

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования "Красноярский государственный медицинский
университет имени профессора В.Ф.Войно-Ясенецкого" Министерства
здравоохранения Российской Федерации

Медико-психолого-фармацевтический факультет

Кафедра фармацевтической технологии и фармакогнозии с курсом ПО

Курсовая работа по фармакогнозии
«Полисахариды: методы выделения, анализа и перспективы
использования в медицинской практике»

Выполнила: Студентка 401 группы МПФФ

Черкасова Яна Игоревна

Проверила: к.х.н., доцент

Булгакова Надежда Анатольевна



Красноярск

2019

Содержание

1.	Введение.....	3
2.	Определение и классификация полисахаридов.....	4
3.	Методы выделения полисахаридов.....	5
4.	Методы анализа полисахаридов.....	10
5.	Перспективы использования в медицине.....	14
6.	Вывод.....	16
7.	Список литературы.....	17

Введение

Актуальность

Развитие таких наук как биохимия, физиология, медицина и техника, пополнение экспериментальных данных о важной роли полисахаридов в регуляции биологических процессов, а также сведения об их прикладном значении в различных отраслях человеческой деятельности побудили научную общественность к проведению развернутых и крупномасштабных исследований этих соединений.

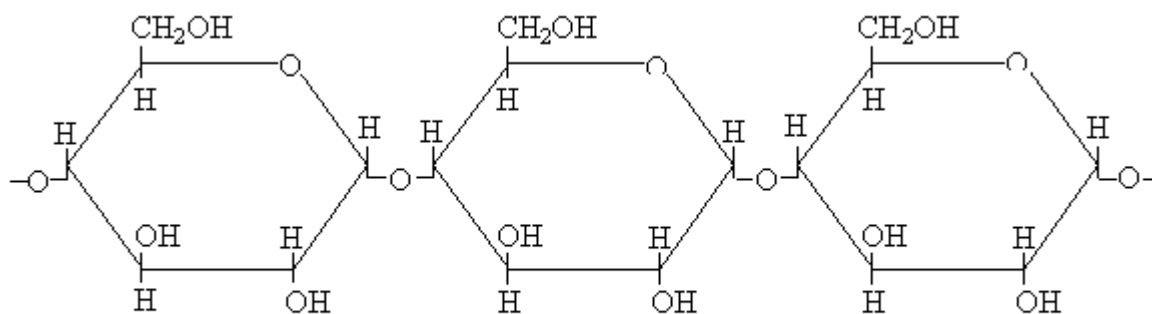
Цель работы:

Изучить основные методы выделения и анализа полисахаридов, определить перспективы использования данных веществ в медицинской практике.

Задачи работы

1. Поиск и ознакомление с научной литературой
2. Определение основных методов выделения и анализа веществ
3. Выяснить востребованность в полисахаридах
4. На основе полученных данных сформулировать вывод.

Полисахариды – это высокомолекулярные продукты конденсации более 5 моносахаридов и их производных, связанных друг с другом О-гликозидными связями и образующие линейные или разветвленные цепи [1].



Крахмал

В состав полисахаридов входят около 20 моносахаридов:

- *гексозы* — глюкоза, галактоза, фруктоза;
- *пентозы* — ксилоза, арабиноза;
- *уроновые кислоты* — глюкуроновая, галактуроновая, маннуроновая.

Полисахариды делятся на два типа:

1. Гомополисахариды (гомополимеры)- построены из моносахаридных единиц (мономеров) одного типа.

1. крахмал
2. клетчатка

2. Гетерополисахариды (гетерополимеры)- из остатков различных моносахаридов и их производных.

1. инулин
2. пектиновые вещества
3. камеди
4. слизи

Методы выделения полисахаридов

В настоящее время в России насчитывают около 296 официально установленных растительных видов и только у 112 из них имеется информация о содержании и структуре полисахаридов, что составляет около 38% от общего числа. Исходя из этих данных, можно сделать вывод о важности создания новых и более эффективных методов выделения полисахаридов [2].

Вне зависимости от вида полисахарида процесс должен быть максимально эффективным, т.е. обеспечивать как можно больший выход продукта, а также полисахарид не должен подвергаться деструкции под воздействием химических реагентов, использованных для его выделения, либо ферментов, присутствующих в составе сырья.

Ниже рассмотрены методы, которые наиболее часто используются для выделения полисахаридов в настоящее время [3].

3.1. Экстракция. Является первоначальной стадией почти каждого процесса выделения. Данный метод используется для: растворения полисахаридов и ряда сопутствующих веществ, а также удаления сопутствующих веществ, потому что в большинстве случаев выделенный полисахарид представляет собой остаток.

Возможно два варианта экстракции:

1) Растворение полисахарида и ряда сопутствующих веществ и отделение нерастворимых примесей, т.к. многочисленные примеси могут оставаться нерастворенными в исходном сырье. Таким образом, получают растительные слизи и некоторые бактериальные экзополисахариды. Чаще всего в качестве растворителя используют воду, однако есть полисахариды с большим количеством кислотных функциональных групп, которые лучше растворяются в разбавленных минеральных кислотах, а гемицеллюлозы экстрагируют в щелочной среде.

Кроме того, в ходе экстракции могут выделиться полярные низкомолекулярные соединения, некоторые белки и нуклеиновые кислоты,

поэтому дальнейшая обработка экстракта предусматривает удаление этих веществ путем очистки. Данный метод экстракции использовался для исследования полисахаридных комплексов в надземной части василька шероховатого[4].

2) Удаление сопутствующих веществ, потому что в большинстве случаев выделенный полисахарид представляет собой остаток. Так, хитин и целлюлоза сохраняют целостность структуры при жёсткой щелочной или окислительной обработке, которая приводит к деструкции остальных биополимеров.

Экстракция требует предварительного измельчения сырья; при этом часть фибриллярных молекул может быть повреждена либо механическим путём, либо окислением кислородом воздуха (последнее - в щелочной среде). Например, такой метод используют для выделения полисахаридов из древесной зелени пихты сибирской [5].

3.2. Осаждение. Перевод вещества из раствора в осадок можно осуществить несколькими путями:

1) Нагревание экстракта / исходной смеси с последующим охлаждением. В ходе данной процедуры выпадают в осадок полисахариды, растворимость которых в горячей воде значительно выше, чем в холодной: β -глюкан из овса, инулин и др.

2) Осаждение органическим растворителем, смешивающимся с водой. Обычно применяют 80% этанол, который растворяет низкомолекулярные примеси, в т. ч. олигосахариды, в то время как полисахариды выпадают в осадок. А также могут использоваться: метанол, ацетон и некоторые другие.

3) Простое осаждение не приводит к разделению смесей растворителей. Например, кислые полисахариды могут быть отделены от нейтральных в виде нерастворимых кальциевых или бариевых солей. Для того чтобы отделить полисахариды друг от друга используют метод фракционного осаждения. В этом случае получают серию фракций осаждаемых веществ, соответствующих

разным концентрациям осадителя в растворе; в каждой фракции содержание целевого полисахарида выше, чем в предыдущей.

4) Для разделения крахмала на амилозу и амилопектин, проводят осаждение амилозы в виде комплекса с н-бутанолом [6]. Исходя из этого можно сделать вывод, что для осаждения и фракционирования полисахаридов также могут использоваться низко- и высокомолекулярные комплексообразователи.

В результате осаждения полисахаридов из первичных экстрактов часто получают смеси, загрязнённые неуглеводными примесями, в первую очередь белком и неорганическими солями, поэтому необходимо подвергнуть экстракт предварительной обработке посредством диализа, ультрафильтрации или ферментативной очистки.

3.2.1. Диализ. Применяется для отделения низкомолекулярных примесей: электролитов (ионы натрия, аммония, сульфата) и низкомолекулярных неэлектролитов (сахар, спирт.) В процессе диализа раствор экстракта помещают в целлофановый сосуд, погружённый в воду; при этом низкомолекулярные примеси диффундируют через целлофан наружу. Диффузия ускоряется под действием электрического поля (электродиализ) или при перемешивании. Для удаления катионов из растворов кислых полисахаридов диализ проводят в подкисленной среде.

3.2.2. Ультрафильтрация представляет собой фильтрацию раствора через полупроницаемую мембрану с определённой величиной пор и так же позволяет избавиться от низкомолекулярных примесей. Чаще всего в качестве мембран используются целлофан и нитроцеллюлоза. Кроме очистки данный метод позволяет сконцентрировать раствор полимера, а в отдельных случаях получить фракции полисахаридов, различающихся молекулярной массой. Однако, ультрафильтрацию применяют, в основном, для подготовки образцов к дальнейшим исследованиям.

3.2.3. Ферментативная обработка разрушает высокомолекулярные примеси, которые не удаётся удалить при помощи диализа. Очистка раствора

от использованного фермента осуществляется одним из методов денатурации белков: нагревание, действие химических реагентов (щёлочи, трихлоруксусной кислоты, хлороформа с амиловым спиртом и т.д.), избирательная сорбция белков на геле фосфата кальция. Такие методы применяются для деструкции неферментных белков, загрязняющих раствор.

3.3. Хроматография - разделение веществ, различающихся по определённым физико-химическим параметрам.

3.3.1. Ионообменная хроматография позволяет разделить вещества в соответствии с их зарядом (например, отделить кислые полисахариды от нейтральных). Ионообменник - это твёрдый носитель заряженных групп, которые способны за счёт электростатического взаимодействия связывать ионы исследуемых молекул. Таким образом, заряженные молекулы обратимо адсорбируются ионообменником и могут быть элюированы для дальнейшей обработки.

3.3.2. Гель-фильтрация (гель-хроматография). Метод основан на том, что при прохождении раствора образца сквозь пористый гель происходит разделение молекул по их размеру. В результате самые маленькие молекулы задерживаются дольше, так как они легче проникают через поры внутрь гранул геля. Крупные же макромолекулы не могут проходить в поры геля, а, следовательно, не задерживаются в гранулах и проходят колонку гораздо быстрее.

3.4. Электрофорез основан на способности веществ, имеющих заряженные группы атомов, двигаться в растворителе под действием электрического поля.

Использование данного метода ограничено сложностью подбора условий эффективного разделения (состав буферной смеси, концентрация растворителя, сила тока, продолжительность фореа и др.) Тем не менее, электрофорез успешно используется для отделения сульфированных полисахаридов от полиуронидов водорослей на пластинках из ацетата целлюлозы [7].

3.5. Ультрацентрифугирование, как и электрофорез, сравнительно редко используется для выделения индивидуальных полисахаридов. Седиментация обеспечивает концентрационное распределение веществ по центрифужной пробирке под действием центробежной силы. Измерение длины траектории движения молекул вдоль направления действия центробежной силы называется определением скорости седиментации; зная эту величину, можно вычислить коэффициент седиментации - показатель, значение которого зависит от молекулярной массы и формы частицы. Данные ультрацентрифугирования могут использоваться не только для оценки гомогенности исследуемого препарата, но и для определения молекулярной массы полимера.

Методы анализа полисахаридов

Данные методы рассмотрены автором статьи, посвященной физико-химическим подходам к анализу природных полисахаридов [12].

1. Гидролиз

Метод гидролиза позволяет установить характер связи и структурные особенности полисахаридов. При этом в макромолекулах разрываются связи, соединяющие моносахаридные звенья–гликозидные связи. Гидролиз протекает в кислотной среде минеральных кислот или в присутствии ферментов. Установление моносахаридного состава возможно при полном гидролизе, в других случаях присутствуют остатки олигосахаридов. Для различных типов гликозидных связей существуют различные ферменты. Кислотный гидролиз будет рассмотрен отдельно.

1.1. Ферментативный гидролиз. Данный метод можно рассмотреть на примере гидролиза крахмала, который осуществляется ферментами класса гидролаз –амилазами: α -амилазы, β -амилазы. Фермент α -амилаза гидролизует крахмал действуя хаотично, разрывает 1,4 связь с образованием декстринов и небольшого количества мальтозы. Фермент β -амилаза гидролизует крахмал действуя с конца цепочки, разрывает связь 1,4 и образует мальтозу, в местах разветвления амилопектина действие β -амилазы прекращается, в этом случае остается небольшое количество декстринов. Следует отметить, что активность ферментов чувствительна к таким параметрам, как pH и температура среды.

1.2. Кислотный гидролиз. Для подготовки полисахарида к последующему моносахаридному анализу и установления типов связей используется кислотный гидролиз. В качестве гидролизующего вещества в кислотном гидролизе используются минеральные кислоты. В настоящее время наибольшей популярностью пользуется трифторуксусная кислота, которая участвует в жестком гидролизе. Для расщепления O–гликозидных связей используется мягкий щелочной гидролиз с NaOH. Жесткий гидролиз используется для гидролиза N-гликозидной связи, при этом применяется HCl или NaOH и представляет собой более концентрированный насыщенный

раствор, чем при мягком гидролизе. Так, например, анализировали моносахаридный состав полисахаридов у Зверобоя Продырявленного [8].

2. Хроматографические методики

Для анализа моно- и олигосахаридного состава используются хроматографические методики.

2.1. Газо-жидкостная хроматография. Для анализа полисахаридов методом ГЖХ их подвергают гидролизу до моносахаридов с последующим получением летучих производных. Как правило, для гидролиза используют серную и трифторуксусную кислоты, но предпочтение отдают более летучей и легко удаляемой трифторуксусной кислоте. Преимуществом данного метода является его высокая чувствительность и использование небольшого количества вещества. Недостатки связаны, в основном, со стадиями получения производных сахаров, когда восстановление или ацетилирование могут пройти не полностью. [9]

2.2. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Одним из наиболее распространенных методов хроматографии является высокоэффективная жидкостная хроматография. ВЭЖХ подразделяется на нормальнофазовую, обращенно-фазовую и эксклюзионную хроматографию. В первом случае неподвижная фаза более полярна, чем подвижная фаза, во втором - наоборот. В общем этот метод основан на разделении компонентов смеси по различному распределению между двумя несмешивающимися фазами - подвижной и неподвижной. На границе раздела этих фаз основную роль в разделении играют различные силы, в основном Ван-дер-Ваальса. В обращенно-фазовой и нормально-фазовой хроматографии эффект разделения достигается за счет разной полярности подвижной и стационарной фаз.

Основная особенность ВЭЖХ состоит в том, что образец для анализа должен быть полностью растворим в подвижной фазе и сорбироваться в стационарной. При этом фазы не должны взаимодействовать друг с другом и с образцом химически. В колонках ВЭЖХ подвижная фаза прокачивается

вместе с веществом через колонку со стационарной фазой под высоким давлением (до 35 МПа).

3. Спектроскопические методы

3.1. Инфракрасная спектроскопия. ИК-Спектроскопия отражает колебания характерных частот органических соединений, а в сложных белках и углеводах позволяет определять характерные частоты функциональных групп. Очень важным является обнаружение характеристической частоты, которая соответствует определенному нормальному колебанию атомной группировки одинаковой частоты для структурно-родственных молекул, имеющих в своем составе данную группировку. Эти частоты позволяют идентифицировать органические соединения. Инфракрасные спектры возникают за счет переходов между колебательными и вращательными уровнями основного электронного состояния при поглощении падающего излучения.

ИК-спектр делится на три области: ближнюю - от 12000 до 4000 см, среднюю - от 4000 до 200 см, дальнюю - от 200 до 10 см. Дальняя область позволяет обнаружить тяжелые молекулы органических соединений, ближняя - легкие молекулы: воду, углекислый газ и т.д.

Данный метод использовался для анализа методов выделения пектиновых полисахаридов в надземной части одуванчика лекарственного, который подтвердил наличие пектиновых веществ в обоих методах выделения, поскольку спектры содержали весь набор характерных для исследуемых веществ полос поглощения. [10]

3.2. ЯМР-спектроскопия. Дополнительным мощным методом анализа полисахаридов является ЯМР-спектроскопия, которая позволяет установить структуру углеводов, включая моносahаридный состав полисахаридов, установить конфигурации и последовательности моносahаридов и/или олигосахаридов. Спектроскопия ядерного магнитного резонанса — физический метод анализа, основанный на регистрации переходов между ядерными магнитными энергетическими уровнями молекул вещества,

находящегося в постоянном магнитном поле. Набор переходов между всевозможными магнитными энергетическими состояниями магнитно активных ядер в молекуле составляет спектр ЯМР. Спектр ЯМР является характеристическим для каждого вещества и поэтому может применяться для его идентификации. На результирующий спектр ЯМР оказывают влияние условия регистрации: агрегатное состояние вещества, температура, наличие других веществ в анализируемом образце [11].

Перспективы использования в медицине

Полисахариды растений обладают различными фармакологическими свойствами. Они могут оказывать выраженное противовоспалительное, ранозаживляющее, антиоксидантное и противорадиационное воздействие, стимулируют процессы кроветворения, активируют функции иммунной системы.

Ведется активное исследование влияния полисахаридов на организм на лабораторных крысах. Например, сульфопроизводные крахмала, пектина, целлюлозы при введении крысам с липидемией вызывали снижение ее уровня и просветление сыворотки крови по типу действия гепарина. Растительные полисахариды образуют комплексы с белками и липопротеидами плазмы крови, что снижает уровень липемии и уменьшает степень атеросклероза сосудов.

Растительные гетерополисахариды, связанные с эритроцитами, вводимыми в организм крыс с иммерсионным охлаждением, усиливают функции макрофагов и нейтрофилов и ускоряют во восстановление организма поврежденных животных.

Полисахариды проявляют протекторную активность при различного рода облучениях, включая ионизирующую радиацию. Крахмал и декстрин увеличивают среднюю продолжительность жизни мышей, после их облучения сублетальными дозами рентгеновских лучей [13].

Полисахариды левзеи, одуванчика и подорожника потенцируют противоопухолевую и не влияют на антиметастатическую активность циклофосфана [14]. Такое же действие можно наблюдать у полисахаридных комплексов, выделенных из корневищ аира болотного. Растительные полисахариды способны уменьшать рост и метастазирование blastom, подавляя ангиогенез и индуцируя процесс апоптоза в опухолевой ткани [15].

Следовательно, можно утверждать о способности полисахаридов влиять на обмен веществ, а также на иммунную систему и оказывать протекторный эффект. В онкологической практике в настоящее время актуален поиск

средств, обладающих противоопухолевой активностью, а также снижающие токсические проявления цитостатиков и полисахариды нашли применение в решении этих целей.

Растительные полисахариды проявляют высокую биологическую активность, не обладают токсичностью, аллергенностью, пирогенностью, таким образом, все это открывает широкие возможности использования их в практической медицине.

Вывод

Таким образом, проведенные в последние годы исследования по изучению методов выделения и анализа полисахаридов растения, а также нахождение новых фармакологических свойств данных веществ показывают, что полисахариды обладают большой востребованностью в профилактике и лечении различных заболеваний.

Постепенно разрабатываются новые методы выделения полисахаридов для получения более качественных и в больших концентрациях данных веществ.

Также улучшаются методы анализа для более полного изучения структуры и свойств полисахаридов.

Все это ведется для создания новых лекарственных средств, обладающих малой токсичностью, а, следовательно, меньшим риском возникновения нежелательных побочных реакций, которые будут применяться для профилактики и лечения как старых, так и новых заболеваний.

Список литературы

1. Полисахариды–высокомолекулярные продукты конденсации [Электронный ресурс]. –Режим доступа: <http://lektsii.com/>, свободный
2. Оленников Д.Н., Кащенко Н.И. Полисахариды. Современное состояние изученности: экспериментально-наукометрическое исследование/ Оленников Д.Н., Кащенко Н.И.//Химия растительного сырья. –2014. –№1. –С.5–26.
3. Шиповская А.Б. Методы выделения и физико-химические свойства природных полисахаридов [Электронный ресурс]. –Режим доступа: http://elibrary.sgu.ru/uch_lit/1273.pdf, свободный
4. Ларькина М.С., Кривошеков С.В., Гурьев А.М., Кадырова Т.В., Ермилова Е.В. Характеристика полисахаридных комплексов Василька Шероховатого (*CENTAUREA SCABIOSA* L.) и Василька Ложнопятнистого (*CENTAUREA PSEUDOMACULOSA* DOBRO CZ.) / Ларькина М.С., Кривошеков С.В., Гурьев А.М., Кадырова Т.В., Ермилова Е.В.// Химия растительного сырья–2016. –№2. –С.19–24.
5. Макарова Е.Н., Михайлова Е.А., Демин В.А., Патова (Бушнева) О.А. Сезонная динамика и биологическая активность полисахаридов древесной зелени пихты сибирской *ABIES SIBIRICA* LEDEB/Макарова Е.Н., Михайлова Е.А., Демин В.А., Патова (Бушнева) О.А.// Химия растительного сырья. –2011. –№1. –С.35–42.
6. Закирова А.Ш., Ягофаров Д.Ш., Канарский А.В., Сидоров Ю.Д. Сравнительная оценка эффективности разделения картофельного крахмала на амилозу и амилопектин химическими методами/Закирова А.Ш., Ягофаров Д.Ш., Канарский А.В., Сидоров Ю.Д.// Вестник Казанского технологического университета. –2010. –С.621–625.
7. Усов А.И., Билан М.И. Фукоиданы–сульфатированные полисахариды бурых водорослей/ Усов А.И., Билан М.И.// Успехи химии. –2009. –№78(8). – С.846–862.

8. Злобин А.А., Мартинсон Е.А., Овечкина И.А., Дурнев Е.А., Оводова Р.Г., Состав и свойства пектиновых полисахаридов Зверобоя Продырявленного *HYPERICUM PERFORATUM L*/ Злобин А.А., Мартинсон Е.А., Овечкина И.А., Дурнев Е.А., Оводова Р.Г.// Химия растительного сырья. –2011. –№1. –С.33–38.
9. Кравченко А.О. Комплексное исследование полисахаридов и фотосинтетических пигментов красной водоросли *Ahnfeltiopsis flabelliformis*: диссертация кандидата химических наук /А.О. Кравченко–Владивосток–2015. – 161 с.
10. Тигунцева Н.П., Каницкая Л.В., Евстафьев С.Н., Ушаков И.А. Пектиновые полисахариды надземной части Одуванчика Лекарственного *TARAXACUM OFFICINALE WIGG.* / 10. Тигунцева Н.П., Каницкая Л.В., Евстафьев С.Н., Ушаков И.А.// Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. –2014. –№4(9). –С.61–68.
11. ОФС.1.7.2.0014.15 Метод спектроскопии ЯМР для определения подлинности полисахаридных вакцин// Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. –Т.2. – Москва, 2018. – 2908-2911 с.
12. Генералов Е.А. Физико-химические подходы к анализу полисахаридов/Генералов Е.А.// Auditorium: электронный научный журнал Курского государственного университета. –2015. –№4(08).
13. Сычев И.А., Калинкина О.В., Лаксаева Е.А., Биологическая активность растительных полисахаридов/ Сычев И.А., Калинкина О.В., Лаксаева Е.А.// Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2009.–С.1–6.
14. Гурьев А.М. Химико-фармакологическое исследование полисахаридов высших растений и перспективы их использования в терапии злокачественных новообразований: автореферат, диссертация/А.М. Гурьев – Томск –2011. –297 с.

15. Сафонова Е.А., Гурьев А.М., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Ефимова Л.А., Повышение эффективности химиотерапии с помощью фармакологически активных фракций, выделенных из полисахаридного комплекса аира болотного (*ACORUS CALAMUS L.*) / Сафонова Е.А., Гурьев А.М., Разина Т.Г., Зуева Е.П., Ефимова Л.А.// Российский биотерапевтический журнал. – 2012. –№4. –С.55–58.