

У.А. Ахатаева<sup>1</sup>, Р.А. Омарова<sup>1</sup>, Г.М. Саякова<sup>1</sup>, К.М. Умирханов<sup>2</sup>, А.К. Жусупова<sup>2</sup>, Ж.Е. Абылкаирова<sup>2</sup>

Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова

<sup>1</sup>Кафедра химико-фармацевтических дисциплин

<sup>2</sup>Кафедра технологии лекарств и инженерных дисциплин

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЕВИЩЕ ИСЛАНДСКОГО МХА (*CESTRARIAISLANDICA* (L.) ACH.)

*В рамках научно-исследовательских работ по теме магистерской диссертации «Фармацевтическая разработка фитосубстанции на основе лекарственного растительного сырья исландского мха (*Cetrariaislandica* (L.) Ach.)» был использован спектрофотометрический метод определения биологически активных веществ (БАВ) в слоевище исландского мха (*C. islandica*). Данный спектрофотометрический метод предлагается для количественного определения полисахаридов и фенольных соединений (усниновая кислота) в слоевище *C. islandica*.*

*Слоевища *C. islandica* собраны и заготовлены, согласно требованиям Надлежащей практики культивирования и сбора лекарственных растений (GACP), проведена стандартизация в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Республики Казахстан.*

**Ключевые слова:** спектрофотометрия, полисахариды, усниновая кислота, слоевища *Cetrariaislandica* (L.) Ach., фенольный метод, силикагель

**Актуальность.** В составе *C. islandica* обнаружено больше 10 полезных микроэлементов: активный компонент лишайнин, изолихенин, сахара, воск, камедь, марганец, железо, йод, медь, титан, пигменты, лишайниковые кислоты (усниновая, лихестериновая, протолихестериновая, фумарпротоцетраровая и другие). Наличие кислот придают растению горечи, а также обуславливают его антисептические и тонизирующие свойства. Богатый состав микроэлементов, наличие полисахаридов способствуют укреплению защитных сил организма человека [1].

Слизистое вещество устраняет раздражение, обволакивает воспаленные слизистые желудка, ротовой полости, гортани, кишечника.

Натриевая соль усниновой кислоты, которая обладает антибактериальным свойством, успешно используется в составе препаратов цетрарии. Лихестериновая, а также протолихестериновая кислоты особо активны в отношении стрептококков, стафилококков и прочих устойчивых микробов. Уснинат натрия употребляется наружно при терапии трофических язв, инфицированных ран, ожогов.

Благодаря уникальному составу, исландский мох считается природным антибиотиком, сила которого нередко преобладает над обычными антибиотиками. На болезнетворные бактерии, вирусы и грибки эффективно воздействуют кислоты лишайника, в частности усниновая [2].

**Целью исследования** является количественного определения полисахаридов и фенольных соединений (усниновая кислота) спектрофотометрическим методом.

### **Материалы и методы исследования.**

Слоевища исландского мха собраны в мае-июне 2018 г. в х.Заилийского Алатау, ущелье Тургень-Талгарского района, Алматинской области.

Нами проведен спектрофотометрический метод анализа БАВ в слоевище *C. islandica* с помощью спектрофотометра SPEKOL 1300, также в работе были использованы центрифуга ОПн-8УХЛ4.2, водяная баня, весы технические ОНАУС, обратный холодильник, вытяжной шкаф LAMSYSTEMS, термометр ртутный ТТЖ-М, сушильный шкаф ШС-80.

### **Результаты и обсуждения.**

Для выделения отдельных групп углеводов из образцов слоевища *C. islandica* использовали стандартную методику, схема которой приведена на рисунке 2 [10]. Полученные фракции полисахаридов подвергали очистке и гидролизу для исследования их мономерного компонентного состава [6, 7, 8, 9]. Количественное определение суммы свободных моносахаридов и водорастворимых полисахаридов, проводили по известным методикам [6, 10].

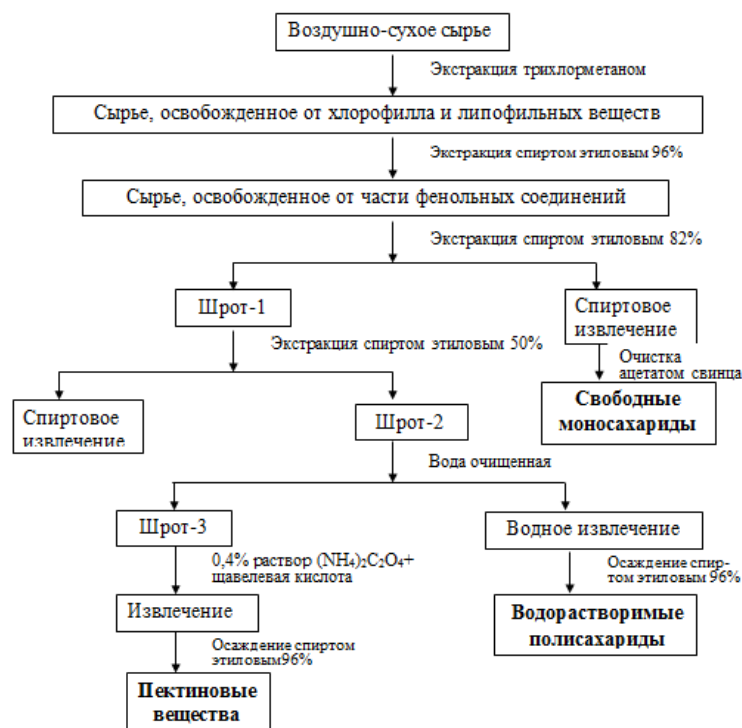


Рисунок 1 – Схема выделения углеводов из слоевища *C. islandica*

Минусы этого метода в том, что оно требует большее количество времени, и поэтому мы предлагаем более короткий путь количественного определения суммы полисахаридов в сырье.

Для построения калибровочного графика взяли 0,1400 г (точная навеска) глюкозы высушенной до постоянной массы при 100-105 °С, которую растворяют в воде очищенной в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят объем водой очищенной до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). 1 мл раствора Б содержит 0,000056 г глюкозы.

В 5 пробирок вносят раствор Б и воду очищенную в количествах, указанных ниже

Таблица 1

Объем раствора Б, мл	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Объем воды очищенной, мл	0,8	0,6	0,4	0,2	-
Содержание глюкозы, мкг	11,2	22,4	33,6	44,8	56

Далее осторожно прибавляют в каждую пробирку к 1 мл полученного раствора 0,25 мл 5% раствора фенола и 2,5 мл кислоты серной концентрированной. Затем пробирки помещают в водяную баню с температурой 10-15°С на 5 минут, при этом смесь осторожно встряхивают. Пробирки ставят на кипящую водяную баню на 16 минут, охлаждают на водяной бане при температуре 10-15 °С и определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре. Измерение оптической плотности растворов проводят при длине волны 490 нм относительно извлечения в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь: 0,25 мл воды очищенной и 0,25 мл 5 % раствора фенола и 2,5 мл кислоты серной концентрированной, выдержанную в тех же условиях, что и опытная смесь.

Расчет содержания полисахаридов (в %) проводят на абсолютно-сухое сырье в пересчете на глюкозу с использованием калибровочного графика, в координатах зависимости оптической плотности полученного раствора от содержания глюкозы (мкг/мл), по формуле:

$$X(\%) = \frac{C_0 \times 12500 \times 100}{M \times (100 - \omega)},$$

где  $C_0$  – концентрация глюкозы по калибровочному графику;  $M$  – масса навески сырья, г;  $\omega$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определения выполняют для каждого образца в трехкратной повторности.

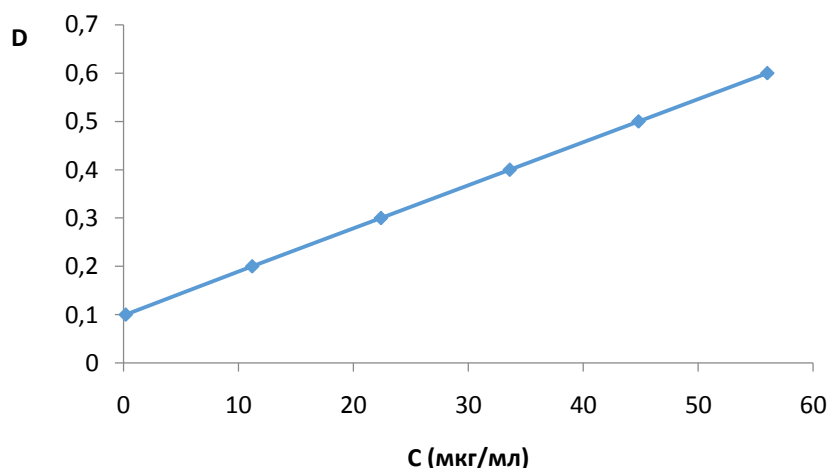


Рисунок 2 - Калибровочный график

По оси абсцисс - концентрация глюкозы, мкг/мл; по оси ординат - оптическая плотность.

**Методика определения суммы полисахаридов.** Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм.

Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл со шлифом, прибавляют 50 мл воды очищенной. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр в плоскодонную колбу вместимостью 50 мл доводят объем раствора водой очищенной до метки.

10 мл полученного извлечения с помощью пипетки переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки (раствор А).

1 мл раствора А переносят в центрифужную пробирку, добавляют 2 мл 95%-ного этанола, перемешивают и нагревают на водяной бане в течение 5 минут. Через 1 ч содержимое пробирки центрифугируют в течение 10 минут в центрифуге со скоростью вращения 3000 об/мин. Осадок промывают 5 мл раствора спирта этилового 50 %-ного и количественно переносят 10 мл воды очищенной при нагревании на водяной бане в мерную колбу вместимостью 100 мл доводят объем водой очищенной до метки (раствор Б). К 1 мл раствора Б 0,25 мл 5 % раствора фенола и 2,5 мл кислоты серной концентрированной. Затем пробирку помещают в водяную баню с температурой 10-15°C на 5 минут, при этом смесь осторожно встряхивают. Пробирку ставят на кипящую водяную баню на 16 минут, охлаждают на водяной бане при температуре 10-15 °C и определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре. Измерение оптической плотности растворов проводят при длине волны 490 нм относительно извлечения в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют смесь: 0,25 мл воды очищенной и 0,25 мл 5 % раствора фенола и 2,5 мл кислоты серной концентрированной, выдержанную в тех же условиях, что и опытная смесь.

Расчет содержания полисахаридов (в %) проводят на абсолютно-сухое сырье в пересчете на глюкозу с использованием калибровочного графика, в координатах зависимости оптической плотности полученного раствора от содержания глюкозы (мкг/мл), по формуле:

$$X (\%) = \frac{C_0 \times 125000 \times 100}{M \times 1 \times 10 \times 10^6 \times (100 - \omega)} \times 100\%,$$

где  $C_0$  – концентрация глюкозы по калибровочному графику; М-масса навески сырья ,г;  $\omega$ -потеря в массе при высушивании сырья, %.

Результаты определения полисахаридов по описанной выше методике представлены в таблице.

Согласно полученным данным, содержание полисахаридов в слоевище цетрариииисландской должно составлять не менее 49,21%.

**Количественное определение усниновой кислоты в слоевище исландского мха.**

Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в круглодонную колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 96% (хлороформ, ацетон, этилацетат) и экстрагируют на кипящей водяной бане в течение 2 часов. Охлаждают, фильтруют в коническую колбу, прибавляют 30 мл 10% раствора кальция карбоната и 10% раствор кислоты хлороводородной до прекращения образования мути. Водный слой отделяют в делительный воронке, прибавляют 10% раствор кислоты хлороводородной до образования осадка. Осадок отфильтровывают, промывают на фильтре водой очищенной, высушивают.

Сухой осадок растворяют в ацетоне, хлороформе и этилацетате: раствор пропускают через слой (2-3 см) силикагеля Л 51/40 М. колонку промывают тем же растворителем. Элюат концентрируют, остаток высушивают до постоянной массы.

Сухой остаток растворяют в любом указанном растворителе в мерной колбе вместимостью 50 мл, доводят объем раствора до метки и измеряют оптическую плотность полученного раствора при длине волны 290 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание лишайниковых кислот в абсолютно сухом сырье в процентах (X), в пересчете на кислоту усниновую, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{D * 50 * 100 * 100}{P * m(100 - W)}$$

где, D- оптическая плотность испытуемого раствора при длине волны 290 нм;

m- масса навески сырья( препарата), в граммах;

W- потери в массе при высушивании сырья, в процентах;

P=85,7- удельный показатель поглощения раствора кислоты усниновой при длине волны 290 нм.

\* Возможно определение кислот лишайниковых весовым методом [5].

D=0,3.

X =1,87% усниновой кислоты в перерасчете на абсолютно сухое сырье.

**Выводы.** Для количественного определения БАВ (полисахаридов и фенольных кислот) используют разные методы, которые могут быть не достаточно точными и воспроизводимыми. Предлагаемый метод является более доступным и менее затратным в отношении времени. Полученные результаты позволят внести соответствующее дополнение в аналитический нормативный документ на сырье.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Криштанова Н.А. Разработка стандартного образца полисахаридного состава для оценки качества липы сердцевидной листьев, цетрарии исландской слоевищ и лекарственных средств на их основе: дисс. ... канд.фарм.наук – СПб., 2007. – 220 с.
- 2 А.Л. Тахтаджян Жизнь растений. - М.: Просвещение, 1981. – 267 с.
- 3 Лекарственные растения и их применение. - М., Наука и техника, 1974. – 197 с.
- 4 İlhamiGülçin,MünirOktay,Ö.İrfanKüfrevioğlu,AliAslanDetermination of antioxidant activity of lichen Cetrariaislandica(L) Ach // Journal of Ethnopharmacology. – 2002. - №79. – P. 325–329.
- 5 ВФС РК 42-332-2000 «Слоевища пармелииVegans»
- 6 Березина В. С. и др. Содержание и состав суммарных водорастворимых полисахаридных комплексов в надземной части LamiumalbumL. и GaleobdolonluteumHuds // Раст. ресурсы. – 2003. – Т. 39, Вып. 1. – С. 69 – 76.
- 7 Дудкин М. С., Денисюк Н. А.Углеводы Symphytumasperum // Химия природ.соедин. - 1984. – №1. – С. 15–20.
- 8 Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов // Химия растительного сырья. – 2006. – №4. – С. 29 – 33.
- 9 Остроженкова Е.Г. и др. Выделение и анализ полисахаридной фракции из биомасс штаммов Panaxginseng С.А.Меу и P. quinquefoliusL. с герматраном «LX-5» // Раст. ресурсы. – 2002. – Т.38, Вып. 2. – С. 120-125.
- 10 Тулайкин А.И., Березина В.С., Гончаров М.Ю. Углеводы из надземной части: выделение и анализ // Раст. ресурсы. – 2004. – Т. 40, Вып. 4. – С. 73–79.

**У.А. Ахатаева<sup>1</sup>, Р.А. Омарова<sup>1</sup>, Г.М. Саякова<sup>1</sup>, К.М. Умирханов<sup>2</sup>,  
А.К. Жусупова<sup>2</sup>, Ж.Е. Абылкаирова<sup>2</sup>**

*С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті*

*<sup>1</sup>Химия-фармацевтикалық пәндер кафедрасы*

*<sup>2</sup>Дәрілер технологиясы және инженерлік пәндер кафедрасы*

#### **ИСЛАНДЫҚ МҮК (CETRARIAISLANDICA (L.)ACH.) ТАЛЛОМЫНДА БИОЛОГИЯЛЫҚ АКТИВТІ ЗАТТАРДЫ СПЕКТРОФОТОМЕТЛІК ӘДІСПЕН АНЫҚТАУ**

**Түйін:** Исландық мүк талломында биологиялық активті заттарды спектрофотометрлік әдіспен анықтау «Исландық мүк (Cetrariaislandica (L.)Ach.) дәрілік өсімдің шикізатының негізіндегі фитосубстанцияның фармацевтикалық негіздемесі» атты магистрлік диссертация тақырыбының шеңберінде жүргізілген ғылыми-зерттеу жұмысы болып табылады. Көрсетілген әдіс C. islandica.Талломында полисахаридтер

мен фенолды қосылыстардың (уснин қышқылы) сандық анықтау әдісі ретінде - спектрофотометрлік әдіс ұсынылды.

*C. islandica* талломы Дәрілік өсімдіктерді мәденилендіру және жинаудың тиісті практикасының (GACP) талаптарына сай жиналып дайындалды, Қазақстан Республикасының Фармакопеясының талаптарына сай стандарттау жүргізілді.

**Түйінді сөздер:** спектрофотометрия, полисахаридтер, уснин қышқылы, *Cetraria islandica* (L.) Ach. талломы, фенолді әдіс, силикагель.

**U.A. Akhataeva<sup>1</sup>, R.A. Omarova<sup>1</sup>, G.M. Sayakova<sup>1</sup>, K.M. Umyrkhanova<sup>2</sup>,  
J.E. Abylkairova<sup>2</sup>, A.K. Jusupova<sup>2</sup>**

*Asfendiyarov Kazakh National medical university*

*<sup>1</sup>Chair of Chemical and Pharmaceutical Disciplines*

*<sup>2</sup>Chair of medicine technology and engineering disciplines*

#### **SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF BIOLOGICAL ACTIVE SUBSTANCES IN THE LAYER OF ICELAND MOSS (CETRARIA ISLANDICA (L.) ACH.)**

**Resume:** As part of the research work on the master's thesis "Pharmaceutical development of a phytosubstantion based on medicinal plant materials of Icelandic moss (*Cetraria islandica* (L.) Ach.), A spectrophotometric method is used to determine biological active substances (BAS) in the layer of Icelandic moss (*C. islandica*). This spectrophotometric method is proposed for the quantitative determination of polysaccharides and phenolic compounds (usnic acid) in the thallus of *C. islandica*.

Thallions of *C. islandica* were collected and harvested according to the requirements of Good Practice for Cultivation and Collection of Medicinal Plants (GACP), standardization was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan.

**Keywords:** spectrophotometry, polysaccharides, usnic acid, thalli *Cetraria islandica* (L.) Ach., Phenolic method, silica gel.