

## Количественное определение водорастворимых полисахаридов в фармакопейных видах сырья рудбекии шершавой и эхинацеи пурпурной спектрофотометрическим методом

*Сыса М. Г., Лукашов Р. И.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** В статье представлены результаты спектрофотометрического определения содержания водорастворимых полисахаридов в водных извлечениях из фармакопейного сырья рудбекии шершавой и эхинацеи пурпурной после гидролиза фенол-серноокислым методом и методом определения с пикриновой кислотой. Результаты фенол-серноокислого метода значительно отличались от результатов гравиметрического анализа и были невоспроизводимы. Количественное определение при помощи метода с пикриновой кислотой провести не удалось, так как на спектрах поглощения всех испытуемых растворов отсутствовал максимум поглощения образующегося продукта реакции при длине волны 470 нм. При помощи тонкослойной хроматографии подтверждено протекание гидролиза водорастворимых полисахаридов с преимущественным образованием глюкозы.

**Ключевые слова:** водорастворимые полисахариды, фенол-серноокислый метод, пикриновая кислота, рудбекия шершавая, эхинацея пурпурная.

**Введение.** Лекарственные средства и биологически активные добавки к пище, полученные на основе лекарственного растительного сырья (далее — ЛРС) эхинацеи пурпурной, широко представлены на фармацевтическом рынке и применяются в расчете на иммуномодулирующее действие [6, 7]. К основным группам веществ, проявляющих иммуномодулирующий эффект, относят гликопротеины (лектины), фенольные соединения, алкиламины и водорастворимые полисахариды (далее — ВПС) [7].

ВПС являются одними из наиболее сильных иммуномодуляторов [6]. Из надземной части эхинацеи пурпурной выделены следующие ВПС: 4-О-метил-глюкуроноарабиноксилан (35 кДа), кислый арабинорамногалактан (50 кДа) и кислый арабиногалактан (75 кДа) [6, 7].

Полученные индивидуальные ВПС в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [6] увеличивают фагоцитарную активность, хемотаксис, продукцию цитокинов гранулоцитами и макрофагами [7]. Кислый арабиногалактан вызывает дозозависимое высвобождение фактора некроза опухоли- $\alpha$ , интерферона- $\beta_2$  и интерлейкина-6 *in vitro*, его эффект высокоизбирателен в отношении макрофагов [6].

Несмотря на наличие во многих лекарственных растениях ВПС, унифицированного подхода к их количественному определению на данный момент не разработано [1, 4, 7]. Используют гравиметрические, спектрофотометрические, вискозиметрические, нефелометрические и поляриметрические методики. Гравиметрический метод количественного определения ВПС описан в Европейской фармакопее и Государственной фармакопее Республики Беларусь. Вариант спектрофотометрического метода приведен в проекте Государственной фармакопее Российской Федерации [3]. Поэтому представляет научно-практический интерес определение возможности использования того или иного фармакопейного метода для определения ВПС в изучаемом ЛРС.

К растениям с доказанной иммуномодулирующей активностью также относится рудбекия шершавая, цветки которой включены в Государственную фармакопею Республики Беларусь [2].

**Цель работы** — определение возможности использования фенол-сернокислого метода (далее — ФСМ) и метода определения с пикриновой кислотой (далее — МОПК) для оценки содержания ВПС в фармакопейных видах сырья рудбекии шершавой и эхинацеи пурпурной.

**Материалы и методы.** Для оценки данных, полученных с использованием спектрофотометрических методик, проводили количественное определение ВПС в изучаемом сырье гравиметрическим методом после удаления фенольных соединений (далее — ФС) [1].

Так как концентрацию ВПС при проведении ФСМ вычисляли методом одного стандарта в пересчете на глюкозу [7], то определяли ее фактическое наличие в растворе ВПС изучаемых растений после проведения гидролиза при помощи тонкослойной хроматографии (далее — ТСХ) [1].

**Материалы:** рудбекии шершавой цветки, заготовленные в период массового цветения (середина июля) 2018 г. в поселке Улановичи (окрестности г. Витебска). Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом в хорошо вентилируемых помещениях без доступа прямых солнечных лучей. Эхинацеи пурпурной трава — измельченное сырье 50 г в пачке; производитель «Падис'С», Республика Беларусь (серия: 08571017, годен до: 08.20), ТСХ пластинка со слоем *силикагеля Р*.

**Реактивы:** *метанол (80 %, об/об) Р, ацетон (60 %, об/об) Р, вода Р, 96 % спирт Р, кислота серная Р, раствор 9,8 г/л кислоты серной Р, раствор 50 г/л фенола Р, раствор 0,1 г/л глюкозы безводной Р, кислота хлористоводородная концентрированная Р; раствор 10 г/л кислоты пикриновой Р; раствор 200 г/л натрия гидроксида Р, бутанол Р, кислота уксусная ледяная Р, анилин Р, кислота фталевая Р.*

**Удаление фенольных соединений.** Три точные навески (около 1 г) измельченного ЛРС (1400) обоих растений помещали в стеклянные флаконы и приливали *метанол (80 %, об/об) Р* для рудбекии шершавой цветков или *ацетон (60 %, об/об) Р* для эхинацеи пурпурной травы при соотношении сырья и экстрагента 1 к 10. Флаконы плотно закупоривали и помещали на водяную баню при температуре 60 °С на 60 мин.

Полученные извлечения процеживали через кусочек ваты, который отжимали и вместе с остатками сырья изучаемых растений помещали во флакон с ЛРС после удаления ФС, затем оставляли при комнатной температуре до полного высыхания (около 5 дней).

**Экстракция ВПС.** К высохшему ЛРС добавляли *воду Р* (экстрагент для ВПС обоих видов сырья) при соотношении сырья и экстрагента 1 к 10 и помещали на кипящую водяную баню на 60 мин.

Полученные водные извлечения процеживали через кусочек ваты, отбирали по три пробы объемом 2,00 мл для дальнейшего осаждения ВПС трехкратным объемом *96 % спирта Р*. Осадки переносили на предварительно взвешенные бумажные фильтры, которые оставляли при комнатной температуре до их полного высыхания (около 5 дней), после чего взвешивали и рассчитывали массовую долю ВПС в пересчете на сухое сырье.

Из полученных осадков готовили испытуемые растворы для спектров фотометрического количественного определения ВПС путем их растворения в 10,0 мл *воды Р*, подогретой до 80 °С (10,0 мл *воды Р* смывали с фильтра ВПС, объем полученного раствора доводили *водой Р* до 10,0 мл). Фильтры высушивали при комнатной температуре (около 3 дней) и взвешивали для вычисления массы перешедших в раствор ВПС.

Таким же образом готовили испытуемые растворы ВПС для проведения ТСХ.

**Испытуемый раствор для ТСХ.** К 2,00 мл водного раствора ВПС изучаемых растений добавляли 2,00 мл раствора 9,8 г/л *кислоты серной Р*, флаконы плотно закупоривали и выдерживали на кипящей водяной бане 3 ч, после чего охлаждали до комнатной температуры.

*Раствор сравнения:* растров 0,1 г/л глюкозы *P*.

*Пластинка:* ТСХ пластинка со слоем силикагеля *P*.

*Подвижная фаза:* бутанол *P* — кислота уксусная ледяная *P* — вода *P* (3:1:1, об/об/об).

*Наносимый объем пробы:* 20 мкл в форме пятна.

*Фронт подвижной фазы:* 10 см от линии старта.

*Высушивание:* при температуре от 100 °С до 105 °С.

*Проявление:* пластинку обрабатывали раствором анилин-фталатного реактива (930 мг анилина *P* и 1660 мг кислоты фталевой *P* растворяли в 100 мл бутанола *P*) и высушивали при температуре от 100 °С до 105 °С. Просматривали в ультрафиолетовом свете.

*Испытуемый раствор для ФСМ.* К 0,50 мл водного раствора ВПС изучаемого ЛРС добавляли 1,25 мл кислоты серной *P* и 0,25 мл раствора 50 г/л фенола *P*. Флаконы плотно закупоривали и помещали на водяную баню при 85 °С на 60 мин.

В качестве стандарта использовали раствор 0,1 г/л глюкозы безводной *P*.

Под действием кислоты серной *P* происходит гидролиз полисахаридов до глюкозы, которая дегидратируется с образованием оксиметил фурфурола. Оксиметил фурфурол взаимодействует с фенолом *P* с образованием ауринового красителя (реакция конденсации), имеющего в видимой области спектра максимум поглощения при длине волны 490 нм [5].

Концентрацию ВПС определяли методом одного стандарта в пересчете на глюкозу.

*Испытуемый раствор для МОПК.* К 1,00 мл водного раствора ВПС добавляли 0,5 мл кислоты хлористоводородной концентрированной *P*, флаконы плотно закупоривали и помещали на 30 мин на кипящую водяную баню, после чего к раствору добавляли 1,50 мл раствора 10 г/л кислоты пикриновой *P* и 3,50 мл раствора 200 г/л натрия карбоната *P* и помещали еще на 10 мин на кипящую водяную баню [3].

В качестве стандарта использовали раствор 0,1 г/л глюкозы безводной *P*.

Метод основан на цветной реакции моносахаров (образуются после гидролиза полисахаридов под действием кислоты хлористоводородной концентрированной *P*) с кислотой пикриновой *P*, протекающей с образованием кислоты пикраминовой в результате восстановления сахаром группы NO<sub>2</sub> до NH<sub>2</sub>. Продукт реакции имеет в видимой области спектра максимум поглощения при длине волны 470 нм [3].

Спектры поглощения снимали в интервале длин волн от 200 до 800 нм на спектрофотометре Solar PV 2201. Все определения выполняли три раза ( $n = 3, p = 95 \%$ ).

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили при помощи пакета «Анализ данных» компьютерной программы Microsoft Office Excel 2016. Результаты представляли в виде среднего значения. Статистически значимыми считали отличия при уровне значимости менее 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** Результаты хроматографического определения методом ТСХ моносахаридов, полученных после гидролиза ВПС, представлены на рисунке 1.

Верх хроматографической пластинки		
	Флуоресцирующая зона голубоко цвета	Флуоресцирующая зона голубоко цвета
	Слабо флуоресцирующая зона голубоко цвета	Слабо флуоресцирующая зона голубоко цвета
Интенсивно флуоресцирующая зона голубоко цвета (глюкоза)	Интенсивно флуоресцирующая зона голубоко цвета (глюкоза)	Интенсивно флуоресцирующая зона голубоко цвета (глюкоза)
1	2	3

**Рисунок 1 — Последовательность расположения хроматографических зон на ТСХ пластинке испытуемых растворов и раствора сравнения:**

**1 — раствор 0,1 г/л глюкозы безводной *P*; 2 — раствор ВПС рудбекии шершавой цветков после гидролиза; 3 — раствор ВПС эхинацеи пурпурной травы после гидролиза**

Из рисунка 1 видно, что для растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и эхинацеи пурпурной травы после гидролиза характерно наличие на хроматограмме зоны с интенсивной голубой флуоресценцией.  $R_f$  глюкозы безводной *P* равно 0,2, что совпадало с  $R_f$  продукта гидролиза ВПС ЛРС рудбекии шершавой (0,2) и  $R_f$  продукта гидролиза ВПС ЛРС эхинацеи пурпурной (0,19).

Учитывая сходные значения  $R_f$  и одинаковый характер флуоресценции, можно предположить, что после гидролиза ВПС изучаемых растений в растворе обнаруживалась в глюкоза, которая являлась преобладающим моносахаридом. Также могли обнаруживаться другие флуоресцирующие зоны.

Результаты определения содержания ВПС в изучаемом сырье при помощи  $\Phi CM$  в сравнении с гравиметрическим методом для различных проб приведены в таблице 1.

Таблица 1 — Результаты определения концентрации ВПС в водном растворе  $\Phi CM$  в сравнении с гравиметрическим методом

Анализируемая проба	Массовая доля ВПС в пересчете на сухое сырье (гравиметрия), %	Массовая доля ВПС в пересчете на сухое сырье ( $\Phi CM$ ), %	$p^*$
Рудбекия 1-3	17,8	7,97	$3,63 \cdot 10^{-12}$
Рудбекия 3-1	17,6	3,59	0
Эхинацея 1-1	2,89	1,33	0,269
Эхинацея 2-1	3,34	0,93	0,088

\* значение  $p$  (уровня значимости) рассчитывали по  $z$ -критерию Фишера для средних.

Как видно из таблицы 1, результаты определения содержания ВПС в рудбекии шершавой цветках и эхинацеи пурпурной траве при помощи  $\Phi CM$  статистически значимо отличались от результатов гравиметрического анализа ( $p < 0,05$ ). Результаты, которые статистически значимо не различались ( $p > 0,05$ ), оказались не воспроизводимы, так как величина  $RSD$  равна 52,3 % и 79,8 %.

Поскольку результаты гравиметрического анализа и  $\Phi CM$  значительно отличались и результаты  $\Phi CM$  не были воспроизводимы для всех четырех проб, проводили определение ВПС с помощью  $\Phi CM$  для серии разведений одной и той же пробы. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2— Результаты определения концентрации ВПС в водном растворе  $\Phi CM$  для серии разведений одной пробы

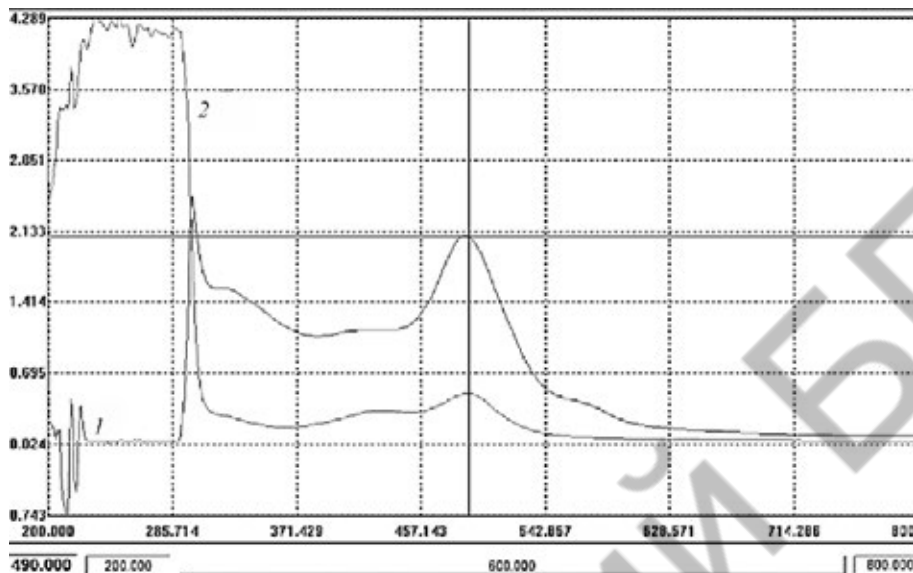
Анализируемая проба	Массовая доля ВПС в пересчете на сухое сырье (гравиметрия), %	Массовая доля ВПС в пересчете на сухое сырье ( $\Phi CM$ ), %	$p^*$
Рудбекия 1-1	17,8	5,33	$1,1 \cdot 10^{-3}$
Рудбекия 1-2		4,82	
Рудбекия 1-3		6,22	
Рудбекия 2-1	17,7	1,46	$6,2 \cdot 10^{-2}$
Рудбекия 2-2		8,77	
Рудбекия 2-3		10,7	
Рудбекия 3-1	17,6	9,27	$2,7 \cdot 10^{-3}$
Рудбекия 3-2		3,36	
Рудбекия 3-3		7,91	
Эхинацея 1-1	2,89	1,83	0,15
Эхинацея 1-2		2,21	
Эхинацея 1-3		0,093	
Эхинацея 2-1	3,34	4,08	0,17
Эхинацея 2-2		4,66	
Эхинацея 3-1	2,75	5,76	0,11
Эхинацея 3-2		7,01	

\* значение  $p$  (уровня значимости) рассчитывали по  $t$ -критерию Стьюдента.

Как видно из таблицы 2, результаты определения содержания ВПС в изучаемом ЛРС при помощи  $\Phi CM$  статистически значимо отличались от результатов гравиметрического анализа ( $p < 0,05$ ) при изучении разведений одной и той же пробы. Результаты, которые статистически значимо не различались ( $p > 0,05$ ), оказались не воспроизводимы, так как величина  $RSD$  для результатов  $\Phi CM$  варьировала от 9,4 до 81,9 %.

Для подтверждения протекания реакции образования ауринового красителя записали спектры поглощения реакционных смесей.

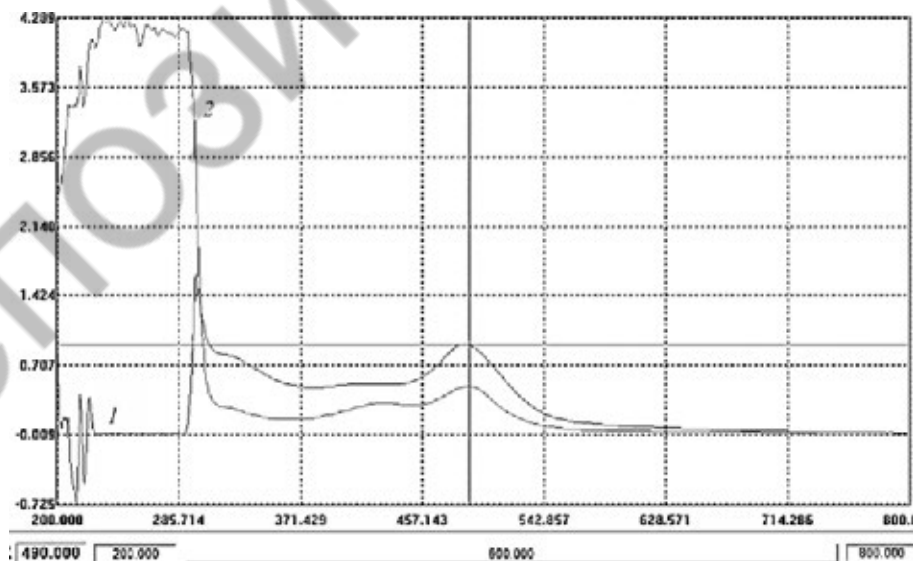
На рисунке 2 представлены спектры поглощения продуктов реакции ФСМ для водных растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и стандарта.



**Рисунок 2 — Спектры поглощения продуктов реакции ФСМ для водных растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и глюкозы:**  
 1 — испытуемый раствор ВПС рудбекии шершавой цветков;  
 2 — испытуемый раствор 0,1 г/л глюкозы безводной P

Как видно из рисунка 2, продукты реакции растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и глюкозы имели максимум поглощения при длине волны 490 нм, что соответствовало литературным данным [5] и являлось свидетельством протекания реакции образования ауринового красителя.

На рисунке 3 представлены спектры поглощения продуктов реакции ФСМ для водных растворов ВПС эхинацеи пурпурной травы и стандарта.

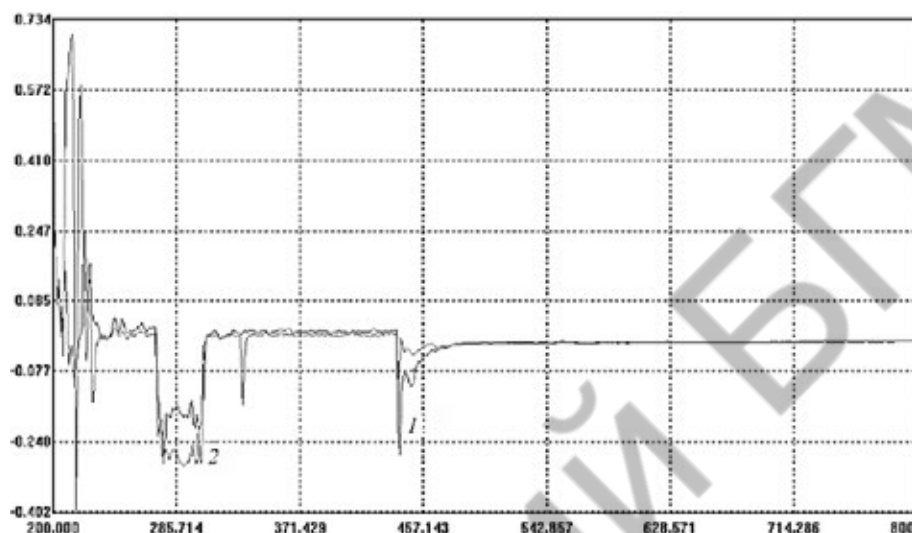


**Рисунок 3 — Спектры поглощения продуктов реакции ФСМ для водных растворов ВПС эхинацеи пурпурной травы и глюкозы:**  
 1 — испытуемый раствор ВПС эхинацеи пурпурной травы;  
 2 — испытуемый раствор 0,1 г/л глюкозы безводной P

Как видно из рисунка 3, продукты реакции ВПС эхинацеи пурпурной травы и глюкозы имели максимум поглощения при длине волны 490 нм, что подтверждало протекание соответствующей реакции.

У всех проанализированных проб растворов ВПС изучаемого ЛРС наблюдали максимум поглощения при длине волны 490 нм.

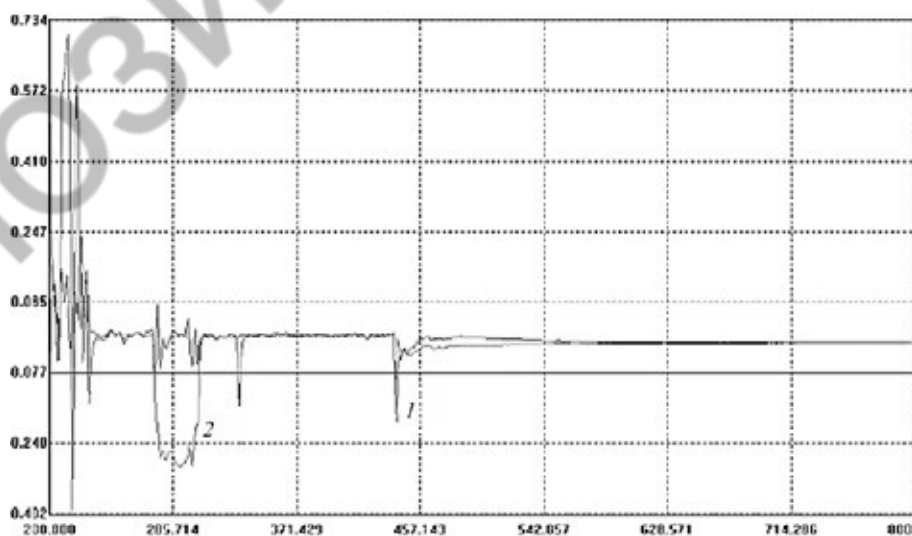
На рисунке 4 представлены спектры поглощения продукта МОПК для водных растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и стандарта.



**Рисунок 3 — Спектры поглощения продуктов реакции МОПК для водных растворов ВПС рудбекии шершавой цветков и глюкозы:**  
**1 — испытуемый раствор ВПС рудбекии шершавой цветков;**  
**2 — испытуемый раствор 0,1 г/л глюкозы безводной P**

Как видно из рисунка 4, спектр поглощения реакционной смеси с раствором 0,1 г/л глюкозы безводной P практически не отличался от спектра поглощения реакционной смеси с ВПС рудбекии шершавой цветков. Необходимо отметить, что аналитически значимые максимумы поглощения при длине волны 470 нм не обнаружены.

На рисунке 5 представлены спектры поглощения продукта МОПК для водных растворов ВПС эхинацеи пурпурной травы и стандарта.



**Рисунок 4 — Спектры поглощения продуктов реакции МОПК для водных растворов ВПС эхинацеи пурпурной травы и глюкозы:**  
**1 — испытуемый раствор ВПС эхинацеи пурпурной травы;**  
**2 — испытуемый раствор 0,1 г/л глюкозы безводной P**

Из рисунка 5 видно, что аналитически значимые максимумы поглощения при длине волны 470 нм отсутствовали в спектрах поглощения реакционных смесей с растворами 0,1 г/л глюкозы безводной Р и ВПС эхинацеи пурпурной травы.

Исходя из данных рисунков 3 и 4, реакция сахаров с пикриновой кислотой не протекала в описанных условиях, и провести количественное определение ВПС в анализируемом ЛРС МОПК не представлялось возможным.

**Заключение.** Проведение ТСХ подтверждало наличие глюкозы (доминирующий моносахарид) в растворе ВПС изучаемых растений после выполнения гидролиза.

Использование ФСМ для количественного определения ВПС рудбекии шершавой цветков и эхинацеи пурпурной травы не дало воспроизводимых результатов. Однако в спектрах поглощения продуктов реакции для обоих видов ЛРС присутствовал характерный максимум поглощения при длине волны 490 нм, что указывало на образование ауринового красителя.

В спектрах поглощения всех образцов, проанализированных с использованием МОПК, отсутствовали максимумы поглощения при длине волны 470 нм, характерные для продуктов реакции сахаров с пикриновой кислотой. Поэтому провести надежное количественное определение ВПС изучаемого ЛРС при помощи этого метода не представлялось возможным.

Таким образом, при помощи использованных спектрофотометрических методик невозможно достоверно количественно определить содержание ВПС рудбекии шершавой цветков и эхинацеи пурпурной травы.

### Литература

1. Бубенчиков, Р. А. Фенольные соединения и полисахариды фиалки собачей / Р. А. Бубенчиков // Вестник ВГУ. — 2004. — № 1. — С. 156–59.
2. Лукашов, Р. И. Фенольные соединения рудбекии шершавой цветков и их иммунотропная активность / Р. И. Лукашов, Д. В. Моисеев // Вестник фармации. — 2015. — № 4. — С. 118–124.
3. Тринеева, О. В. Определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной / О. В. Тринеева, А. И. Сливкин // Вестник ВГУ. — 2007. — № 1. — С. 164–169.
4. Bergeron, C. Quantitative Analysis of the Polysaccharide and Glycoprotein Fractions in *Echinacea purpurea* and *Echinacea angustifolia* by HPLC-ELSD for Quality Control of Raw Material / C. Bergeron, S. Gafner // *Pharmaceutical Biology*. — 2007. — Vol. 45. — P. 98–105.
5. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances / M. Dubois [et al.] // *Analyt. Chem.* — 1956. — Vol. 28. — P. 350–356.
6. Miller, S. C. The genus *Echinacea* / S. C. Miller. — Helsinki : SRS Press, 2004. — 270 p.
7. Optimization and use of a spectrophotometric method for determining polysaccharides in *Echinacea purpurea* / N. K. Glavach [et al.] // *Central European Journal of Biology*. — 2012. — Vol. 7. — P. 126–131.

## Quantitative determination of the water-soluble polysaccharides in the belorussian pharmacopeia plant raw material of *Rudbeckia hirta* and *Echinacea purpurea* by the spectrophotometric method

*Sysa M. G., Lukashou R. I.*

*Educational Establishment “The Belarussian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus*

The article presents the results of spectrophotometric determination of the water-soluble polysaccharides in aqueous extracts from the Belorussian pharmacopeia plant raw material of *Rudbeckia hirta* and *Echinacea purpurea* after hydrolysis with use phenol-sulfuric method and picric acid determination method. The results of the phenol-sulfuric method were significantly different from the results of gravimetric analysis and were irreproducible. Quantification by the picric acid determination method failed, since the absorption spectrum of all test solutions did not have a maximum absorption of the reaction product at a wavelength of 470 nm. By thin-layer chromatography, the hydrolysis of water-soluble polysaccharides with the predominant formation of glucose was confirmed.

**Keywords:** water-soluble polysaccharides, phenol-sulfuric method, picric acid, *Rudbeckia hirta*, *Echinacea purpurea*.

Поступила 07.10.2019