищах з коренями.

3. Домінували у квітках, листках і кореневищах з коренями первоцвіту весняного моноамінодикарбонові кислоти – аспарагінова і глутамінова.

Таблиця 2 – Якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів у листках первоцвіту весняного

Час утримання	Ідентифікаційний номер піка	Вміст моноцукрів, мг/кг	Назва цукрів
15.0779	1	1,76	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)
18.4439	2	Ст.	
21.0789	3	19,59	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-фруктонітрил (фруктоза)
21.2434	4	5,02	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-фруктонітрил (фруктоза)
22.2731	5	136,70	D-манітол, гексаацетат
22.4219	6	2,93	Не ідентифіковано
22.6471	7	16,55	L-ідітол, гексаацетат
32.7281	8	35,73	Цукрози октаацетат (сахароза)

Таблиця 3 – Якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів у квітках первоцвіту весняного

Час утримання	Ідентифікаційний номер піка	Вміст моноцукрів, мг/кг	Назва цукрів
15.0739	1	0,80	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)
18.1891	2	0,50	β -d-манофуранозид
18.4441	3	Ст.	
21.0789	4	1,93	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-фруктонітрил (фруктоза)
21.3383	5	1,81	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-фруктонітрил (фруктоза)
22.2563	6	9,11	Персеїтол, гептаацетат
22.6388	7	1,05	Галактітол, гептаацетат
34.0202	8	0,70	Цукрози октаацетат (сахароза)

Таблиця 4 – Якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів у кореневищах з коренями первоцвіту весняного

Час утримання	Ідентифікаційний номер піка	Вміст моноцукрів, мг/кг	Назва цукрів
15.0779	1	1,41	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-глюконітрил (глюкоза)
18.4441	2	Ст.	
21.0749	3	0,74	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)
21.3381	4	0,70	2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)
22.2603	5	25,39	Персеїтол, гептаацетат
22.6386	6	2,55	Галактітол, гептаацетат
24.7211	7	0,54	Не ідентифіковано
25.0483	8	0,37	Не ідентифіковано
34.0285	9	8,74	Цукрози октаацетат (сахароза)

4. Проведено вивчення та порівняльний аналіз полісахаридів листків, квіток, кореневищ з коренями первоцвіту весняного; виділено полісахаридні комплекси, які розділено на водорозчинні полісахариди і пектинові речовини, кількісний вміст яких становив 14,38, 6,60 і 11,26 % та 5,30, 4,04 і 5,32 % відповідно.

5. Методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором у листках, квітках і кореневищах з коренями первоцвіту весняного встановлено якісний склад та кількісний вміст вільних цукрів, серед яких основними є глюкоза, фруктоза і сахароза.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дослідження вмісту вуглеводів у плодах маслинок багатоквіткової (*Elaeagnus multiflora* L.) та маслинок вузьколистої (*Elaeagnus angustifolia* L.) / Є. М. Гергель, О. Ю. Коновалова, Т. В. Джан, Є. А. Власик // Фармац. журн. – 2011. – № 6. – С. 96–98.

2. Лікарські трави [Електронний ресурс] // Первоцвіт весняний (первоцвіт весняний). – Режим доступу : <http://www.s-v-d.kiev.ua/m-r/68-pervocvit-vesnyanij-pervocvet-vesennij.html>.

3. Лікарські рослини : енциклопед. довід. / ред. А. М. Гродзінський. – К. : Голов. ред. УРЕ, 1989. – С. 326–327.

4. Дослідження полісахаридів любистку лікарського (*Levisticum officinale* Koch.) / С. М. Марчишин, Н. В. Челін, О. Б. Калушка, Д. З. Довганюк // Фармац. часоп. – 2011. – № 4. – С. 12–15.

5. Сафонов М. М. Повний атлас лікарських рослин / М. М. Сафонов. – Тернопіль : Навчальна книга-Богдан, 2008. – С. 176–177.

6. Солодовниченко Н. М. Лікарська рослинна сировина та фітопрепарати : посібник з фармакогнозії

з основами біохімії лікарських рослин / Н. М. Солодовниченко, М. С. Журавльов, В. М. Ковальов. – Харків : Вид-во НФАУ “Золоті сторінки”, 2001. – 408 с.

7. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography / Y. I. Chen, M. Y. Xie, Y. X. Wang [et al.] // *Phytochem. Anal.* – 2009. – **20**, № 6. – P. 503–510.

8. Jámbor A. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. Literature overview and further study / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // *Journal of Chromatography A.* – 2009. – **1216**. – P. 3064–3077.

9. Jámbor A. Quantitation of amino acids in plasma by high performance liquid chromatography: Simultaneous deproteinization and derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride / A. Jámbor, I. Molnár-Perl // *Journal of Chromatography A.* – 2009. – **1216**. – P. 6218–6223.

ИССЛЕДОВАНИЕ СОДЕРЖАНИЯ АМИНОКИСЛОТ И ПОЛИСАХАРИДОВ В НАДЗЕМНЫХ И ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНАХ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО

Резюме

Исследованы аминокислотный состав и полисахаридный комплекс надземной и подземной частей первоцвета весеннего. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии установлено общее содержание аминокислот в сырье и содержание свободных аминокислот. Выявлено от 21 до 23 аминокислот, 7 из которых являются незаменимыми. Определено их количественное содержание. С исследуемого сырья выделено фракции водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ, установлено их количественное содержание. Методом газовой хроматографии в листьях, цветках и корневищах с корнями первоцвета весеннего установлено качественный состав и количественное содержание свободных сахаров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: первоцвет весенний, полисахариды, аминокислоты, корневища с корнями, листья, цветки, высокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хроматография.

L. H. Shostak, S. M. Marchyshyn, M. I. Lukanyuk, O. L. Demydyak
I. YA. HORBACHEVSKY TERNOPII STATE MEDICAL UNIVERSITY

THE INVESTIGATION OF THE AMINO ACIDS CONTENT AND POLYSACCHARIDES IN THE ABOVE AND UNDERGROUND PARTS OF PRIMULA VERIS L.

Summary

There were determined the amino acids contents and complex of polysaccharides of the above and underground parts of *Primula veris* L. In the plant materials it was established the general content of amino acids and the content of free amino acids by high performance liquid chromatography. There were identified from 21 to 23 amino acids and 7 were essential. It was determined their quantity content. The fractions of soluble polysaccharides and pectins were isolated from the studied materials and determined their contents. In the leaves, flowers and rhizomes with roots there were established the qualitative composition and quantitative content of the free saccharides by the gas chromatography.

KEY WORDS: *Primula veris* L., polysaccharides, amino acids, rhizomes with roots, leaves, flowers, high performance liquid chromatography, gas chromatography.

Отримано 10.11.15

Адреса для листування: Л. Г. Шостак, Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, м. Воли, 1, Тернопіль, 46001, Україна.