

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБОВ АНАЛИЗА ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ *LAMINARIA SACCHARINA***

Струсовская 1.О.Г., Компанцева 2.Е.В.,* Попова 3.О.И.,* Лукашук 4.С.П.,* Байкин
5.П.И.

Северный государственный медицинский университет

163000, г. Архангельск,

пр. Троицкий, 51;

909-554-23-48;

Strol3@yandex.ru

Аннотация.

С целью совершенствования способов анализа, разработана новая трактовка раздела «Микроскопия» статьи ГФ XI на слоевища *Laminaria saccharina*, которая позволяет более точно идентифицировать сырье путем сравнения микропрепаратов с иллюстрирующими описание фотографиями. Предлагаемая методика количественного определения, позволяет провести определение как водорастворимых полисахаридов, так и полисахаридов некрахмальной структуры в воздушно-сухом сырье *Laminaria saccharina*.

Ключевые слова: *Laminaria saccharina*; полисахариды; микроскопия; количественное определение; антрон

**THE IMPROVEMENT OF THE METHODS OF ANALYSIS OF MEDICAL
PLANTS *LAMINARIA SACCHARINA***

Strusovskaya 1.O.G., Kompantseva 2.E.V.,* Popova 3.O.I.,* Lucashuk 4.S.P.,* Baykin 5.P.I.

Northern State Medical University

Summary.

In order to improve the methods of analysis, a new interpretation of the section "Microscopy" Article on the Pharmacopoeia of the USSR XI on the "Thalli *Laminaria*

saccharina”, which allows more accurate identification of materials by comparing micropreparations with pictures, illustrating the description, was developed. The method proposed allows to determine the quantity of the sum of polysaccharides soluble and insoluble in water.

Keywords: *Laminaria saccharina*; polysaccharides; microscopy; estimation; anthrone

Введение. В соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 "Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения" (ОСТ) /1/, утвержденным Приказом МЗ РФ №388 «О государственных стандартах качества лекарственных средств» от 01.11. 2001 г. /2/ некоторые нормативные документы, в частности на лекарственное растительное сырье, нуждаются в уточнении показателей качества. В фармакопейной статье ГФ XI «Слоевница ламинарии (*Thallii Laminariae*)» (ФС) /3/ редакция раздела «Микроскопия» касается только цельного растительного сырья. Поскольку ФС регламентирует качество цельного, шинкованного и измельченного сырья *Laminaria saccharina* (L.) и *Laminaria japonica* Aresch. существует необходимость более детального описания диагностических признаков как цельного, так и измельченного сырья, иллюстрированные фотографиями микропрепаратов.

Раздел «Количественное определение. Определение содержания полисахаридов» в ФС предусматривает определение содержания только полисахаридов, растворимых в воде, методом гравиметрии. Метод трудоемок в исполнении, длителен по времени и имеет низкую воспроизводимость /4/. Известно также, что углеводные полимеры представляют собой сложную смесь компонентов углеводной, белковой, минеральной и фенольной природы. Гравиметрический вариант анализа не позволяет оценить содержание углеводной компоненты в выделенных образцах, так как определяется суммарный выход всего комплекса /5/. В химическом составе растений семейства *Laminariaceae* содержатся как полисахариды растворимые в воде, так и некрахмальные соединения этой группы (альгинаты, фукоиданы, нерастворимая фракция ламинарина), обладающие широким спектром фармакологической активности /6/.

Цель исследования: совершенствование способов анализа лекарственного растительного сырья *Laminaria saccharina*, по разделам ФС «Микроскопия» и «Определение содержания полисахаридов».

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали воздушно-сухое сырье *Laminaria saccharina*, собранное в Белом море у побережья островов Соловецкого архипелага в июле 2011 г. Препараты для микроскопического анализа готовили в соответствии с требованиями ГФ XI /7/. Исследования микропрепаратов проводили, основываясь на сходстве основных диагностических признаков внутривидовых таксонов, отнесенных к роду *Saccharina* /8/ на примере *Laminaria saccharina* (L.). Диагностику полученных препаратов проводили при увеличении 300х и 600х.

В основу способа определения полисахаридов *Laminaria saccharina* была положена методика определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов, предложенная Оленниковым Д.Н. и Танхаевой Л.М. /5/.

Для количественного определения полисахаридов воздушно-сухое сырье *Laminaria saccharina* измельчали и просеивали через лабораторные сита С30/50 (ГОСТ 3826-82) с размером отверстий 1 мм. Около 2,0 г (точная масса) измельченного сырья помещали в термостойкую колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 70 мл спирта этилового 80%, присоединяли обратный холодильник и помещали на кипящую водяную баню на 1 час с целью извлечения из сырья свободных углеводов. Операцию повторяли трижды.

Для количественного определения водорастворимых полисахаридов к остатку сырья добавляли 1% водный раствор натрия хлорида с целью улучшения реологических параметров получаемых экстрактов и, как следствие, увеличения выхода полисахаридов /9/ и проводили экстрагирование сырья на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Процедуру повторяли дважды. Полученные извлечения фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» в мерную колбу вместимостью 200 мл. Объем экстракта доводили водой до метки. Раствор перемешивали, В центрифужную пробирку переносили 2 мл, полученного раствора, прибавляли 8 мл спирта этилового 96%, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин со скоростью вращения 3000 об/мин. Надосадочную жидкость декантировали, осадок в пробирке обрабатывали горячим воздухом до удаления следов запаха спирта. К осадку прибавляли 4 мл 0,2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной (антронный реактив) и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения содержимое пробирки количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл с помощью спирта этилового 96%. Объем раствора в колбе доводили тем же растворителем до метки.

Для количественного определения полисахаридов, нерастворимых в воде, к остатку растительного материала прибавляли смесь 0,5% растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата в соотношении 1:1 и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 1,5 часов. Полученное извлечение декантировали в мерную колбу вместимостью 200 мл. Процедуру повторяли дважды. После охлаждения объединенного извлечения объем раствора в колбе доводили до метки смесью растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата. Раствор перемешивали. В центрифужную пробирку переносили 1 мл, полученного раствора. Далее поступали так же, как и при определении водорастворимых полисахаридов.

Оптическую плотность полученных растворов определяли на спектрофотометре СФ-56А (Россия) в диапазоне длин волн 300 нм – 500 нм в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали смесь 4 мл антронного реактива и спирта этилового 96%, объем которой доводили до метки спиртом этиловым 96% в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Примечание:

1. Приготовление антронного реактива. Около 0,2 г антрона (ТУ 6-09-08-1833.ч) (точная масса), перекристаллизованного из бензола (ГОСТ 5955-75 ч.д.а.), помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, прибавляют около 1,0 г тиомочевины (ГОСТ 6344-73 ч.д.а.) (точная масса), растворяют в небольшом количестве кислоты серной концентрированной и доводят объем раствора в колбе этим же растворителем до метки.
Используют свежеприготовленный реактив.
2. Перекристаллизация антрона. 10 г антрона растворяют в 90 мл горячего бензола (ГОСТ 5955-75). К полученному раствору медленно, при постоянном перемешивании, по каплям прибавляют 30 мл холодного эфира петroleйного (ГОСТ/ТУ: ТУ 2631-074-44493179-01 х.ч.). Выпавший осадок (кристаллы светло-зеленого цвета) отфильтровывают на воронке Бюхнера и высушивают до исчезновения запаха растворителя. Хранят в эксикаторе над кальция хлоридом /10/.

Результаты и обсуждение. В результате анализа микропрепаратов цельного сырья было установлено, что на поперечном срезе слоевища *Laminaria saccharina* наблюдается

наличие четырех основных структур: меристодерма, корковый слой, в свою очередь включающий эктодермальный и эндодермальный слои клеток, и сердцевина (рис. 1).

Рис. 1

Поперечный срез слоевища *Laminaria saccharina* (300х)



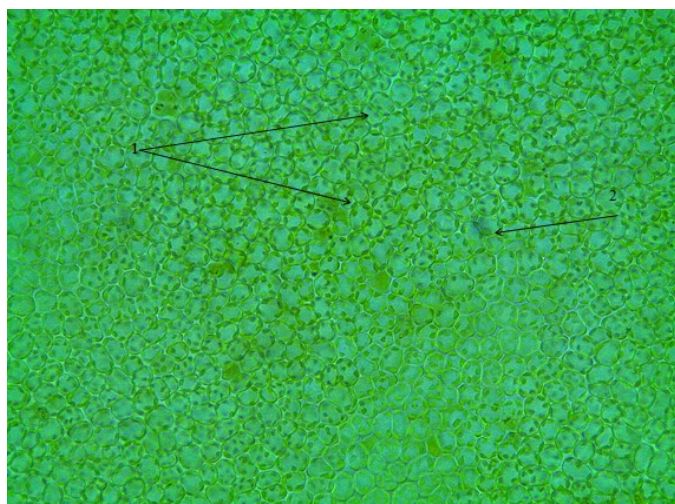
- | | | |
|-----------------|---------------|------------------------------------|
| 1. меристодерма | 3. эндодерма | 5. слизистые вместилища |
| 2. эктодерма | 4. сердцевина | 6. мелкие призматические кристаллы |

Клетки меристодермы имеют кубоидальную форму и утолщенные внешние периклиальные стенки (рис. 2). Клетки плотно прилегают друг к другу, образуя ряды. В углах клеток меристодермы расположены дисковидные физоиды [11], содержащие хлоропласты (рис. 2).

Под слоем меристодермы неплотно рядами расположена эктодерма, состоящая из мелких клеток цилиндрической формы, заполненных прозрачным содержимым (рис.1). Клетки эндодермы крупнее клеток эктодермы, заполнены прозрачным содержимым, расположены диффузно и разделены межклеточным пространством (рис.1). Клетки сердцевинки мелкие, имеют цилиндрическую форму, с плотно прилегающими друг к другу прямыми стенками (рис.1). Во всех слоях клеток встречаются включения мелких прозрачных призматических кристаллов (рис. 1)

Рис. 2

Меристодерма *Laminaria saccharina* (600х)



1. физоиды; 2. слизистые вместилища

Измельченное сырье. Микропрепарат измельченного сырья *Laminaria saccharina* представляет собой обрывки клеток меристодермы с бесцветными клетками коркового слоя (рис. 3).

Рис. 3

Измельченное сырье *Laminaria saccharina*



1. клетки меристодермы 2. клетки коркового слоя

При определении количественного содержания полисахаридов в воздушно-сухом сырье *Laminaria saccharina*, в ходе предварительных исследований было установлено, что электронные спектры продуктов взаимодействия глюкозы и деструктурированных

полисахаридов с антроном имеют максимумы оптической плотности в области $430 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (рис.4). Поэтому содержание полисахаридов вычисляли с учетом коэффициента пересчета на глюкозу по формуле /5/:

$$X = \frac{A \cdot k \cdot 100}{m \cdot 358 \cdot (100 - b)},$$

где A – оптическая плотность исследуемого раствора;

k – коэффициент разбавления (2500 – при определении водорастворимых полисахаридов; 5000 – при определении полисахаридов, нерастворимых в воде);

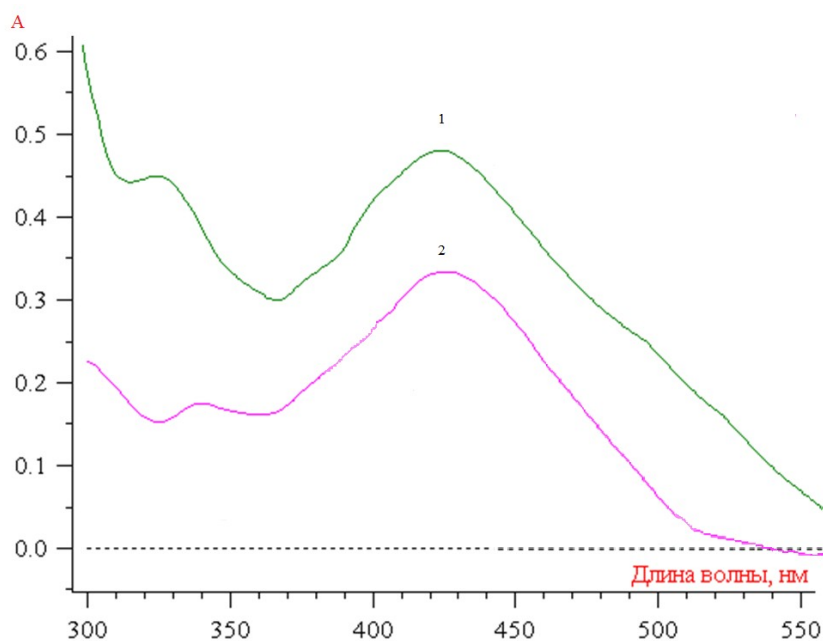
358 – коэффициент пересчета на глюкозу;

m – масса навески сырья, г;

b – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Рис.4

УФ-спектры исследуемых соединений



1- УФ-спектр продуктов взаимодействия гидролизата *Laminaria saccharina* с антроном

2– УФ-спектр продукта взаимодействия глюкозы с антроном;

Результаты количественного определения суммы полисахаридов в воздушно-сухом сырье *Laminaria saccharina* представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения суммы полисахаридов в воздушно-сухом сырье *Laminaria saccharina*, собранного в Белом море летом 2011 г

масса навески сырья, г	Найдено полисахаридов, растворимых в воде, %	Метрологические характеристики	Найдено полисахаридов, нерастворимых в воде, %	Метрологические характеристики
2,1265	17,75	$\bar{X} = 17,41$ $S_x = 0,248$ $\Delta x = 0,64$ $\varepsilon = 3,66\%$	24,70	$\bar{X} = 24,31$ $S_x = 0,373$ $\Delta x = 0,96$ $\varepsilon = 3,94\%$
2,0965	17,30		23,59	
2,0348	17,22		23,84	
1,9998	16,91		25,46	
2,0348	16,82		23,16	
1,9895	18,45		25,11	

Таким образом, в пробах воздушно-сухого сырья *Laminaria saccharina*, собранного летом 2011 г у берегов островов Соловецкого архипелага среднее содержание полисахаридов растворимых в воде составило 17,4%, тогда как полисахаридов нерастворимых в воде – 24,3%. Использование данной методики, позволяет более точно определить углеводный состав растительного сырья по сравнению с гравиметрическим методом.

Выводы: новая трактовка раздела «Микроскопия» позволяет идентифицировать растительное сырье семейства *Laminariaceae*, путем сравнения микропрепаратов с иллюстрирующими описание фотографиями.

Методика количественного определения полисахаридов по реакции взаимодействия продуктов их гидролиза с антроном, позволяет провести определение как водорастворимых полисахаридов, так и полисахаридов некрахмальной структуры в воздушно-сухом сырье *Laminaria saccharina*.

Литература

1. Отраслевой стандарт. «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения». ОСТ 91500.05.001.00.
2. Приказ МЗ РФ №388 от 01.11. 2001 г. «О государственных стандартах качества лекарственных средств».
3. Государственная Фармакопея СССР изд. 11 /Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье//М.:Медицина.-1990.-вып.2. - С.377-380.

4. Оленников Д.Н. Модификация антронового метода количественного определения углеводов и его применение для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды/Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева//Бюлл. Сиб. медицины.-2006.- Прил.2.-С.118-119.
5. Оленников Д.Н. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов/ Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева// Химия раст. сырья.-2006.-№4.- С. 29–33.
6. Хотимченко Ю.С. Фармакология некрахмальных полисахаридов/Ю.С. Хотимченко, И.М. Ермак, А.Е. Бедняк, Э.И. Хасина и др.//Вестник ДВО РАН. -2005.- № 1.-С.72-82.
7. Государственная Фармакопея СССР изд. 11 /Общие методы анализа //М.:Медицина.- 1987.-вып.1. - С.277-282.
8. Селиванова О.Н. Пересмотр систематики водорослей порядка *Laminariales (Phaeophyta)* из Дальневосточных морей России на основании молекулярно-генетических данных /О.Н. Селиванова, Г.Г. Жигадлова, Г.И. Хэнсен//Ж.Биология моря.-2007.-Т.33.-№5.-с.329-340.
9. Оленников Д.Н. Структурно-функциональное исследование биополимеров растительного и грибного происхождения и совершенствование методов их анализа/Д.Н. Оленников//автореф. дисс. докт. фарм. наук.- Улан-Удэ – 2012.-40 с.
10. Метод определения растворимых и легкогидролизуемых углеводов с антроновым реактивом. ГОСТ 26176-91.
11. Sideman E.J. Some fine structural observations on developing and mature sieve elements in the Brown Alga *Laminaria saccharina*/E.J. Sideman, D.C. Scheirer//Amer.Jour. of botany.- 1977.-Vol.64.-N 6.-p.649-657.