

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ПОЛИСАХАРИДОВ И ПРОСТЫХ САХАРОВ В ЛИСТЬЯХ КРАПИВЫ ДВУДОМНОЙ

О. В. Тринеева, А. И. Сливкин

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 28.08.2016 г

Аннотация. Разработана методика определения суммы свободных и связанных сахаров пикриновым методом в листьях крапивы двудомной. Проведено сравнительное определение суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной фармакопейными методами (антроновым и орциновым). Установлено содержание свободных и связанных сахаров в сырье и настое.

Ключевые слова: листья крапивы двудомной, полисахариды, простые сахара, пикриновый метод, орциновый метод, антроновый метод.

Abstract. A method for determining the amount of free and bound sugars picric method in the leaves of nettle. A comparative determination of the amount of polysaccharide and simple sugars in the leaves of nettle pharmacopoeial methods (anthrone and orsine methods). It established the content of free and bound sugars in the raw material and the infusion.

Keywords: nettle leaves, polysaccharides, simple sugars, picric method, orsine method, anthrone method.

Принципы сквозной стандартизации, основанные на установлении содержания одной и той же группы биологически активных веществ (БАВ) в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и фитопрепаратах с использованием одного и того же метода, активно внедряются с 90-х годов XX века в Российской Федерации в работах ведущих фармакогностов (Самылина И.А., Сорокина А.А., Куркин В.А. и др.).

Согласно данным литературы [1,2], в листьях крапивы содержатся полисахариды и слизи, как составная часть гидрофильной фракции. Данная группа БАВ принимает участие в проявлении физиологической активности настоя. Традиционный гравиметрический метод определения полисахаридов в ЛРС не может дать истинной картины их содержания из-за присутствия примесей. Доброкачественность сырья взаимосвязана с массой углеводной составляющей полисахаридов, химический состав которых весьма разнообразен, а свойства отдельных компонентов различны [1]. Поэтому целесообразным является определение восстанавливающих сахаров, наиболее полно из-

влекающихся в водную фазу при приготовлении настоя.

Метод определения сахаров с пикриновой кислотой описан в нормативной документации на ЛРС «Мать-и-мачехи листья» [4], а также фитопрепараты «Ламинарид», «Алтейного корня экстракт сухой», «Сок подорожника», «Арменикум» [3]. В основе метода лежит цветная реакция моносахаридов с пикриновой кислотой с образованием аминопикриновой кислоты в результате восстановления сахаром группы NO_2 в NH_2 . Полученные восстанавливающие моносахариды с пикриновой кислотой в щелочной среде имеют максимум поглощения в диапазоне 440-460 нм [3-5]. Кроме пикринового метода, в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [4] включены и другие способы. Антроновый метод основан на расщеплении сложных углеводов до моносахаридов в сильноокислой среде с последующей их дегидратацией и образованием оксиметилфурфурола, образующего при реакции с антроном комплексное соединение синевато-зеленого цвета. Интенсивность образовавшейся окраски пропорциональна содержанию

сахаров в реакционной среде [3]. При нагревании пентоз в орциновом методе (или их фосфорных производных) в присутствии кислот от них отщепляется вода и образуется фурфурол; в присутствии орцина и железа (III) хлорида при этом развивается зеленое окрашивание [3].

Цель работы - разработка спектрофотометрической методики количественного определения суммы полисахаридов и простых сахаров в листьях крапивы двудомной.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследования являлось высушенное измельченное ЛРС крапивы двудомной, собранное в Воронежской области согласно правилам заготовки летом 2015 года.

Для количественного определения простых сахаров, как свободных, так и связанных в исследуемом сырье использованы методики, изложен-

ные в ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» [4].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Максимум поглощения в диапазоне длин волны 443-445 нм отмечен для стандартных образцов простых сахаров (глюкоза, фруктоза, ксилоза, рамноза, ЗАО «Вектон», Россия, СПб), использованных при разработке методики, с пикриновой кислотой в щелочной среде (рис. 1).

Выделение простых сахаров из полисахаридного комплекса осуществляли путем экстракции ЛРС водой очищенной, подкисленной концентрированной кислотой хлористоводородной, для гидролиза сложных углеводов. Для установления полноты экстракции простых сахаров из листьев крапивы двудомной изучали влияние размера частиц сырья, соотношения сырья и экстрагента, кратности экстракции и оптимального времени экстракции (рис. 2).

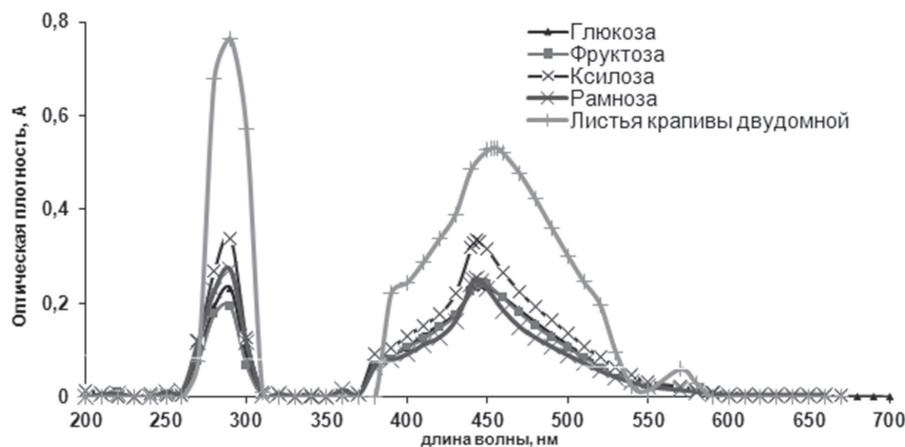


Рис. 1. Пикриновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с пикриновой кислотой)

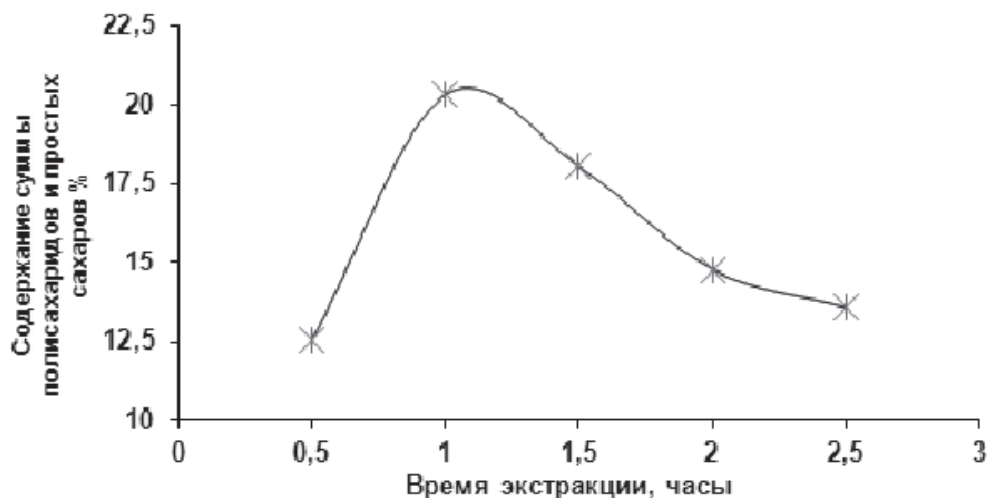


Рис. 2. Влияние времени экстракции на содержание суммы полисахаридов и простых сахаров в извлечении

Оптимальным для выделения моносахаридов является соотношения сырья с диаметром частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм и менее (рис. 3), и экстрагента 1.0:80 или 1.5:80 при добавлении конц. соляной кислоты к экстрагенту в соотношении 10:1 (таблица 1). Наилучшее время экстракции, согласно экспериментальным данным, составило 1.0 час (рис. 2). Увеличение кратности экстракции не способствует повышению выхода восстанавливающих моносахаридов из полисахаридного комплекса листьев (рис. 4).

Таблица 1

Влияние соотношения сырья и экстрагента на извлечение моносахаридов из плодов облепихи крушиновидной

№ п/п	Соотношение сырья, экстрагента и конц. HCl	Содержание суммы полисахаридов и простых сахаров, %
1	1.0:80:8	22.6047±1.0330
2	1.5:80:8	20.3777±0.9313
3	2.0:80:8	15.3144±0.6999
4	2.5:80:8	15.0122±0.6861
5	3.0:80:8	13.4444±0.6144

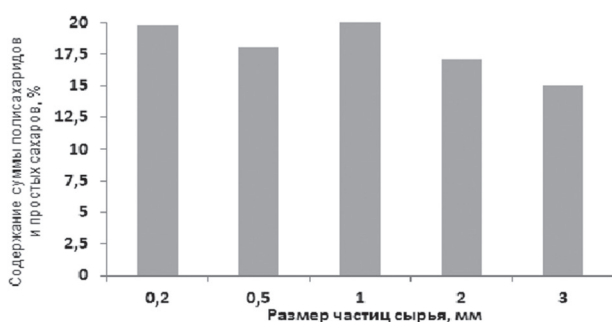


Рис. 3. Влияние размера частиц сырья на выход суммы полисахаридов и простых сахаров в извлечение

В ФС ГФ XIII изд. «Мать-и-мачехи листья» приведена методика количественного определения суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу. Расчет рекомендуется проводить с использованием величины удельного показателя поглощения комплекса глюкозы с пикриновой кислотой при длине волны 470 нм. Максимум поглощения на спектрах полученных после взаимодействия извлечений из листьев крапивы двудомной с пикриновой кислотой в предлагаемых методикой

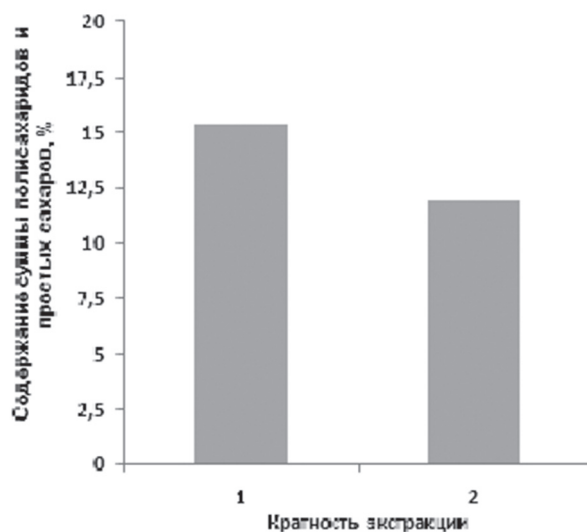


Рис. 4. Влияние кратности экстракции на выход суммы полисахаридов и простых сахаров в извлечение

условиях находился в диапазоне 448-459 нм (аналогичные максимумы давали и стандартные образцы), что не позволяло рассчитывать количественное содержание предложенным способом [4].

Согласно принципам сквозной стандартизации, содержание суммы свободных восстанавливающих моносахаридов определяли также в настое листьев крапивы двудомной (таблица 2), приготовленных в соответствии с ОФС ГФ XIII изд. «Настои и отвары» [4].

Количественное определение суммы полисахаридов и простых сахаров в ЛРС. Метрологическая оценка результатов количественного определения приведена в таблице 3. Аналитическую пробу высушенного сырья измельчают до размера частиц, проходящих через сито с отвер-

Таблица 2

Результаты определения содержания суммы свободных восстанавливающих моносахаридов в настое и сырье крапивы двудомной

№ п/п	Объект исследования	Сумма свободных восстанавливающих моносахаридов, %
1	Листья крапивы двудомной	15.2477±0.6964
2	Настой листьев крапивы двудомной	0.3249±0.0148

Таблица 3

Метрологическая характеристика метода анализа (P = 95 %; n = 4)

f	\bar{x}_{cp}	S ²	S	S \bar{x}_{cp}	t(P,t)	Δx	$\Delta \bar{x}_{cp}$	ϵ_{cp} , %	ϵ , %
3	15.24765	0.19184	0.4380	0.2190	3.18	1.39283	0.69642	4.57	9.13

ствиями размером 2 мм и менее. Около 1.0 г (т.н.) сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 80 мл воды и 8 мл хлористоводородной кислоты концентрированной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды и процеживают через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл. Остатки сырья в колбе промывают 10 мл воды и присоединяют в ту же мерную колбу, доводят при необходимости объем извлечения водой до метки и перемешивают (раствор А). В коническую колбу вместимостью 50 мл помещают 10.0 мл раствора А, прибавляют по каплям натрия гидроксида раствор 40 % до получения раствора с рН 4.0 – 4.5. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (раствор Б), отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2.5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты и 7.5 мл 20 % раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5.0 мл раствора Б. Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор В). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2.5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты, 7.5 мл 20 % раствора натрия карбоната и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл и обработанных аналогичным образом. Оптическую плотность раствора В измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония) в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 3}{A_{cm} \cdot a \cdot 25 \cdot 5 \cdot (100 - W)}$$

где A_x – оптическая плотность раствора В; A_{cm} – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично

испытуемому раствору; a – навеска сырья, г; a_0 – навеска глюкозы, г; W – влажность сырья, %.

Количественное определение суммы свободных простых сахаров в настое. Настой листьев крапивы двудомной, приготовленный в соответствии с требованиями ОФС ГФ XIII изд. «Настои и отвары» [4], в количестве 10.0 мл помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор А). Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр, отбрасывая первые 10 – 15 мл фильтрата. В мерную колбу вместимостью 100 мл помещают 2.5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты и 7.5 мл 20 % раствора натрия карбоната, перемешивают. В эту же мерную колбу помещают 5.0 мл раствора А. Колбу с содержимым нагревают на кипящей водяной бане в течение 10 мин, затем охлаждают до комнатной температуры под струей холодной воды, доводят объем раствора водой до метки и перемешивают (раствор Б). В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 2.5 мл 1 % спиртового раствора пикриновой кислоты, 7.5 мл 20 % раствора натрия карбоната и 5 мл воды, помещенных в мерную колбу вместимостью 100 мл и обработанных аналогичным образом. Оптическую плотность раствора Б измеряют относительно раствора сравнения на спектрофотометре Hitachi U-1900 (Япония) в максимуме поглощения в кювете с толщиной слоя 10 мм. Параллельно измеряют оптическую плотность стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору. Содержание суммы свободных сахаров в пересчете на глюкозу в абсолютно сухом сырье в процентах (X, %) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_x \cdot 100 \cdot a_0 \cdot 100 \cdot 3}{A_{cm} \cdot 25 \cdot 5}$$

где A_x – оптическая плотность раствора Б; A_{cm} – оптическая плотность раствора стандартного образца глюкозы, обработанного аналогично испытуемому раствору; г; a_0 – навеска глюкозы, г.

Приготовление раствора стандартного образца глюкозы. Около 0.05 г (точная навеска) глюкозы, предварительно высушенной при температуре 100-105°C до постоянной массы, растворяют в воде в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора до метки и перемешивают. 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят водой до метки, перемешивают. Раствор должен быть свежеприготовленным.

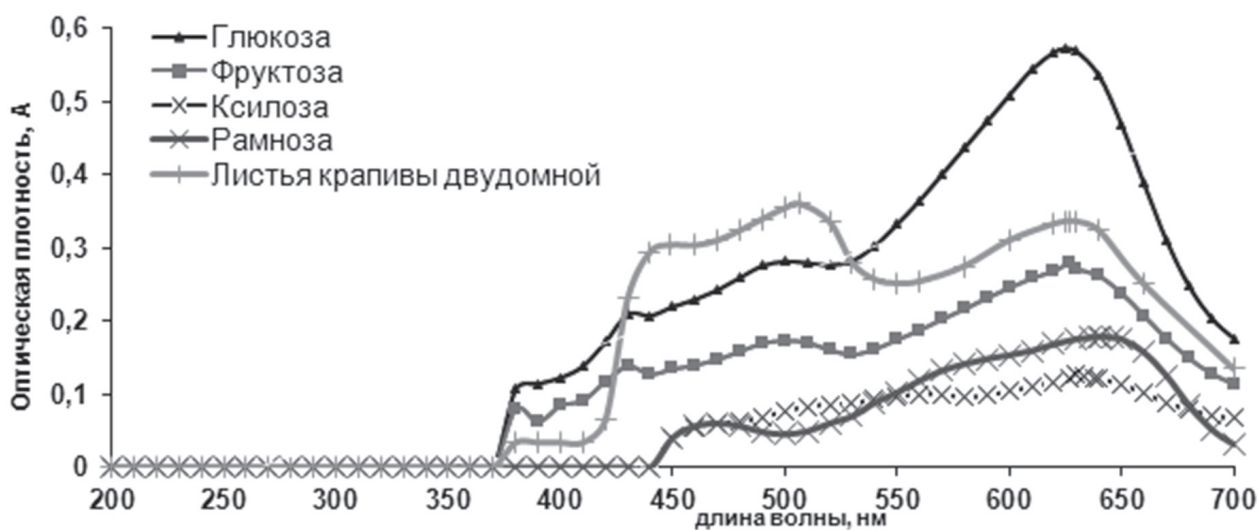


Рис. 5. Антроновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с антроновым реактивом

Таблица 4

Результаты определения суммы полисахаридов и свободных простых сахаров в полисахаридном комплексе листьев крапивы двудомной фармакопейными спектрофотометрическими методиками (в пересчете на абсолютно сухое сырье)

№ п/п	Метод определения	Сумма, %	
		Свободных и связанных простых сахаров	Свободных простых сахаров
1	Пикриновый метод (в пересчете на глюкозу)	15.3144±0.6999	4.7040±0.2150
2	Антроновый метод (в пересчете на глюкозу)	6.7539±0,7578	3.0750±0,3450
3	Орциновый метод (в пересчете на рамнозу)	11.7246±0,1180	4.1947±0,4192
	Орциновый метод (в пересчете на ксилозу)	2.2855±0,2251	0.8177±0,0805

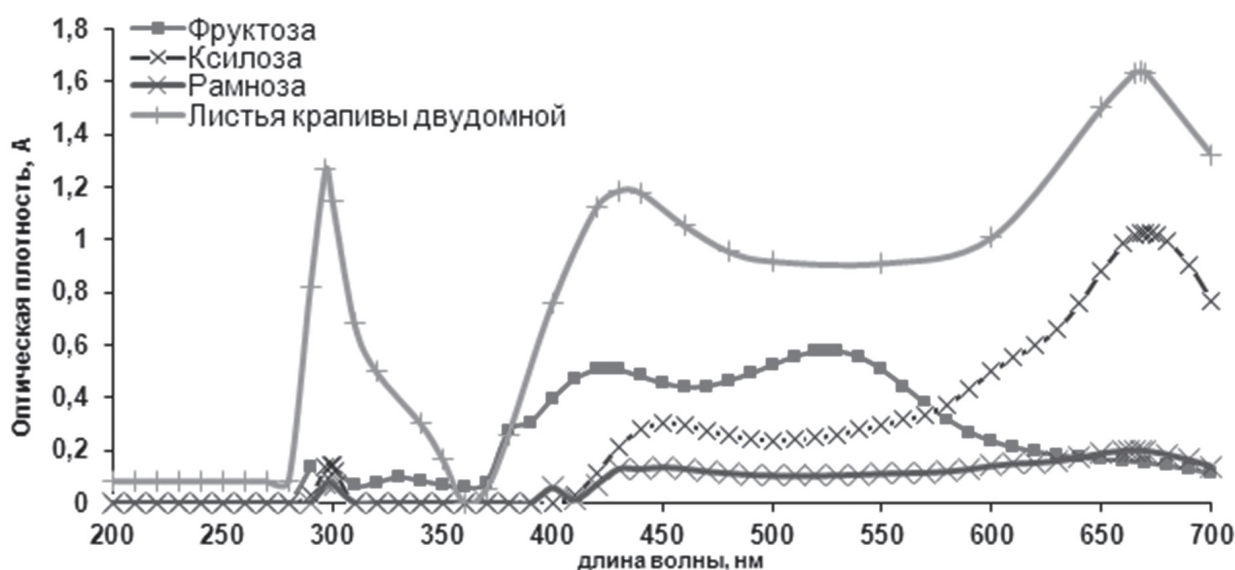


Рис. 6. Орциновый метод. Спектры поглощения продуктов реакции стандартных образцов простых сахаров и извлечений из изучаемого ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза, с орцином и хлоридом железа (III)

Количественное определение суммы свободных восстанавливающих моносахаридов полисахаридного комплекса в извлечениях из ЛРС, полученных с применением кислотного гидролиза и без было проведено также другими спектрофотометрическими методами, рекомендованными ОФС ГФ XIII [4]. Были использованы антроновый и орциновый методы (рис. 5 и 6). Приготовление антронового и орцинового реактивов, раствора пикриновой кислоты, а также других вспомогательных реактивов осуществляли по ОФС ГФ XIII изд. «Определение сахаров спектрофотометрическими методами» и ФС «Мать-и-мачехи листья» [4]. Результаты определения представлены в таблице 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, разработана методика определения суммы свободных и связанных сахаров пикриновым методом в листьях и настое листьев крапивы двудомной. Установлены оптимальные параметры извлечения полисахаридного комплекса из сырья. Дополнительно проведено определение суммы полисахаридов и простых сахаров в ЛРС антроновым и орциновым методами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова [и др.] // Фармация. – 2012. - №2. – С. 5 – 7.
2. Копытько Я.Ф. Применение, химический состав и стандартизация сырья и препаратов *Urtica* (обзор) / Я.Ф. Копытько, Е.С. Лапинская, Т.А. Со-кольская // Хим.- фарм. журн.- 2011. - №10. – С. 32-40.
3. Определение сахаров спектрофотометрическими методами / И.А. Самылина [и др.] // Фармация. – 2009. - №4. – С. 3 – 5.
4. Государственная Фармакопея Российской Федерации. - XIII изд.: в 3 т. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. – Режим доступа: <http://www.femb.ru/feml>.
5. Тринева, О.В. Определение суммы полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в плодах облепихи крушиновидной различных способов консервации / О.В. Тринева, М.А. Казьмина, А.И. Сливкин // Материалы 6-ой Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2016», Воронеж 21-23 апреля (2016). – С. 547-551.

*Воронежский государственный университет
Тринева О. В., кандидат фарм. наук, доцент
кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: trineevaov@mail.ru*

*Сливкин А. И., доктор фарм. наук, профессор,
зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharmvsu.ru*

*Voronezh State University
Trineeva O. V., the candidate pharm. sciences, the
senior lector to faculty of pharmaceutical chemistry
and pharmaceutical technology
E-mail: trineevaov@mail.ru*

*Slivkin A. I., the doctor pharm. sciences,
the professor, manager of the department of
pharmaceutical chemistry and pharmaceutical
technology,
E-mail: slivkin@pharmvsu.ru*