

pH гидратируемые группы лигносульфонатов локализируются во внутренней структуре макроассоциатов, что способствует увеличению поверхностной активности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Набойченко С.С., Ни Я.М., Шнеерсон Я.М., Чугаев Л.В. Автоклавная гидрометаллургия цветных металлов. - Екатеринбург:

ГОУ УГТУ-УПИ, 2002., с. 940.

2. Sayed M.S., Aly M.S., Mousa M.A. // Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. - 2001.- Vol 247, № 1, -P. 139-144.
3. Шелудко А. Коллоидная химия. М.: Мир, 1984. с.319.
4. Можейко Л.Н., Балцере Д.Ю., Гринева Л.А., Яунземс В.Р. // Химия древесины.- 1972.-№11.- С. 87-91.

ПОЛИМЕРНЫЕ АДСОРБЕНТЫ АФФИННОГО ТИПА В ИССЛЕДОВАНИИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ. XXVI. ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТ ГИНКГО БИЛОБА, МЕТОДОМ НЕКЛАСИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В.В. Халахин, П.В. Кузнецов

В настоящей работе впервые сконструирован адсорбент аффинного типа, содержащий в качестве лиганда-модификатора сумму флавоноидов экстракта Гинкго Билоба (EGb 761), который использован для разделения суммы флавоноидов данного экстракта. В полученных двух флавоноидных фракциях идентифицированы следующие вещества: изорамнетин, кемпферол (первая фракция), кверцетин (вторая фракция), что соответствует данным литературы.

ВВЕДЕНИЕ

По литературным данным известно [1,2], что лекарственный препарат Танакан (EGb761, Франция) содержит следующие основные группы биологически активные веществ (БАВ): терпеновые вещества, флавоноидные гликозиды, гинколиды А, В, С, билобалиды и органические кислоты [3]. Нам удалось ранее [4,5] методом жидкостной хроматографии (ЖКХ) на универсальном адсорбенте сефадекс LH-20 (СФ-20) и некоторых его химически модифицированных аналогов разделить БАВ лекарственного средства Танакан на две ключевые фракции. Первая фракция содержит сумму терпеновых веществ, вторая – сумму флавоноидов.

Цель данной работы: синтез оригинального азоадсорбента аффинного типа (азо-ААФТ), в котором в качестве лиганда-модификатора мы использовали суммарную флавоноидную фракцию (СФФ), полученную ранее методом ЖКХ на СФ-20.

Полученный азо-ААФТ применен нами для разделения и изучения флавоноидных БАВ данного препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В настоящей работе нами использованы химические реагенты и вещества; эпихлоргидрин (ЭХГ, "Sigma", США), п-нитробензгидразид (п-НБГ, "Sigma", США), натрия нитрит, натрия дитионит (Япония); следующие сорбенты: СФ-20("Pharmacia", Швеция) и его химически эпоксимодифицированный аналог СФ-20-ЭХГ-п-НБГ-СФФ. Другие препараты: диметилсульфоксид (Димексид, КПХФО "Татхим-фармпрепараты", Казань, (ДМСО) соответствовали квалификации х.ч. или ч.д.а. Для тонкослойной хроматографии (ТСХ) применяли хроматографические пластины "Silufol" производства фирмы "Kavalier" (Чехия). Природные стандартные вещества, производные флавоноидов: кверцетин, изорамнетин, кемпферол, получены из коллекций аналитических образцов кафедры фармакогнозии и ботаники Санкт-Петербургской химико-фармацевтической академии (заведующий кафедрой профессор Яковлев Г.П.).

Синтез азо-ААФТ проводили по следующим стадиям:

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТ ГИНГКО БИЛОБА, МЕТОДОМ НЕКЛАСИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

Эпихлоргидринактивация сорбента СФ-20. 40 мл приготовленного геля сорбента промывали на стеклянном фильтре последовательно: 80 мл дистиллированной воды, 80 мл 1 н раствором NaOH, 40 мл 0,5 н раствором NaOH в 25 % растворе диметилсульфоксида. Промытый гель переносили в колбу со смесью 40мл 0,5 н раствором NaOH в 25 % растворе диметилсульфоксида и 10 мл 1,5 % водного раствора тетрабутиламмония бромида, перемешивали. К нему при перемешивании приливали 20 - 22 мл эпихлоргидрина. Реакционную смесь далее перемешивали на роторном испарителе ИП-1 (Россия) при температуре 50°C в течение 2 - 3 ч.

Активированный гель, имеющий желтоватый оттенок, переносили на стеклянный фильтр и тщательно промывали 80 мл 25 % водного раствора ДМСО, 200 мл насыщенного раствора натрия тетрабората, 400 мл дистиллированной воды, 40 мл 50 % водного раствора ДМСО и окончательно отмывали дистиллированной водой до отрицательной фенолфталеиновой пробы промывных вод [6].

Определение концентрации активных концевых эпокси групп на поверхности эпоксиактивированного адсорбента. Проводили известным методом: к 0,9 – 1,0 мл упакованного объема эпокси геля добавляем 1,0 мл насыщенного раствора натрия тиосульфата, 1-2 капли индикатора фенолфталеина и оставляли на один час, периодически встряхивая (часовая проба). При наличии в структуре полимерного носителя активных концевых эпокси групп, раствор над поверхностью адсорбента окрашивается в малиновый цвет (качественная фенолфталеиновая проба, [6]). Окрашенную смесь количественно переносили в пластиковую ёмкость и титровали свежеприготовленным 0,01 н раствором HCl до исчезновения малиновой окраски (от одной капли титранта). Полученный результат пересчитывали на 1 мл адсорбента, определяя ёмкость геля по активным эпокси группам. Обнаруженная концентрация эпокси групп для упакованного геля декстранового адсорбента СФ-20 оказалась на уровне 20 — 25 мкмоль эпокси групп/мл.

Иммобилизация вставки. Для синтеза азо-ААФТ аминофенильным способом [6] применяли методику иммобилизации фенольных лигандов. 20 мл полученного эпоксиадсорбента суспендировали в 10 мл насыщенного раствора натрия тетрабората и смешивали с 10 мл смеси состава: ДМСО — насыщенный раствор натрия тетрабората (1:1), в которой предварительно растворили

0,25 - 0,3 г п-НБГ. Реакционную смесь нагревали 1 ч при температуре 40 - 45°C, после чего гель отмывали на стеклянном фильтре насыщенным раствором натрия тетрабората, 50 % раствором ДМСО и дистиллированной водой. Контроль за отмывкой п-НБГ промывных вод проводили реактивом Инмана-Динтзиса (темно-красное окрашивание).

Последующее восстановление нитрогруппы в пНБГ проводили дитионитом натрия по методике работы [6]. Качество восстановления проверяли так же реактивом Инмана-Динтзиса (желто-оранжевое окрашивание).

Иммобилизация лиганда. На адсорбент с модифицированный вставкой (пНБГ), иммобилизовали по реакции азосочетания [6], спиртовую фракцию препарата Танакан (таблетки 0,4, №30, Бофур Ипсен Индастри Dreux. France, серия P544). Полученную ранее в работе [5].

Химическая структура синтезированного азо-ААФТ показана на рисунке 1, он имел желто-оранжевую окраску, легко давал дитионитную пробу на азосвязь, фенольные гидроксилы на полимерной матрице идентифицировались по реакции с ионами железа [III] [6].

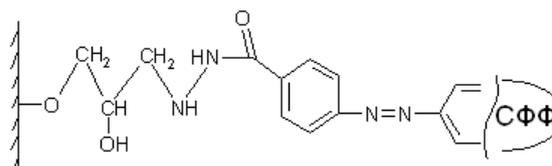


Рисунок 1. Химическая структура синтезированного азо-ААФТ

Колоночную хроматографию проводили на колонках (Pharmacia, 125×5 мм) с объемом адсорбента 5 мл. Адсорбент промывали на стеклянном фильтре дистиллированной водой 200 мл, затем 0,1 н раствором NaOH 50 мл, 100 мл воды дистиллированной и 50 мл 0,1 н HCl и окончательно отмывали водой дистиллированной до pH 7 (по универсальному индикатору) промывных вод. Подготовленный адсорбент переносили в колонку с последующей упаковкой геля.

Элюцию проводили последовательно: водой, насыщенным раствором натрия тетрабората, 0,05 н. раствором NaOH и 50% раствором ацетонитрила.

Элюат собирали с помощью коллектора фракций DOMBIFRAC D-002 (Россия) объемом по 3 мл. Скорость элюции - 0,2 мл/мин. Детектирование проводили методом УФ-спектроскопии (СФ-26 Россия) при длине волны 230 нм, 250 нм и 270 нм. Идентификацию хроматографических пиков осуществля-

ли спектрофотометрически, а так же методом ТСХ (рисунок 2-4) .

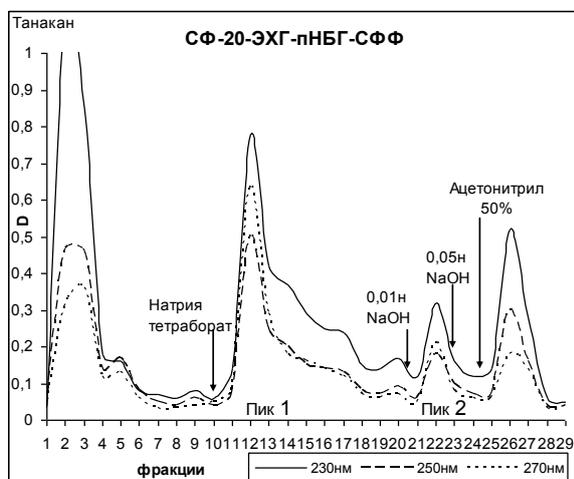


Рисунок 2. Хроматограмма препарата Танакан, полученная методом ЖКХ на азо-ААФТ: СФ-20-ЭХГ-пНБГ-СФФ

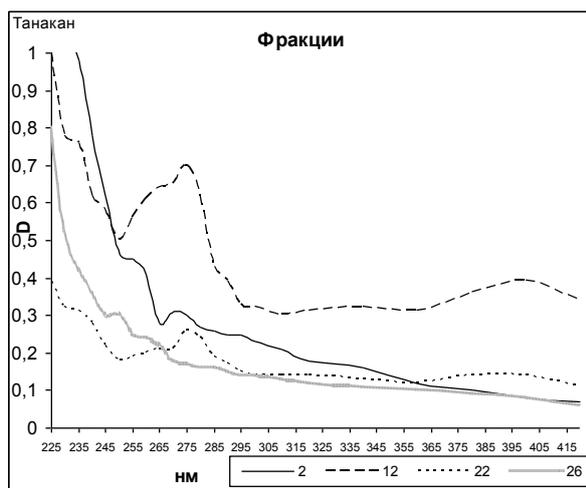


Рисунок 3. УФ-спектр полученных фракций

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Особо отметим, что элюция флавоноидов насыщенным раствором натрия тетрабората (элюент Кузнецова-Халахина), исследуемого препарата, применялся нами впервые в работе [7].

Интересно отметить, что удлинение вставки (эпоксидирование диглицидиловым эфиром 1,2 этандиола) в структуре азо-ААФТ, практически не изменяла результатов разделения флавоноидов препарата.

Полученные пики флавоноидов под номерами 1 и 2 накапливали и для идентификации флавоноидов проводили ТСХ на пластинах "Silufol", с последующим определением: по собственной окраске и в ультрафиоле-

товом свете. Для сравнения в качестве свидетелей использовали стандартные вещества (см. экспериментальную часть): изорамнетин, кемпферол- 3-глюкозид (астрагалин), кверцетин. Опытным путем из 3-4 систем, таких как: хлороформ- уксусная кислота- ацетон (75:25:10), бензол- этилацетат- муравьиная кислота (4,5:3,5:2) и др., определили наилучшую систему для разделения данных флавоноидов. Ей оказалась система: этилацетат: муравьиная кислота : вода, в соотношениях 8:1:1[8].

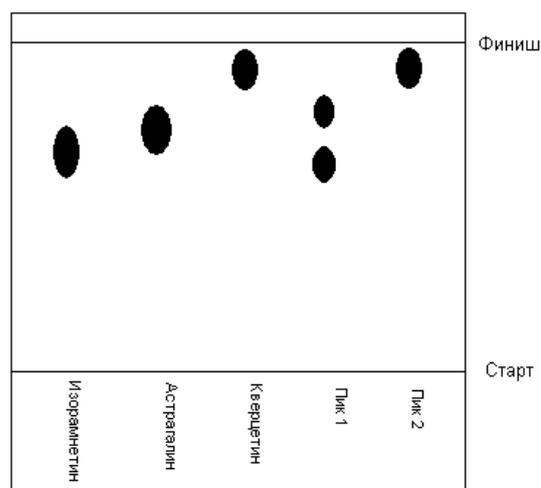


Рисунок 4. Тонкослойная хроматография исследуемых пиков

На наш взгляд, R_f вещества стандарта астрагалин, может не совпадать с компонентами пика 1, ввиду наличия в последнем примесей тетрабората натрия, которые модифицируют (изменение pH , ионной силы) классическую систему, описанную в работе [8].

Таблица 1

Значения R_f исследуемых пиков и образцов сравнения

Образец	Значения R_f
Изорамнетин	77
Кемпферол- 3-глюкозид(астрагалин)	83
Кверцетин	95
Пик № 1	60 и 81
Пик №2	95

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами впервые в данной работе синтезирован новый азо-ААФТ с лигандом-модификатором СФФ, который использован в режиме неклассической аффин-

ИЗУЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА, СОДЕРЖАЩЕГО ЭКСТРАКТ ГИНГКО БИЛОБА, МЕТОДОМ НЕКЛАСИЧЕСКОЙ АФФИННОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

ной хроматографии [6] (вариант ЖКХ) для изучения флавоноидной фракции препарата Танакан. Данная стратегия при получении азо-ААФТ, где в качестве лиганда-модификатора использована суммарная флавоноидная фракция исследуемого объекта, впервые описана в работе [9].

В данной работе так же впервые показан уникальный эффект разделения и накопления (обильный остаток в процессе высушивания) при применении элюента Кузнецова - Халахина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jaggy H. Koch E. // Pharmazie.— 1997.— V.52, № 10.— P. 735–738.
2. B. Duff, Sloley S.R., Tawfik K.A., Scherban Y.K. Tam J. // Food and Drug Anal. 2.- Vol.11.- 2003.- P.102-107.
3. Зузук, Б. М., Куцук, Р. В., Томчук, Ю. Ю., Дармограй, Р. Е. // Провизор.-2001.-№19.- С.15-22.
4. Халахин В.В., Кузнецов П.В. // Сборник тезисов докладов. Химия XXI – век: новые технологии, новые продукты.- Кемерово, 2007.- С.160-161.
5. Халахин В.В., Кузнецов П.В. // Сборник научных трудов пятигорской фармацевтической академии том №63 Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.- Пятигорск.- 2008. – С. 353-355.
6. Кузнецов П. В. Эпоксидированные адсорбенты аффинного типа в исследовании физиологически активных веществ. Кемерово. Кузбассвуиздат.- 2002.- 104 с.
7. Халахин В.В., Дудин А.А., Кузнецов П.В. // Ползуновский вестник. 2008.- № 3.- С.190-193.
8. Шаршунова М. Шварц В. Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Мир.- М.- 1980.- Том 2 .- 621с.
Сухих А.С., Коршунов А.В., Кузнецов П.В. // Сборник научных трудов пятигорской фармацевтической академии том №63 Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции.- Пятигорск.- 2008. – С. 339-341.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ИММОБИЛИЗАЦИИ КУЛЬТУРЫ РАСТИТЕЛЬНЫХ КЛЕТОК И ТКАНЕЙ НА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ НОСИТЕЛЯХ IN VITRO

А.С. Косолапова, М.Э. Ламберова

Разработаны новые подходы к интенсификации традиционных трудоемких способов культивирования клеток и тканей in vitro.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время является актуальной разработка новых подходов к интенсификации традиционных трудоемких способов культивирования клеток и тканей in vitro.

Современный метод культуры клеток и тканей позволяет получить чистую клеточную биомассу лекарственных растений или размножить оздоровленный безвирусный посадочный материал сельскохозяйственных растений в сравнительно короткий срок на ограниченных площадях. Все стадии этого процесса требуют строгого соблюдения правил асептики.

К известным проблемам относятся трудоемкость метода, большой расход компонентов

питательной среды, относительно невысокая эффективность стерилизации эксплантов.

Агар – традиционный носитель культуры клеток и тканей in vitro, является дефицитным и дорогостоящим. Полисахарид агар образует прочный студень, обладающий стекловидным изломом без добавки кислоты и сахара, его желирующая способность в 10 раз больше, чем у желатина. Попытка замены его на белок желатин показала, что растительные клетки не так плохо растут, несмотря на приемлемую температуру его плавления. Короткие сроки культивирования клеток и тканей in vitro и необходимость дополнительной стерилизации посадочного материала значительно усложняют данный процесс.