

Таблица 5
Листы разделения экстрактов тканевой культуры *Ranunculus repens* (окрашивание HNO_3)

Опыт 1					Опыт 2				
N	HNO ₃	UVI	R ₁	R ₂	N	HNO ₃	UVI	R ₁	R ₂
1	кор.	-	0,04	0,00	9	ж	+	0,35	0,03
4	кор.	+	0,13	0,02	14	ж	+	0,30	0,15
5	кор.	+	0,15	0,02	15	к	-*	0,35	0,26
10	к	-*	0,38	0,22	16	+	+	0,35	0,25
11	+	+	0,38	0,21	23	м	-	0,41	0,49
17	м	+	0,46	0,44	26	м	-*	0,61	0,53
22	м	-*	0,61	0,50	27	+	+	0,62	0,51
23	+	+	0,62	0,48	28	ж	+	0,66	0,49
24	ж	+	0,65	0,49					

Примечание. HNO_3 — окрашивание азотной кислотой; UVI — детекция гашения флуоресценции флуорофора пластины в ультрафиолете ($\lambda = 254 \text{ нм}$); R_1 — значение R_f в системе 1; R_2 — значение R_f в системе 2; ж — желтый; к — красный; м — малиновый; кор. — коричневый.

* Центры пятен 10 и 11, 15 и 16, 22 и 23, 26 и 27 при обнаружении с помощью HNO_3 и детектировании гашения флуоресценции при $\lambda = 254 \text{ нм}$, соответственно, не совпадают.

Ranunculus repens могут фиксироваться при фотоколориметрических измерениях и искажать величину светотропизма раствором суммарного экстракта по сравнению с величиной светотропизма раствора чистого алкалоида. Проведение измерений с использованием дистиллированной воды в кювете сравнения, а не раствора алкалоидов, пореагировавшего в азотной кислоте до исчезновения пурпурной окраски, увеличивает погрешность определения. Кроме того, изменение соотношения весовых долей окрашивающихся и неокрашивающихся азотной кислотой алкалоидов в суммарном экстракте может существенно сказываться на результатах колориметрических измерений.

Анализ приведенных выше результатов исследований и литературных данных позволяет сделать следующие выводы.

Величина светопоглощения (зеленый светофильтр, $\lambda = 520 \text{ нм}$) раствора суммарного экстракта алкалоидов,

полученного в опыте 1, отличается от величины светопоглощения раствора алкалоида в азотной кислоте, что может приводить к значительным (более 50 %) погрешностям измерений в случае использования калибровочной кривой, построенной по очищенному образцу алкалоида.

Суммарный хлороформный экстракт, полученный в опыте 1, содержит примеси, отсутствующие в суммарном экстракте алкалоидов, полученном в опыте 2, что подтверждается гравиметрическим анализом.

Анализ результатов ТСХ демонстрирует более широкий спектр соединений, выявляемых качественными реакциями идиолных алкалоидов суммарного экстракта, полученного в опыте 2, по сравнению с экстрактом, полученным в опыте 1.

Анализ хроматограмм, обработанных азотной кислотой, показывает наличие хромогенных компонентов в составе экстракта, полученного в опыте 1, но отсутствующих в экстракте, полученном в опыте 2.

ЛИТЕРАТУРА

1. R. Verpoorte, R. Heigen, W. van der Gulik, et al., *The Alkaloids, Chemistry and Pharmacology*, Vol. 40, Ed. Y. P. S. Bajaj, San Diego, Acad. Press, Inc. (1991), p. 187.
2. A. Г. Волососвич, Л. А. Николаева, Н. К. Позняков и др., *Раст. ресурсы*, 13(1), 127 — 132 (1977).
3. A. Г. Волососвич, Т. Н. Пучина, С. Н. Гутман и др., *Раст. ресурсы*, 17(4), 585 — 586 (1981).
4. Н. Е. Волососвич, А. Г. Волососвич, Т. А. Ковалева и др., *Растит. ресурсы*, 12(4), 578 — 583 (1976).
5. В. А. Кунах, *Биополимеры и клетка*, 10(1), 3 — 30 (1994).
6. Ю. В. Шелудько, И. А. Костенко, *Цитология и генетика*, 28(4), 35 — 38 (1994).
7. T. Murakige and F. Skoog, *Physiologia Plantarum*, 5(13), 473 — 497 (1962).
8. A. J. Puri, A. C. J. Peart, J. D. Hamill, et al., *Plant Cell Rep.*, 7(5), 309 — 312 (1988).
9. I. A. Kostenyuk, O. F. Lubaretz, S. Endre, et al., In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Ed. J. P. S. Bajaj, Vol. 27, Berlin (1994), pp. 405 — 424.
10. T. A. Van Beek, R. Verpoorte, A. Baerheim Svendsen, *J. Chromatogr.*, Vol. 298, pp. 289 — 307 (1984).
11. Г. Ф. Лавин, *Биометрия*, Высшая школа, Москва (1980), с. 293.

Получена 22.05.95

Методы синтеза и технология производства лекарственных средств

© Коллектив авторов, 1995

Е. В. Компанцева, М. В. Гаврилин, Л. С. Ушакова

ПРОИЗВОДНЫЕ β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦИИ (ОБЗОР)

Питомский государственный фармацевтический институт

Разработка и производство новых готовых лекарственных средств всегда предполагает использование различных вспомогательных веществ. Их роль заключается не только в том, чтобы придать лекарственному веществу (ЛВ) удобную для применения форму. Часто вспомогательные вещества могут определять биологическую доступность ЛВ, являясь его носителем. Примером носителей такого рода могут быть кониты, различные сорбенты или циклодекстрины (ЦД).

ЦД представляют собой циклические олигосахариды, состоящие из 6 — 8 молекул глюкозы, соединенные между собой 1-4-гликозидными связями. При этом внутри молекулы ЦД образуется полость в виде канала диаметром 70 — 90 пм. Такая структура молекулы позволяет ЦД образовывать с различными химическими комплексами включения (КВ) по типу "хозяин-гость". Основным условием образования этих комплексов является соответствие размеров молекул "гостей" полостям "хозяина" [1].

В настоящее время ЦД достаточно хорошо изучены и используются в фармацевтической практике для повышения стабильности, устранения неприятного запаха, вкуса, улучшения растворимости и биологической доступности ЛВ [2, 3]. Из природных ЦД перспективное значение приобрели β -циклодекстрины (БЦД) (I) в силу своей доступности, α - и γ -ЦД в настоящее время очень дороги. Вместе с тем следует отметить, что широкое применение БЦД ограничивается его низкой растворимостью в воде: 1,85 г/100 мл при 20 °С [1, 4].

С середины 80-х годов были начаты широкомасштабные исследования по получению различных производных ЦД, характеризующихся высокой растворимостью и отсутствием нефротоксичности, наблюдаемой при парентеральном введении [5].

В настоящее время известны алкильные, гидроксикалькильные, ацильные, карбоксильные и аминпропильные БЦД [6], которые различаются своей растворимостью. К гидрофильным производным относят метиллированные (2,3-диметил-БЦД, 2,3,6-триметил-БЦД, гидроксикалькильные (2-гидроксипропил-БЦД, 2,3-дигидроксипропил-БЦД, 2-гидроксиэтил-БЦД, 2,3-дигидроксиэтил-БЦД), а также разветвленные производные — мальтозил-БЦД и глюкозил-БЦД. Все они характеризуются хорошей растворимостью в воде, а по своей способности биотрансформации намного превосходят БЦД.

Гидрофильные производные представляют диэтильными и триэтильными производными БЦД. Они характеризуются низкой растворимостью в воде и могут быть использованы для пролонгирования действия ЛВ.

Третью группу составляют ионизированные производные БЦД — карбоксильные и аминпропильные. Их

растворимость и сольбилизирующая активность находятся в сильной зависимости от pH среды [7, 8].

Следует отметить, что вследствие доступности БЦД (низкие цены, простота производства), производные других ЦД не получили широкого распространения, а из производных БЦД наиболее перспективными оказались алкильные и гидроксикалькильные.

Методы исследования взаимодействия ЛВ с производными БЦД

Среди различных методов изучения взаимодействия ЦД с ЛВ наиболее распространение имеет метод "фазовой растворимости" [9]. Это связано с тем, что взаимодействие с ЦД практически всегда приводит к изменению растворимости ЛВ, как правило, к ее увеличению. Для изучения взаимодействия этим методом исследуют растворимость ЛВ в растворах различной концентрации. По полученным кривым рассчитывается константа образования комплекса. Этим методом было изучено взаимодействие 2,3-диметил-БЦД (I) и 2,3,6-триметил-БЦД (II) с различными стероидными гормонами [10], нестероидными противовоспалительными средствами [11].

С целью установления факта образования комплексов в растворах используются методы спектрофлуориметрии, электронной и ЯМР-спектроскопии [10, 12]. Для исследования взаимодействия 2-гидроксипропил-БЦД (III) с афлатоксином в растворах был использован метод флуориметрии [13]. В [14] описано использование для этих целей обращенно-фазной ТСХ. Пластинку предварительно импрегнируют жидким парафином, а затем исследуют подвижность ЛВ, используя в качестве подвижной фазы водно-этанольные растворы III.

Для изучения КВ в твердом состоянии широко используется ИК-спектроскопия [15], ^{13}C ЯМР-спектроскопия [16], дифференциальная сканирующая калориметрия, рентгеноструктурный анализ [17, 18]. При этом был выявлен ряд общих закономерностей. Установлено, что образование комплексов сопровождается возникновением водородных связей между протонами гидроксильных ЦД и карбонильным кислородом ЛВ (идометилин, вольтарен, стероиды). КВ с I имеют канальную структуру, образованную двумя молекулами ЦД. Для КВ III характерно только аморфное состояние, а для КВ I и II уменьшение кристаллическости [17, 19].

Изменение биологической доступности ЛВ при комплексировании с производными БЦД легко оценивается при помощи теста "вращающаяся корзинка". Этим методом установлено повышение биологической доступности фуросемида, гидрохлортиазида, мебедазола, метронидазола и кавинтона при взаимодействии с I [20 — 22].

Ю. В. Шелудько, И. М. Герасименко, И. А. Костенюк

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ИНДОЛЬНЫХ АЛКАЛОИДОВ

Институт клеточной биологии и генетической инженерии НАН Украины, Киев

При проведении исследований в области клеточной биологии растений-продуцентов возникает необходимость точного количественного определения продуктов вторичного синтеза, например, в растениях *Salvinia helix* и *Limnolobos sergentii* (Арсенасе), являющихся источником ряда фармакологически активных индолевых алкалоидов [1].

В конце 70-х годов А. Г. Воллосович и соавторы [2, 3] предложили простой метод колориметрического определения суммы индолевых алкалоидов в культуре клеток реулофитной змеиной на основании свойства алкалоидов и структурно близких ему алкалоидов давать пурпурное окрашивание в растворе концентрированной азотной кислоты. Этот метод был использован в ряде работ по клеточной селекции и мутагенезу для создания высокопродуктивных штаммов реулофитной змеиной [4, 5]. Мы также использовали этот подход в своих экспериментах с трансгенной корневой культурой реулофиты [6]. Вместе с тем, анализ результатов этих работ показал возможность расширения диапазона применимости метода в биотехнологии растений-продуцентов.

Экспериментальная часть

Биологический материал. В экспериментах использовали части интактного окрашенного растения и трансгенную корневую культуру *Limnolobos sergentii*, полученную нами ранее [6], которую культивировали на жидкой питательной среде MS [7] без гормонов при температуре 25 °С в темноте на шейкере с частотой 100 колебаний/мин. Длительность пассажа составляла 14 суток. Биомассу отбирали в различные периоды культивирования, замораживали жидким азотом и лиофильно высушивали.

Экстракция. Суммарные экстракты алкалоидов получали методами Воллосовича и соавторов [3] (опыт 1) и Парра с соавторами [8] в нашей модификации [9] (опыт 2).

Опыт 1. Лиофильно высушенную ткань трансгенной корневой культуры *R. sergentii* измельчают до состояния однородного порошка, улаживают 10 % раствором аммиака (0,8 мл на 100 мг сухого веса). Через 2–3 мин добавляют хлороформ (20 мл на 100 мг сухого веса) и экстрагируют на шейкере в течение 5 ч при частоте 300 колебаний/мин. Экстракт фильтруют и высушивают над безводным сульфатом натрия; биомассу повторно экстрагируют 1,5 объемами хлороформа. Затем экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре 35 °С до объема 20 мл и переносит во флакон. Упаривают на воздухе (под тягой!) до образования густого осадка и затем сушат лиофильно.

Опыт 2. Измельченную лиофильно высушенную ткань экстрагируют 0,5 % водным раствором ортофосфорной кислотой с pH 2,0 (10 мл на 100 мг сухого веса) на шейкере в течение 5 ч (200 колебаний/мин). Экстракт фильтруют, биомассу повторно экстрагируют 0,3 объемами 0,5 % фосфорной кислоты. Контролируют значе-

ние pH и в случае необходимости доводят до 2,0, после чего добавляют толую (0,5 объема водного экстракта). Пробу интенсивно встряхивают 1–2 мин и после отстаивания отбирают водную фазу с помощью делительной воронки (порция 1). Эмульсию центрифугируют 5 мин при 8000 оборотов/мин, после чего отбирают водную фазу и соединяют с первой порцией. Доводят pH водной фазы до 8,0 с помощью 25 % водного раствора аммиака и трижды экстрагируют толую. Все порции органического экстракта объединяют и высушивают над безводным сульфатом натрия. Затем толуюльный экстракт упаривают на ротационном испарителе при температуре 40 °С до объема 20 мл и переносит во флакон. Упаривают на воздухе под тягой до образования густого осадка, затем досушивают лиофильно.

Количественное определение суммы алкалоидов. Анализ проводят на фотоспектроколориметре ELMED KF-5 (Польша) с зеленым светофильтром ($\lambda = 520$ нм). Фотоспектроколориметр калибруют по стандартному раствору аймалина (Setra) и стандартному раствору алкалоидов суммарного хлороформного экстракта, полученного в опыте 1 (в дальнейшем, раствору суммарного хлороформного экстракта).

Качественное исследование суммарных экстрактов алкалоидов. Качественный анализ суммы алкалоидов проводят методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках Merck UV 254 SilicaGel, 0,25 мм (10×10 , 10×5 и 10×4 см) (Германия) с последующим окрашиванием хроматограмм реактивом — церий (IV)аммоний сульфатом (Fluka) (5 % раствор в 85 % фосфорной кислоте) или 68 % азотной кислотой. Системы растворителей (объем/объем):

- 1) хлороформ — метанол — аммиак — 9:1:0,1 [9];
- 2) хлороформ — гексан — диэтиламин — 6:3:1 [9];
- 3) этилацетат — изопропанол — аммиак — 17:2:1 [10];
- 4) ацетон — хлороформ — вода — 16:4:1 [11].

При построении графиков был использован персональный компьютер TIKO PSX 325 с программой GRAPHNER Copyright (C) 1986 Golden Software, Inc.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлен калибровочный график, построенный по результатам измерений светорассеяния растворов аймалина (Setra, Германия) различной концентрации в HNO₃. В качестве контрольного раствора при проведении фотоспектрометрических измерений использовали дистиллированную воду [3]. Дальнейшее совершенствование метода: лиофильное высушивание экстракта, тщательное его измельчение и перемешивание при растворении в азотной кислоте, позволило избежать образования нерастворимых конгломератов и получить более высокий уровень содержания алкалоидов группы аймалина в ткани культуры.

В табл. 1 приведены результаты исследования содержания внутриклеточных алкалоидов группы индолина в различные периоды пассажа. Сравнивая средние величины концентрации алкалоидов группы аймалина для

разных периодов культивирования с использованием критерия Стьюдента и Х-критерия Ван-дер-Вардена [11], мы не нашли достоверного различия ($P = 0,95$) между этими величинами (рис. 2).

Необходимо отметить, что даже различные варианты одной и той же пробы зачастую имели различающиеся на несколько единиц значения светорассеяния. Помимо этого, концентрация индолевых алкалоидов в экстрактах, полученных из навесок различной массы, приготовленных из одного и того же исходного растительного материала, различалась в отдельных случаях в несколько раз (табл. 2). Такое явление заставило нас остановиться на исследовании проблематичных моментов описываемого метода. Во-первых, использование калибровочного графика, построенного по стандартному образцу аймалина, дает возможность более или менее объективно количественно оценивать лишь содержание аймалина и других, структурно близких ему индолевых алкалоидов, дающих пурпурное окрашивание в азотной кислоте. В то же время для оценки общей суммы алкалоидов необходимо знать и/или контролировать в ней долю хромогенных алкалоидов. Во-вторых, необходимо существенно повысить воспроизводимость результатов измерений одного и того же образца (экстракта). И, наконец, в-третьих, оценить влияние степени очистки экстракта на результаты фотоспектрометрических измерений (экстракт в опыте 1 представляет собой суммарное извлечение многих классов веществ из растительной ткани).

Таблица 1
Зависимость концентрации внутриклеточных алкалоидов группы индолина от периода пассажа

Номер опыта	Период пассажа, сут.	C
1.1	5	488
1.2	5	700
1.3	5	875
1.4	5	775
1.5	5	475
1.6	5	788
1.7	5	275
		$C_{\text{ср}} = 625,0 \pm 160,3$
2.1	12	713
2.2	12	675
2.3	12	1150
2.4	12	1100
2.5	12	554
2.6	12	394
		$C_{\text{ср}} = 797,6 \pm 246,9$
3.1	15	1226
3.2	15	677
3.3	15	458
3.4	15	396
3.5	15	544
3.6	15	422
		$C_{\text{ср}} = 618,8 \pm 250,9$

Примечания. C — Среднее значение концентрации алкалоидов группы аймалина (мг/100 г сухого веса); C_{ср} — среднее арифметическое. Для определения достоверного интервала использовали уровень значимости $P = 0,95$. В графе "Номер опыта" первая цифра обозначает номер субстанции, вторая — номер навески.

Была построена кривая зависимости светорассеяния раствора от концентрации суммарного хлороформного экстракта, полученного в опыте 1 (рис. 3).

Используя данные светорассеяния, приведенные в табл. 2, и кривую, представленную на рис. 3, мы рассчитали концентрацию соединений, экстрагируемых в опыте 1, в различные периоды пассажа (табл. 3). Сравнение средних значений этих величин с использованием критерия Стьюдента и Х-критерия Ван-дер-Вардена выявило достоверное ($P = 0,95$) различие между концентрацией в ткани исследуемых веществ на 5-й и 12-й день культивирования и их концентрацией на 15-й день культивирования (рис. 4). Это свидетельствует о более точном соотношении калибровочной кривой, представленной на рис. 3, величинам светорассеяния растворов суммарного экстракта, полученного в опыте 1.

Гравиметрический анализ суммарного экстракта, полученного методом Воллосовича (опыт 1), показал, что содержание в ткани экстрагируемых веществ на 12–14 сутки культивирования составляет 12,01 г на 100 г сухого веса (12,1 %), в то время как вес экстракта, полученного в опыте 2, составляет 4,04 г на 100 г сухого веса (4,04 %), т. е. в три раза меньше. Поэтому использование калибровочной кривой зависимости светорассеяния раствора от концентрации суммарного экстракта, полученного в опыте 2, не позволяет получить объективные

Таблица 2
Содержание алкалоидов группы аймалина в ткани трансгенной корневой культуры *Limnolobos sergentii* для различных периодов пассажа

Содержание алкалоидов группы аймалина в тканях трансгенной корневой культуры <i>Kainwofia serpentina</i> для различных периодов пассажа									
Суб- опыт	Но- мер опыта	С ₁	С ₂	С ₃	С ₄	С ₅	С ₆	С ₇	С ₈
1.1	100	5	25	12,0	600	13,3	75	12	31
1.2	100	5	26	10,8	340	14,1	81	15	16
2.1	100	5	21	16,2	810	14,2	72	15	22
2.2	100	5	23	15,5	775	15,1	79	15	24
3.1	100	5	20	17,1	855	15,2	81	15	27
4.1	100	5	21	16,2	810	15,3	79	15	23
4.2	35	5	52	1,4	190	16,1	65	15	33
5.1	100	5	26	10,8	540	16,2	65	15	31
6.1	100	5	17	20,0	1000	16,3	60	15	29
7.1	80	5	29	7,8	476	16,4	33	15	47
7.2	62	5	29	7,8	390	17,1	55	15	35
8.1	100	12	20	17,1	855	17,3	55	15	32
9.1	100	12	20	17,1	855	18,2	61	15	31
9.2	63	12	34	5,0	397	18,3	51	15	34
10.1	52	12	38	3,5	337	18,4	21	15	67
11.1	100	12	16	21,0	1050	19,1	61	15	37
11.2	100	12	19	18,0	900	19,2	63	15	36
12.1	23	12	61	0,9	196	19,3	61	15	36
12.2	78	12	24	13,3	852	19,4	50	15	43
12.3	78	12	30	7,0	449	20,1	63	15	32
13.1	80	12	29	7,8	488	20,2	65	15	32
13.2	80	12	32	5,8	363	20,3	65	15	30

Примечание. Т — Период пассажа; от. — септотипизация алкалоидов группы аймалина (мг/100 мл HNO₃). С₁ —

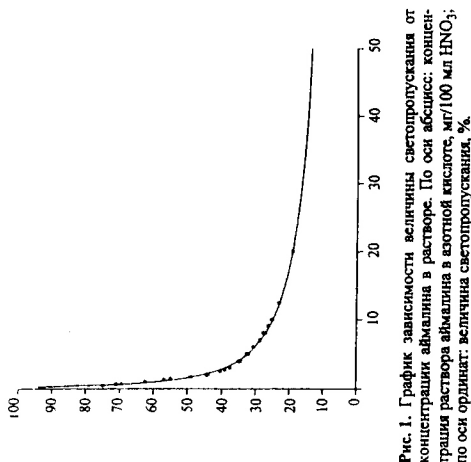


Рис. 1. График зависимости величины светопропускания от концентрации алкалоидов в растворе. По оси абсцисс: концентрация раствора алкалоидов в азотной кислоте, мг/100 мл HNO_3 ; по оси ординат: величина светопропускания, %.

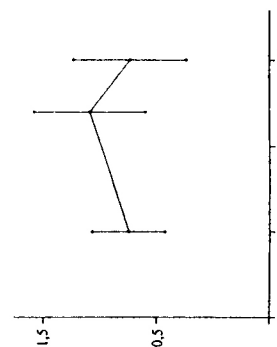


Рис. 2. График зависимости концентрации алкалоидов группы индолина в ткани трансенной корневой культуры *Rauwolfia sergentii* от периода пикажа. По оси абсцисс: период пикажа (сут.); по оси ординат: концентрация алкалоидов группы индолина в ткани культуры, мг/100 г сухого веса. Для расчета использовали график, представленный на рис. 1.

Как видно из табл. 5, на хроматограмме суммарного экстракта, полученного в опыте 1, присутствуют три окрасивших азотной кислотой в коричневый цвет пятна, имеющих малую подвижность в использованных системах растворителей. Аналогичные компоненты отсутствуют на хроматограмме экстракта, полученного в опыте 2.

Таблица 3
Зависимость концентрации внутрисекретных алкалоидов группы индолина от периода пикажа

Номер опыта	Период пикажа, сут	C
1.1	5	10250
1.2	5	11000
1.3	5	11500
1.4	5	12054
1.5	5	10000
1.6	5	11677
1.7	5	9087
		$C_{\text{ср}} = 10776 \pm 794$
2.1	12	10825
2.2	12	11583
2.3	12	12308
2.4	12	13290
2.5	12	12051
2.6	12	10792
		$C_{\text{ср}} = 11808 \pm 764$
3.1	15	15131
3.2	15	12799
3.3	15	14026
3.4	15	13350
3.5	15	14695
3.6	15	11289
		$C_{\text{ср}} = 13417 \pm 976$

Примечания. C — среднее значение концентрации алкалоидов группы индолина (мг/100 г сухой ткани). $C_{\text{ср}}$ — среднее арифметическое. Для определения доверительного интервала использованы уровни вероятности $P = 0.95$. Для расчета использованы калибровочный график зависимости величины светопропускания от концентрации суммарного экстракта, полученного в опыте 1.

данные о содержании индолиных алкалоидов в ткани культуры.

Для качественного сравнения суммарных экстрактов, полученных соответственно в опытах 1 и 2, мы применили метод ТСХ, используя пластины фирмы Merck, и детектировали алкалоиды, как описано в разделе Материалы и методы. Для одномерной ТСХ использовали системы 1, 2, 3 и 4. Для системы 1 было обнаружено, соответственно, 17 и 18 соединений, для системы 2 — 14 и 17, для системы 3 — 13 и 15 и для системы 4 — 13 и 12, соответственно.

Для разделения двумерной ТСХ использовались системы 1 и 2. В результате анализа хроматограмм было обнаружено 23 соединения в суммарном хлороформном экстракте, полученном согласно опыту 1, и 36 соединений в экстракте, полученном в опыте 2. Семнадцать из них обладали сходными характеристиками (табл. 4).

Таким образом, экстракция алкалоидов в опыте 2 позволяет получить более богатый спектр тестируемых соединений, чем экстракция в опыте 1. Тем не менее, в составе суммарного экстракта, полученного методом Воллсвича (опыт 1), зарегистрирован ряд компонентов, отсутствующих в суммарном экстракте, полученном методом Парра (опыт 2), которые могут быть зафиксированы колориметрическим методом после обработки азотной кислотой, что подтверждается данными, приведенными ниже.

Суммарные экстракты, полученные соответственно в опытах 1 и 2, разделяли двумерной ТСХ, как описано выше, в системах 1 и 2. Регистрация проводилась по поглощению флуоресценции при $\lambda = 254$ нм, а также по окрашиванию пятен после обработки хроматограмм водным раствором 85% азотной кислоты.

Анализ результатов позволил зарегистрировать 25 соединений на хроматограмме экстракта, полученного в опыте 1, и 28 соединений на хроматограмме экстракта, полученного согласно опыту 2. Обработка пластины азотной кислотой выявила соответственно, 7 и 6 окрашенных компонентов экстрактов (табл. 5).

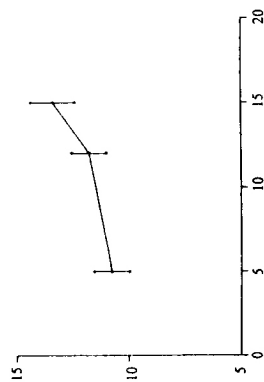


Рис. 4. График зависимости концентрации алкалоидов группы индолина в ткани трансенной корневой культуры *Rauwolfia sergentii* от периода пикажа. По оси абсцисс: период пикажа (сут.); по оси ординат: концентрация алкалоидов группы индолина в ткани культуры, мг/100 г сухого веса. Для расчета использовали график, представленный на рис. 3.

совместно [2]. В приведенных им данных [2], кроме алкалоидов, на хроматограмме экстракта ткани культуры после обработки азотной кислотой было зарегистрировано только одно слабоокрашенное розовое пятно. Остальные алкалоиды давали слабое желтое окрашивание и не оказывали существенного влияния на оптическую плотность раствора.

Таким образом, можно предположить, что окрашивающиеся азотной кислотой в коричневый цвет примеси в суммарном экстракте трансенной корневой культуры

Таблица 4
Результаты разделения суммарных экстрактов ткани трансенной корневой культуры *Rauwolfia sergentii* (окрашивание ЦАС)

Суммарный экстракт, полученный в опыте 1				Суммарный экстракт, полученный в опыте 2			
N	ЦАС	d1/d2	UV1	UV2	R ₁ 1	R ₂ 1	R ₂ 2
6	0	2/2	+	+	0	2/2	—
7	—	3/3	+	+	0	5/3	+
8	—	4/4	+	+	0	5/5	—
9	к	5/5	+	+	к	6/6	+
10	—	4/2	+	+	—	4/1	—
11	—	4/2	+	+	—	4/3	—
12	—	9/7	+	+	с-г	12/11	+
13	—	6/5	+	+	г	6/6	+
19	—	4/4	+	+	с-г	6/5	+
23	р	3/3	—	—	р	3/3	—
20	—	2/4	+	+	—	4/4	—
21	—	2/4	+	+	—	5/5	+
22	—	4/4	+	+	с-г	3/4	—
18	р ³⁾	3/5	+	+	—	4/7	—
16	ж ⁴⁾	4/4	+	+	ж	7/6	—
14	—	4/3	+	+	г	4/4	+
15	—	4/4	+	+	—	4/4	—

Примечания. ЦАС — окрашивание перия (IV) аммоний сульфатом. d1 — горизонтальный диаметр (система 2); d2 — вертикальный диаметр (система 1); UV1 — детекция гашения флуоресценции флуорохрома пластины в ультрафиолете ($\lambda = 254$ нм); UV2 — детекция гашения флуоресценции в ультрафиолете ($\lambda = 366$ нм); R₁1 — значение R₁ в системе 1; R₂2 — значение R₂ в системе 2; г — голубой; р — розовый; ж — желтый; к — желтый; с — серый; с-г — желтый; м — малиновый; о — оранжевый; с — серый.

1) Центр пятна гашения флуоресценции ($\lambda = 254$ нм), его размеры не совпадают с размерами пятна, окрашивающегося ЦАС.
2) Пятно № 8 гашения флуоресценции ($\lambda = 254$ нм), его размеры не совпадают с размерами пятна, окрашивающегося ЦАС.
3) Размеры розового пятна 2/2,5 мм.
4) Размеры пятен, окрашенных ЦАС, в обоих случаях не совпадают с размерами флуоресцирующих пятен.