

Рекомендована д. фармац. наук, проф. С. М. Марчишин

УДК 54.016.062:547.93:661.732.9:543.866

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У КОМПЛЕКСАХ ЖОВЧІ

© О. О. Стремоухов, А. М. Рудник, К. В. Андріанов

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: проведено комплексне спектрофотометричне дослідження комплексів трьох видів жовчі тварин. Для визначення вмісту стероїдів встановлено співвідношення жовчних кислот і холестерину.

Ключові слова: жовч, жовчні кислоти, пігменти жовчі, фосфоліпіди, ліпофільний комплекс (ЛК), глікопротеїновий комплекс (ГПК).

Вступ. Для виготовлення лікарських препаратів використовували і використовують не лише різні органи тварин, а також знайшло практичне застосування і продукти їх життєдіяльності та секреції. Найбільше використовують жовч, котра належить до неїстівних продуктів тваринного походження, але може бути використана для сільськогосподарських, промислових і фармацевтичних потреб.

В існуючих фізіологічних, біохімічних і біофізичних посібниках наведено лише окремі методи дослідження жовчі, нерідко рекомендують методики вікової давнини (проба Гая, емульгування рослинної олії). Вперше ці стандарти було створено у 1979 р. [3], які залишилися незмінними у ДСТУ 4495 [2]. Як видно з таблиці 1, показники якості жовчі не відповідають сучасним досягненням фармакогнозії, фармацевтич-

ної хімії та вимогам ДФУ до аналітичної нормативної документації фармацевтичних субстанцій і препаратів.

Методи дослідження. Проведення порівняльного спектрофотометричного визначення основних БАР жовчі поділяли на три основні групи речовин: пігменти жовчі, фосфоліпіди та жовчні кислоти. Відомі методики аналізу жовчі [6, 8–10] були адаптовані до ліпофільного та глікопротеїнового комплексу (ЛК та ГПК) жовчі великої рогатої худоби (ЖВt), свиней (ЖSs) і курей (ЖGg).

Результати й обговорення. Визначення пігментів проводили за методикою для загального білірубину жовчі, вміст якого визначали колориметричним методом [1]. Використання спектрофотометричного методу дозволяє знімати УФ-спектр в діапазоні хвиль 310–700 нм (рис. 1).

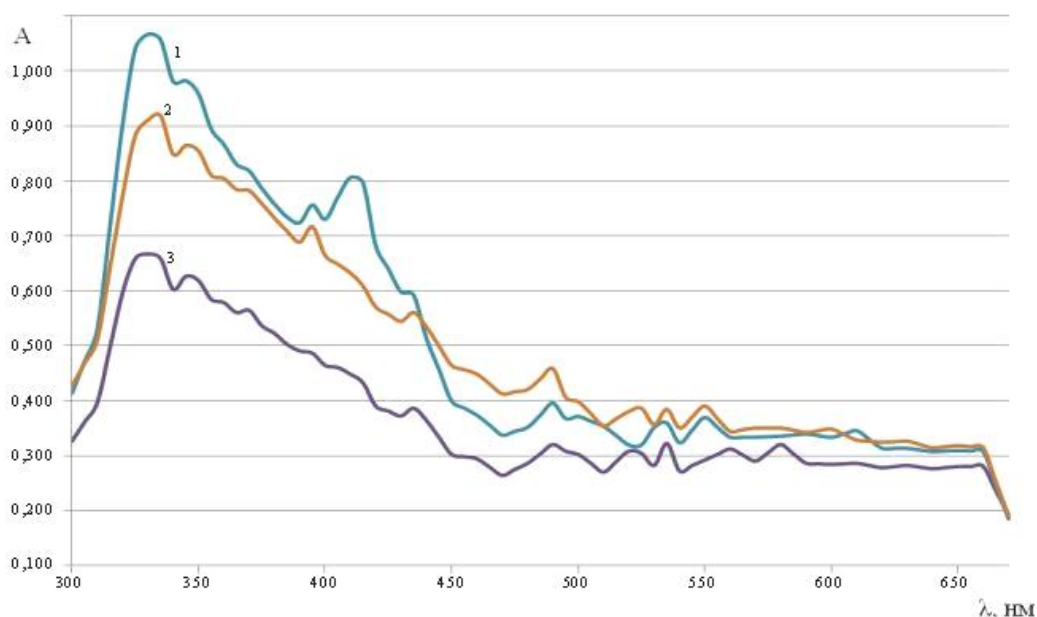


Рис. 1. УФ-спектр пігментів ЛК жовчі з кофейним реактивом: 1 – ЛК ЖВt, 2 – ЛК ЖSs, 3 – ЛК ЖGg.

Встановлено, що максимуми поглинання знаходяться в межах 325–490 нм. При цьому у ЛК ЖВт є максимум поглинання при 435 нм, що відрізняє його від ЛК ЖSs та ЖGg.

Метод визначення фосфоліпідів у комплексах жовчі заснований на визначенні вмісту фосфо-

ру за методом Фіске-Суббароу [5, 7], адаптованого під спектрофотометричне визначення УФ-спектра в діапазоні хвиль 300–550 нм (рис. 2).

Встановлено, що максимум поглинання (рис. 2) знаходиться в межах 330–340 нм. На рисунку 2 наведено спектр лецитину (смуга 3)

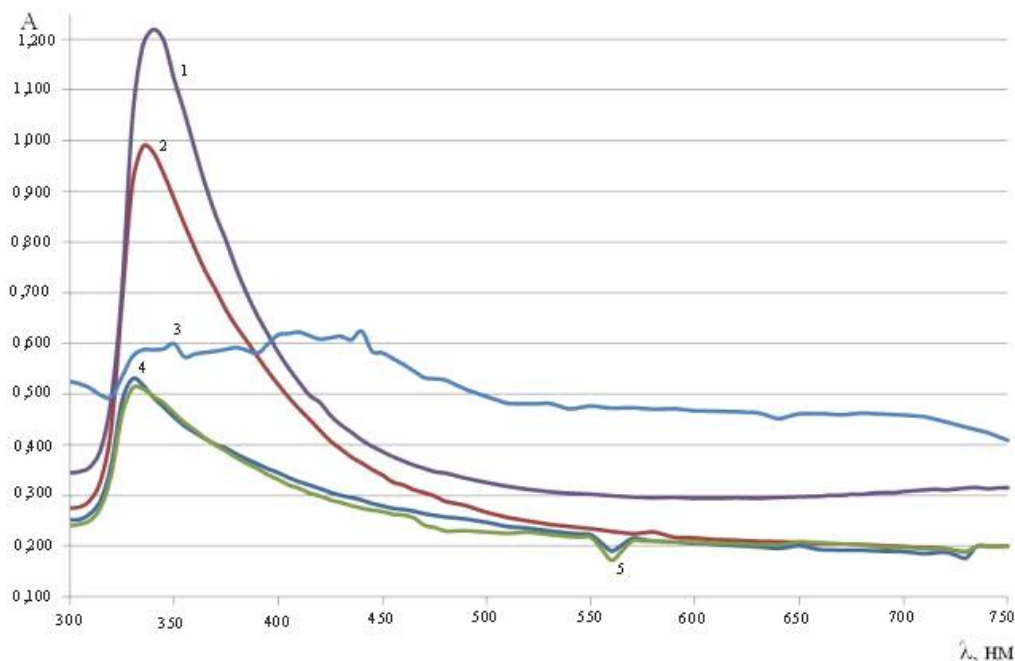


Рис. 2. УФ-спектри продуктів реакції фосфоліпідів жовчі з молібдатомамонію: 1 – лецитин, 2 – ЛК ЖВт, 3 – лецитин, 4 – ЛК ЖGg, 5 – ЛК ЖSs.

за методом визначення жовчних кислот (триглідроксихоланові кислоти з сахарозою), який не дає характерних максимумів поглинання, що суттєво відрізняє його від смуги лецитину за методом Фіске-Суббароу і дає можливість визначити лецитин у комплексах жовчі в присутності жовчних кислот.

Ряд колориметричних методів визначення жовчних кислот, в яких використовують реакцію Пат-

тенкофера та її модифікації, засновані на взаємодії жовчних кислот з сахарозою у присутності сірчаної кислоти. У результаті реакції утворюється фурфурол і розчин забарвлюється у вишнево-червоний. Ця реакція специфічна для холевої і парних (глікохолевої та таурохолевої) кислот, решта жовчних кислот не вступають у дану реакцію [1]. УФ-спектри жовчних кислот в діапазоні хвиль 300–750 нм приведено на рисунках 3 та 4.

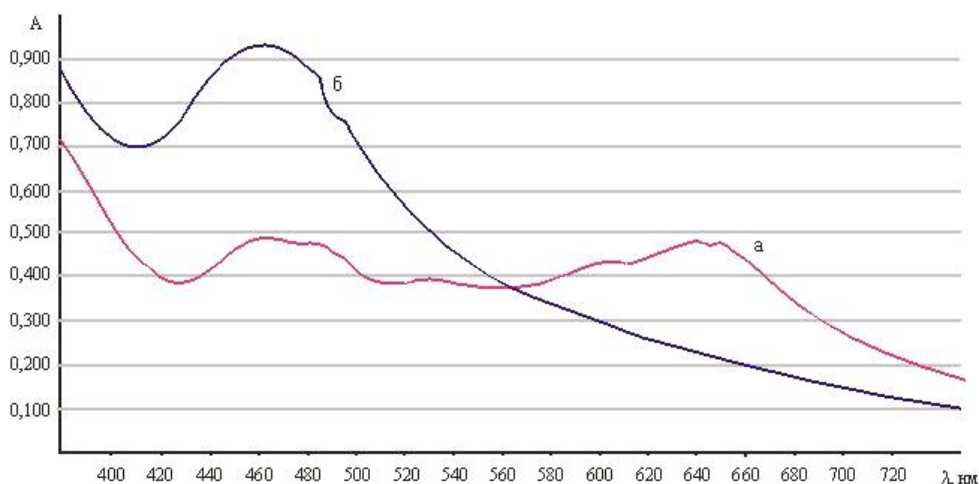


Рис. 3. УФ-спектр (а) холевої і (б) дегідрохолевої кислоти.

Із рисунка 3 видно, що при дегідратуванні холевої кислоти зникає пік у межах 620–660 нм, при чому максимум поглинання знаходиться у межах 440–500 нм для дегідрохолевої кислоти має більшу оптичну густину, ніж у холевої кислоти при однакових концентраціях.

Для встановлення наявності холевої кислоти у ЛК жовчі знято УФ-спектри у діапазоні холевої кислоти (рис. 4).

На рисунку 4 спостерігається зсув максимуму поглинання холевої кислоти для ЛК жовчі, який складав приблизно 30–40 нм у бік більших довжин

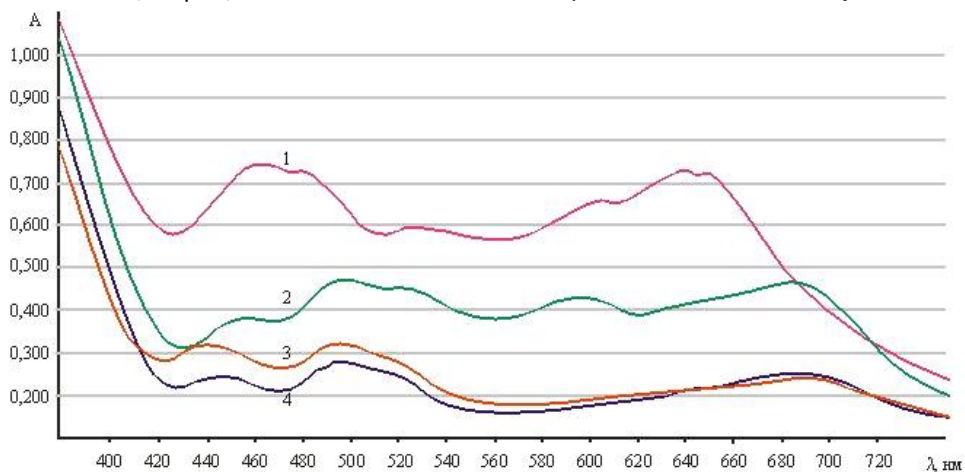


Рис. 4. УФ-спектр холевої кислоти і ЛК жовчі: 1 – холева кислота, 2 – ЛК ЖGg, 3 – ЛК ЖTt, 4 – ЛК ЖSs.

хвиль, що пов'язано з наявністю не лише холевої кислоти у ЛК жовчі, а й інших жовчних кислот.

Визначення вмісту жовчних кислот і холестерину в жовчі проводили з наступним обчисленням холато-холестеринового коефіцієнта, що означає відношення жовчних кислот до холестерину [4]. Метод заснований на здатності попередньо охолодженого 0,1% розчину заліза(III) хлорид ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) у суміші рівних за об'ємом концентрованих оцтової та сірчаної кислоти реагувати з холестерином і жовчними кислотами. При цьому утворюються продукти з максимума-

ми поглинання при різних довжинах хвиль, це дозволяє виключити їх взаємний вплив. У даній суміші при кімнатній температурі холестерин дає максимальне поглинання через 15–20 хв при довжині хвилі 480 нм, а жовчні кислоти практично не утворюють забарвлених продуктів. Вони реагують лише після нагрівання протягом 20 хв при 60 °С, максимальне поглинання при 380–390 нм, тобто в іншій частині спектра, де вплив холестерину проявляється при співвідношенні з жовчними кислотами 1:2, чого практично не буває в нативній жовчі (рис. 5 та 6).

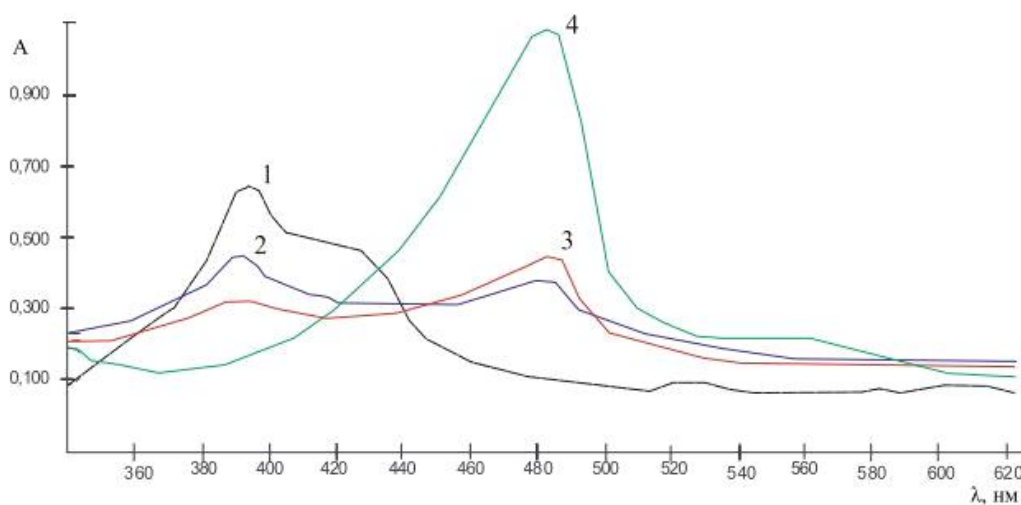


Рис. 5. УФ-спектр продукту взаємодії холестерину і жовчних кислот та ліпофільної фракції до нагрівання з FeCl_3 ; 1 – холева кислота, 2 – ЛК ЖTt, 3 – ЖTt, 4 – холестерин.

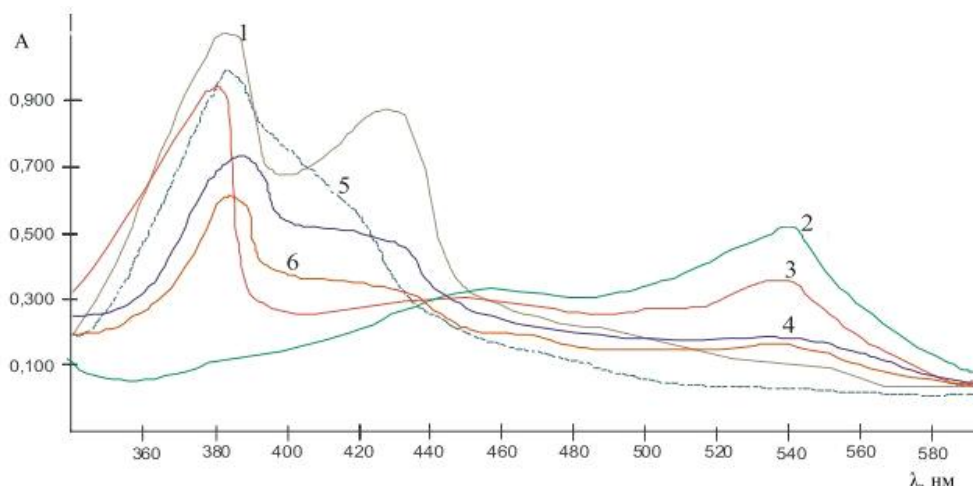


Рис. 6. УФ-спектр продукту взаємодії холестерину і жовчних кислот та ліпофільної фракції після нагрівання з $FeCl_3$; 1 – дезоксихолева кислота; 2 – холестерин; 3 – хенодезоксихолева кислота; 4 – ЛК ЖВт; 5 – холева кислота; 6 – ЖВт.

Найменша різниця величин оптичної густини розчинів вільних жовчних кислот спостерігається при 380 нм, зв'язані жовчні кислоти за цих же довжин хвиль мають менші максимуми поглинання оптичної густини. Сумарний вміст жовчних кислот розраховують за кількістю вільних жовчних кислот – холевої, хенодезоксихолевої або дезоксихолевої. Літохолева кислота, вміст якої в жовчі незначний, даним реактивом не виявляється. Розчини холестерину підпорядковуються закону Бугера–Ламберта–Бера в межах 5–3 мг%, а для жовчних кислот цей інтервал становить від 15 до 150 мг%.

Вміст досліджуваних компонентів визначають за формулами:

$$C_{жк} = 114A_{385} \cdot P,$$

де $C_{жк}$ – концентрація жовчних кислот у мг%; A_{385} – величина оптичної густини дослідного розчину при 385 нм; P – розбавлення ЛК жовчі;

$$C_{хст} = 50 \cdot (A_{480} - 0,04 \cdot A_{385}) \cdot P,$$

де $C_{хст}$ – концентрація холестерину у мг%; A_{480} – величина оптичної густини дослідного розчину при 480 нм.

Результати вимірювань жовчних кислот та холестерину для ЛК і ГПК трьох видів жовчі наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Концентрація жовчних кислот і холестерину

Найменування	ЖВт	ЖSs	ЖGg
ЛК жовчі			
Концентрація холестерину, мг%	322,40	407,21	300,61
Концентрація жовчних кислот, мг%	901,56	1011,24	783,25
ХХК у ЛК жовчі, %	35,76	40,27	38,38
ГПК жовчі			
Концентрація холестерину, мг%	62,13	97,73	25,05
Концентрація жовчних кислот, мг%	80,60	297,04	106,67
ХХК у ГПК жовчі, %	77,08	32,90	23,48
Нативна жовч			
Концентрація холестерину, мг%	188,80	236,29	120,46
Концентрація жовчних кислот, мг%	963,75	1308,33	890,00
ХХК жовчі, %	19,59	18,06	13,53

Співвідношення жовчних кислот і холестерину у ЛК та ГПК жовчі порівняно з нативною жовчю збільшилось: для ЛК ЖGg у 2,8 раза та ГПК ЖВт у 3,9 раза, тоді як для ЛК ЖВт та ГПК ЖSs і ЖGg були однакові та знаходилися в межах 1,7–1,8 раза. Для ЛК ЖSs це співвідношення було середнім і становило 2,2 раза. Це пов'язано з різноманітним складом жовчі тварин та фізико-

хімічними властивостями жовчних кислот.

Висновки. На підставі проведених досліджень розроблено найбільш оптимальні способи спектрофотометричного визначення жовчних кислот, фосфоліпідів і пігментів у ліпофільному комплексі жовчі. Спектрофотометричним методом визначено вміст жовчних кислот у нативній, ЛК і ГПК жовчі ЖВт, ЖSs та ЖGg.

Література

1. Ганиткевич Я. В. Исследование желчи. Биохимические и биофизические методы / Я. В. Ганиткевич, Я. И. Карбач – К. : Вища школа, 1985. – 136 с.
2. ДСТУ 4495:2005 Сировина ендокринно-ферментна та спеціальна. Технічні умови.
3. Желчь бычьа и других сельскохозяйственных животных (нативная) : Справочные материалы. – ОСГ 49134-79 и ГОСТ 9225-84 – Иростипминилаборатория ТАСИС.
4. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи / В. П. Мирошниченко, Л. Л. Грошаневска, М. Г. Касаткина [и др.] // Лабораторное дело. – 1978. – № 3. – С. 149–153.
5. Миттел К. Мицеллообразование, солюбилизация и микроэмульсия / под ред. К. Миттела; пер. под ред. д.х. н., проф. В. Н. Измайловой. – М. : Мир, 1980. – 597 с.
6. Состав желчи и желчных камней у больных холелитиазом при спектрофотометрии и дериватографии / А. М. Ногаллер, Р. А. Иванченкова, Г. С. Дорджин [и др.] // Клинич. мед. – 1986. – № 1. – С. 17–24.
7. Стремоухов О. О. Спектрофлуориметричний аналіз жовчі тварин / О. О. Стремоухов // Актуальні питання фар мац. та мед. науки та практики : зб. наук. статей. – Запоріжжя, 2009, – Вип. XXII, т. 2. – С. 151–152.
8. Стремоухов О. О. УФ-дослідження речовин жовчі / О. Б. Наріжна, О. О. Стремоухов // Актуальні питання створення нових лікарських засобів : мат. всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених, 17-18 трав. 2007 р., м. Харків. – Х., – 2007. – С. 63–64.
9. Чупич С. П. Спектроскопические критерии литогенности желчи в ранней диагностике холелитиаза / С. П. Чупич, Г. Л. Грицких – М. : Международ. академия информатизации, 1993. – 69 с.
10. Coca E. A method for quick determination of bile acids in bile of patients with biliary lithiasis. / E. Coca, B. Ribas, G. Trigueros // J. Liquid Chromatogr. – 1994. – Vol. 17. – P. 1349–1363.

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КОМПЛЕКСЕ ЖЕЛЧИ**А. А. Стремоухов, А. М. Рудник, К. В. Андрианов***Национальный фармацевтический университет, Харьков*

Резюме: проведено комплексное спектрофотометрическое исследование комплексов трех видов желчи животных. Для определения содержания стероидов установлено соотношение желчных кислот и холестерина.

Ключевые слова: желчь, желчные кислоты, пигменты желчи, фосфолипиды, лиофильный комплекс (ЛК), гликопротеиновый комплекс (ГПК).

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES IN A COMPLEX BILE**О. О. Stremoukhov, А. М. Rudnyk, К. V. Andrianov***National University of Pharmacy, Kharkiv*

Summary: an integrated spectrophotometric study of complexes of three kinds of animals' bile was conducted. For the determination of steroids was set the ratio of bile acids and cholesterol.

Key words: bile, bile acids, bile pigments, phospholipids, lipophilic complex, glycoprotein complex.