УДК 615.074
https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-23
© Коллектив авторов, 2018

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ВОССТАНАВЛИВАЮЩИХ САХАРОВ В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ РОДОВ *CLADINA* И *CLADONIA*

С.И. Ямщикова
аспирант, Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр),
Российский университет дружбы народов (Москва);
ассистент, Медицинский институт, Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова (г. Якутск)
E-mail: ssontoeva@gmail.com

А.В. Никулин
к.х.н, доцент, Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр),
Российский университет дружбы народов (Москва)

О.Г. Потанина
д. фарм. н., профессор, директор центра научных исследований и разработок,
Центр коллективного пользования (Научно-образовательный центр), Российский университет дружбы народов (Москва)

Предложена методика определения суммы восстанавливающих сахаров с феноловым реагентом (после кислотного гидролиза) с помощью УФ-спектрофотометрии в водных извлечениях из лекарственного растительного сырья (слоевищах лишайника родов *Cladonia* и *Cladina*). Оценены основные метрологические характеристики предложенной методики.

Ключевые слова: *стандартизация, спектрофотометрия, лишайники родов Cladina и Cladonia, полисахариды, свободные сахара.*

Для цитирования: Ямщикова С.И., Никулин А.В., Потанина О.Г. Определение суммы восстанавливающих сахаров в лекарственном растительном сырье родов *Cladina* и *Cladonia*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(10):125–129. **https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-23**

Одним из перспективных лекарственных растений, широко используемых в традиционной медицине народов Севера России, являются лишайники родов *Cladina* и *Cladonia* [1]. В их составе обнаружены полисахариды, которые можно разделить на две фракции – лихенановую и изолихениновую, являющиеся производными D-маннозы, D-глюкозы, D-галактозы и глюкуроновой кислоты. По литературным данным, полисахаридные фракции лишайников обладают противоопухолевым действием. [2] Тем не менее данный вид субстанций природного происхождения до настоящего времени не является фармакопейным, и, как следствие, удовлетворительная стандартизация сырья отсутствует. Последнее значительно затрудняет получение лекарственных препаратов на основе данного лекарственного растительного сырья.

В литературе имеются сведения об определении полисахаридов в сырье лишайников [3]. Одним из наиболее широко распространенных методов определения полисахаридов в растительном сырье является гравиметрия [4, 5]. Однако данный метод трудоемок, недостаточно специфичен вследствие возможного соосаждения других веществ.

Современным инструментальным методом, включенным в Государственную фармакопею, является УФ-спектрофотометрия. [6] Есть данные об использовании данного метода вместе с антроновым или орциновым реактивами и пикриновой кислотой [7]. Д.Н. Оленников и Л.М. Танхаева разработали методику количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов (свободные углеводы, водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества и гемицеллюлозы) из одной навески, основанную на объединении известной схемы разделения углеводов по Бейли и модифицированного спектрофотометрического метода Дрейвуда [8].

M. Dubois с сотрудниками было показано, что фенол в среде концентрированной серной кислоты способен образовывать с сахарами стабильные соединения, окрашенные в оранжево-красный цвет [9].

Достоинствами этого метода являются относительная простота и дешевизна. Данная реакция была успешно положена в основу методики определения суммы полисахаридов и свободных сахаров в листьях мать-и-мачехи [10].

Цель работы – разработка и валидация методики количественного определения восстанавливающей суммы сахаров в сырье родов *Cladonia* и *Cladina*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили образцы слоевищ лишайника *Cladonia* и *Cladina*, заготовленные в разных районах Республики Саха (Якутия) в период с июля по сентябрь.

В качестве экстрагента для выделения углеводов из растительного материала наиболее часто применяют воду [4, 8]. Гидролиз суммы восстанавливающих сахаров осуществляли с помощью кислоты хлористоводородной концентрированной, которую добавляли непосредственно при экстракции. Для комплексообразования применяли раствор 5%-ного фенола.

Приготовление стандартного раствора (СО) образца глюкозы: 0,1 г (точная навеска) стандартного образца глюкозы (декстрозы) (USP, CAS Number 50-99-7) помещали в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляли 60 мл воды очищенной и перемешивали до полного растворения навески. Объем раствора доводили тем же растворителем.

Далее 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем раствора доводили водой очищенной (раствор Б).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе [10] был отмечен максимум поглощения глюкозы при длине волны 487±2 нм. Кроме того, авторами статьи при исследовании зависимости величины оптической плотности от концентрации глюкозы в анализируемом растворе было установлено, что в диапазоне от 10 до 100 мкг/мл аналитический сигнал прямо пропорционален содержанию аналита. Для фруктозы наблюдался аналогичный рабочий диапазон.

С целью разработки методики в настоящей работе было изучено влияние степени измельчения сырья, соотношения сырье : экстрагент, кратности экстракции на выход сахаров. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. ***Влияние различных факторов на полноту извлечения суммы углеводов из слоевищ лишайника Cladina и Cladonia (n=3, p=0,95)***

Неизменяемый параметр	Варьируемый параметр	Содержание суммы восстанавливающих сахаров, %
Степень измельчения, мм		
Соотношение сырье : экстрагент 1:50	1	11,1±0,78
	2	12,46±0,85
	3	13,66±0,61
	5	13,2±0,6
	7	14,46±0,58
Соотношение массы сырья к объему экстрагента		
Степень измельчения 7 мм	1:25	10,48±0,54
	1:50	16,82±0,5
	1:100	13,7±0,37
	1:125	14,86±0,43
Кратность экстракции		
Соотношение сырье : экстрагент 1:50, степень измельчения 7 мм	1	13,36±0,75
	2	14,71±1,17
	3	14,39±1,01

Из представленных данных видно, что наибольшая полнота извлечения суммы углеводов может быть достигнута двукратной экстракцией подкисленной водой очищенной за 60 мин при степени измельчения сырья 7 мм и соотношении сырье: экстрагент 1:50.

В результате проведенных исследований разработана методика количественного определения суммы моносахаров после гидролиза в слоевищах лишайников *Cladonia* и *Cladina*.

Методика проведения анализа. Около 2,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями 7 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл воды и 7 мл кислоты хлористоводородной концентрированной, помещают на кипящую водяную баню с обратным холодильником. Экстракцию проводят в течение 60 мин. Колбу охлаждают до комнатной температуры. Полученное извлечение фильтруют через пять слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды. Марлю с сырьем снова помещают в ту же коническую колбу и экстракцию повторяют еще раз. Полученное извлечение фильтруют через пять слоев марли в ту же мерную колбу, объем раствора доводят до метки водой очищенной. Полученное извлечение пропускают через фильтровальную бумагу марки «Синяя лента». Холостой опыт проводится аналогично, но без анализируемого образца. Далее 1 мл полученного фильтрата помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, объем раствора доводят водой очищенной (раствор А). Таким же образом разбавляют раствор сравнения.

При проведении количественного определения суммы восстанавливающих сахаров используют три пробирки (1, 2, 3) вместимостью 15 мл. В первую пробирку прибавляют 1 мл раствора А, во вторую – 1 мл раствора Б, в третью – 1 мл разбавленного раствора сравнения. Во все пробирки прибавляют по 1 мл 5%-ного раствора фенола, аккуратно встряхивают, добавляют по 5 мл кислоты серной концентрированной. Пробирки с содержимым охлаждают, перемешивают и оставляют на 30 мин для развития окрашивания. Регистрируют оптическую плотность стандартного и испытуемого растворов при длине волны 487 нм. В качестве раствора сравнения используют содержимое третьей пробирки.

Содержание суммы восстанавливающих сахаров (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{A \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{A_0 \cdot 1 \cdot 25 \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 100 \cdot a} \cdot 5 \cdot 100\% =$$

$$= \frac{A \cdot a_0 \cdot 4 \cdot P}{A_0 \cdot (100 - W) \cdot a} \cdot 5 \cdot 100\%,$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность СО глюкозы; a – масса навески сырья, г; a_0 – масса навески СО глюкозы, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %; P – содержание основного вещества в стандартном образце глюкозы, %

Данные по содержанию восстанавливающей суммы сахаров в образцах слоевищ, собранных в различных районах Республики Саха, представлены в табл. 2.

Из табл. 2 видно, что наибольшее содержание суммы восстанавливающих сахаров наблюдается в образцах, собранных в лесничестве.

Валидация методики проведена в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по параметрам: специфичность, линейность, правильность, повторяемость, прецизионность, стабильность растворов. Метрологические характеристики валидации представлены в табл. 3.

Таблица 2. ***Содержание восстанавливающей суммы сахаров в образцах слоевищ лишайника родов Cladonia и Cladina, собранных в различных районах Якутии (n=3, p=0,95)***

Образец	Содержание суммы восстанавливающих сахаров, %
Томпонский район	15,62±0,78
Таттинский район	14,98±0,88
Олёкминский район	15,56±0,44
с. Владимировка, пригород г. Якутска	15,82±0,74
Территория Якутского лесничества	16,44±0,84

Таблица 3. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в слоевищах Cladonia и Cladina

n	f	p	$t(p,f)$	$X_{ср}$, %	$S2$	S	ΔX	E, %
5	5	0,95	2,78	15,68	0,276	0,525	0,653	4,16

Ошибка количественного определения суммы восстанавливающих сахаров в пересчете на глюкозу в слоевищах лишайника ($n = 6$) не превышает 5,0%.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии систематической ошибки в процессе применения предлагаемой методики.

ВЫВОДЫ

1. Разработана эффективная комбинированная методика определения суммы восстанавливающих сахаров в слоевищах лишайника *Cladonia* и *Cladina* методом УФ/ВИД-спектрофотометрии;
2. Проведена валидация разработанной методики в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15. Относительная ошибка определения суммы восстанавливающих сахаров в слоевищах *Cladonia* и *Cladina* не превышает 5%.
3. Предложенная методика определения суммы восстанавливающих сахаров в слоевищах *Cladonia* и *Cladina* может быть рекомендована для включения в нормативную документацию на данный вид лекарственного растительного сырья.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Подтероб А.П.* Химический состав лишайников и их медицинское применение // Химико-фармацевтический журнал. 2008. Т. 42. № 10. С. 32–38.
2. *Вайнштейн Е.А.* О лишайниковых углеводах // Новости систематики низших растений. 1993. № 29. С. 73–83.
3. *Пинкевич В.А., Кисличенко А.А., Новосел Е.Н. и др.* Исследование полисахаридов пармелии жемчужной слоевищ // Вестник ВГМУ. 2017. № 1. С. 111–116.
4. *Куркин В.А.* Фармакогнозия. Самара: СамГМУ. 2004. 1239 с.
5. *Дьякова Н.А., Самылина И.А., Сливкин А.И. и др.* Рационализированная методика количественного определения водорастворимых полисахаридов и ее валидация // Вестник ВГУ. Сер. Химия. Биология. Фармация. 2015. № 2. С. 106–111.
6. Государственная фармакопея СССР XI. Ч. 2. М.: Медицина. 1990. С. 258–259.
7. *Самылина И.А., Рудакова И.П., Аладышева Ж.И., Ковалева С.В.* Определение сахаров спектрофотометрическими методами // Фармация. 2009. № 4. С. 3–5.
8. *Оленников Д.Н., Танхаева Л.М.* Спектры поглощения углеводов и родственных соединений в серной кислоте // Химия природных соединений. 2006. № 3. С. 218–220.
9. *Дюбуа М., Гиллес К.А., Гамильтон Дж.К. и др.* Колориметрический метод определения сахаров и родственных соединений // Аналитическая химия. 1956. № 28. С. 350–356.
10. *Никулин А.В., Терещенко Г.С., Потанина О.Г.* Определение суммы полисахаридов и свободных сахаров в листьях мать-и мачехи методом УФ-спектрофотометрии // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2016. № 9. С. 4–6.

Поступила 13 августа 2018 г.

THE DETERMINATION OF THE AMOUNT OF REDUCING SUGARS IN MEDICINAL PLANT RAW MATERIALS OF THE GENERA *CLADINA* AND *CLADONIA*

© Authors, 2018

S.I. Yamshchikova
Post-graduate Student, Peoples' Friendship University of Russia (Moscow);
Assistant, Northern-Eastern Federal University (Yakutsk)
E-mail: ssontoeva@gmail.com
A.V. Nikulin
Ph.D. (Chem.), Peoples' Friendship University of Russia (Moscow)
O.G. Potanina
Dr.Sc. (Pharm.), Professor, Director of Centre of Scientific Researchers and Designers,
Peoples' Friendship University of Russia (Moscow)

Lichens of the genus Cladina and Cladonia are a promising medicinal plant raw materials, widely used in traditional medicine of the Russian North peoples. The article is devoted to the standardization of this medicinal plant raw material.

The technic of determination of the reducing carbohydrate's total with the phenolic reagent (after acid hydrolysis) using UV spectrophotometry in aqueous extracts from the thalli of the lichen genus Cladonia and Cladina is proposed in this paper. The basic metrological characteristics are estimated.

The proposed method of determination of the reducing carbohydrate's total in the thalli of Cladonia genus Cladina can be recommended for inclusion in the normative documents for this type of the medicinal plant raw material.

***Key words**: standardization, spectrophotometry, lichens of the genera Cladina and Cladonia, polysaccharides, free sugars.*

For citation: Yamshchikova S.I., Nikulin A.V., Potanina O.G. The determination of the amount of reducing sugars in medicinal plant raw materials of the genera *Cladina* and *Cladonia*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2018;21(10):125–129. **https://doi.org/10.29296/25877313-2018-10-23**

REFERENCES

1. Podterob A.P. Himicheskij sostav lishajnikov i ih medicinskoe primenenie // Himiko-farmacevticheskij zhurnal. 2008. T. 42. № 10. S. 32–38.
2. Vajnshtejn E.A. O lishajnikovyh uglevodah // Novosti sistematiki nizshih rastenij. 1993. № 29. S. 73–83.
3. Pinkevich V.A., Kislichenko A.A., Novosel E.N. i dr. Is-sledovanie polisaharidov parmelii zhemchuzhnoj sloevishch // Vestnik VGMU. 2017. № 1. S. 111–116.
4. Kurkin V.A. Farmakognoziya. Samara: SamGMU. 2004. 1239 s.
5. D'yakova N.A., Samylina I.A., Slivkin A.I. i dr. Racionalizirovannaya metodika kolichestvennogo opredeleniya vodorastvorimyh polisaharidov i ee validaciya // Vest-nik VGU. Ser. Himiya. Biologiya. Farmaciya. 2015. № 2. S. 106–111.
6. Gosudarstvennaya farmakopeya CCCR XI. Ch. 2. M.: Medicina. 1990. S. 258–259.
7. Samylina I.A., Rudakova I.P., Aladysheva Zh.I., Kovaleva S.V. Opredelenie saharov spektrofotometricheskimi metodami // Farmaciya. 2009. № 4. S. 3–5.
8. Olennikov D.N., Tanhaeva L.M. Spektry pogloshcheniya uglevodov i rodstvennyh soedinenij v sernoj kislote // Himiya prirodnyh soedinenij. 2006. № 3. S. 218–220.
9. Dyubua M., Gilles K.A., Gamil'ton Dzh.K. i dr. Kolorimetricheskij metod opredeleniya saharov i rodstvennyh soedinenij // Analiticheskaya himiya. 1956. № 28. S. 350–356.
10. Nikulin A.V., Tereshchenko G.S., Potanina O.G. Opredelenie summy polisaharidov i svobodnyh saharov v list'yah mat'-i machekhi metodom UF-spektrofotometrii // Voprosy biologicheskoj, medicinskoj i farmacevticheskoj himii. 2016. № 9. S. 4–6.

Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Камадол (масляный экстракт) (рег. № 96/432/13) – противовоспалительное средство, получаемое из травы ромашки аптечной (ромашки ободранной) *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (*Matricaria recutita* L., M. *chamomilla* L.) и травы ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L., экстракцией маслом из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Леспефлан (экстракт жидкий очищенный) (рег. №№ 001423/01; 000571; 001865/01) – гипоазотемическое, диуретическое и противовоспалительное средство в комплексном лечении хронической почечной недостаточности различного генеза, получаемое из побегов леспедецы двуцветной (*Lespedeza bicolor* Turcz.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45
Fax: 8(495)712-09-18;
e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru