

УДК 5547.56:547.972.2

СОДЕРЖАНИЕ ПОЛИСАХАРИДОВ В НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *SAUSSUREA CONTROVERSA* DC

© Е.Ю. Авдеева^{1*}, Е.А. Краснов¹, А.А. Семенов²

¹Сибирский государственный медицинский университет, ул. Московский тракт, 2, Томск, 634050 (Россия), e-mail: elenaavdeev@yandex.ru

²НПО «Байкал-Биосинтез», ул. Лермонтова, 87, Иркутск, 664074 (Россия), e-mail: solvey@irk.ru

Изучены качественный состав и количественное содержание полисахаридов в траве *Saussurea controversa* DC (сем. *Asteraceae*) как биологически активных компонентов, обуславливающих ее иммуномодулирующую и противовоспалительную активность при остеомиелите. Из надземной части *Saussurea controversa* DC выделен полисахаридный комплекс, включающий водорастворимые полисахариды, полученные из нейтральной среды с выходом 6,0%, водорастворимые полисахариды, полученные из кислой среды с выходом 1,3%, и пектиновые вещества с выходом 16,0%. Мономерный состав водорастворимых полисахаридов как из нейтральной так и из кислой среды представлен L-арабинозой, D-галактозой и D-глюкозой. Пектиновые вещества, состоящие из L-арабинозы и D-галактуронозой кислоты доминируют в полимерном составе растения. Разработана методика спектрофотометрического определения полисахаридов в надземной части *Saussurea controversa* DC по реакции с антронсерным реактивом. Апробация методики проведена на трех образцах сырья, содержание водорастворимых полисахаридов варьирует от $3,73 \pm 0,13$ до $6,50 \pm 0,24\%$.

Ключевые слова: *Saussurea controversa* DC, полисахариды, пектиновые вещества, спектрофотометрическое определение.

Введение

В настоящее время, несмотря на достижения в диагностике и методах хирургического лечения остеомиелита, актуальной остается проблема поиска препаратов для его консервативной терапии [1]. В патогенезе остеомиелита важное значение имеют изменения в иммунной системе и прогрессирование системного воспалительного процесса [2]. Учитывая длительность лечения данной патологии, актуальным является разработка лекарственных средств на основе природных биологически активных веществ (БАВ) растений, преимущество которых заключается в малой токсичности, мягкости действия и редком индуцировании аллергических реакций. Перспективными являются полисахариды растений, обладающие ценными техническими свойствами и высокой физиологической активностью, в частности, иммуномодулирующей и противовоспалительной [3].

В результате экспериментального моделирования остеомиелита у крыс выявлено положительное течение заболевания при применении экстрактов из надземной части соссюреи спорной (*Saussurea controversa* DC, сем. *Asteraceae*) [4]. Кроме того, в результате исследований экстрактов и полисахаридов растения выя-

влены антимикробная [5] и иммуномодулирующая [6, 7] виды активности. В народной медицине *S. controversa* популярна как противовоспалительное и ранозаживляющее средство [8].

Несмотря на перспективность данного вида, химический состав его мало изучен [8]. Ранее в надземной части *S. controversa* хроматографиче-

Авдеева Елена Юрьевна – старший преподаватель кафедры фармацевтической химии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: elenaavdeev@yandex.ru

Краснов Ефим Авраамович – профессор кафедры фармацевтической химии, доктор фармацевтических наук, e-mail: krasnov.37@mail.ru

Семенов Аркадий Алексеевич – доктор химических наук, профессор, e-mail: solvey@irk.ru

* Автор, с которым следует вести переписку.

скими методами и химическими реакциями нами обнаружены кумарины, фенолокислоты, флавоноиды, моносахара, полисахариды и аминокислоты [9]; выделены и идентифицированы эскулетин, кофейная кислота, кверцетин и кемпферол [10]. Распределительной КХ на полиамиде из бутанольной фракции водно-этанольного экстракта получен ряд флавонолгликозидов [10, 11].

Таким образом, изучение полисахаридов *S. controversa* как БАВ, обуславливающих ее иммуномодулирующую и противовоспалительную активность при остеомиелите, является актуальной задачей.

Цель работы – исследование качественного состава и количественного содержания полисахаридов в траве *S. controversa*.

Экспериментальная часть

Материалом для исследования служила высушенная надземная часть *Saussurea controversa* DC (сем. *Asteraceae*) с содержанием влаги $6,3 \pm 0,1\%$, собранная в фазу цветения в июле 2010–2012 гг. в окрестностях п. Кочергат Иркутской обл.

Для изучения фракционного и мономерного составов полисахаридов выделяли полисахаридный комплекс по методике с подобранными параметрами извлечения, позволившими получить максимальное количество целевых веществ с минорным содержанием примесных соединений. Для этого сырье, с размером частиц 2–3 мм дважды экстрагировали водой очищенной (1 : 45) на водяной бане (95 °С, 1 ч). Объединенные извлечения упаривали под вакуумом и водорастворимые полисахариды (ВПРС) осаждали трехкратным количеством 96% этилового спирта (рис. 1). Шрот экстрагировали водой, подкисленной до pH 4,0 хлористоводородной кислотой (50 °С, 3 ч), затем 0,7% раствором оксалата аммония (70 °С, 4 ч). Из полученных экстрактов тем же способом получали фракции «кислых» полисахаридов (КПС) и пектиновых веществ (ПВ) соответственно. Полученные фракции гидролизовали 2 моль/л раствором кислоты трифторуксусной при 100 °С в течение 6 ч и их мономерный состав устанавливали методом БХ на бумаге марки FN-12 в системе растворителей бутанол – пиридин – вода 6 : 4 : 3 параллельно с достоверными образцами сахаров. Детектор – раствор анилинфталата в бутаноле (105 °С, 5 мин).

Количественное содержание полисахаридов в сырье определяли спектрофотометрическим методом после проведения реакции с антронсерным реактивом [12] на спектрофотометре СФ-2000 (Россия). Поскольку точность полученных результатов зависит от чистоты химических реактивов, антрон предварительно перекристаллизовывали из 95% этанола, получая почти бесцветные игольчатые кристаллы с температурой плавления 153–154,5 °С. Для адаптации методики к конкретному виду сырья варьировали ряд параметров экстракции и подбирали необходимое разведение. Содержание полисахаридов в различных образцах сырья определяли по нижеизложенной методике.

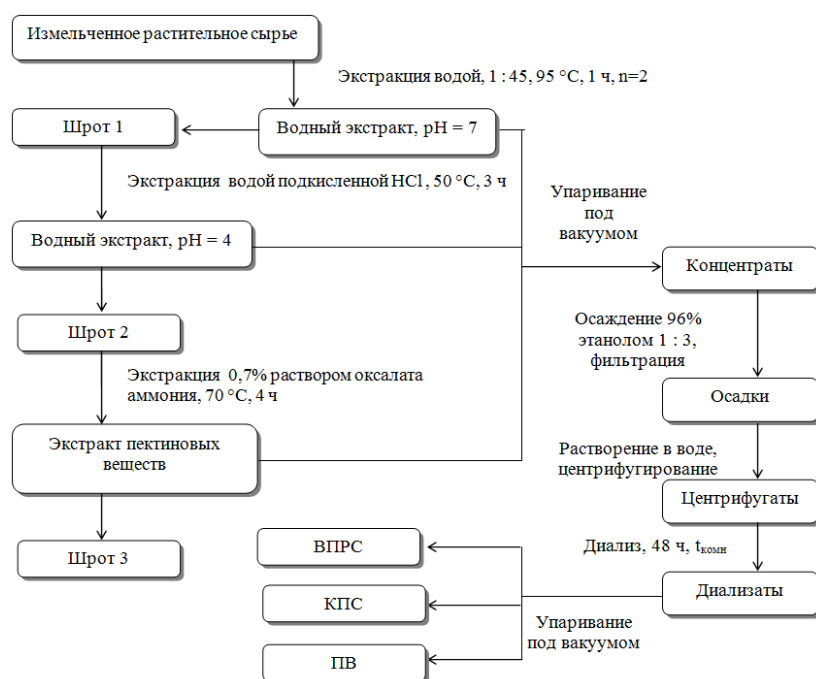


Рис. 1. Схема выделения полисахаридов из надземной части *Saussurea controversa* DC

Методика количественного определения полисахаридов в надземной части S. controversa. 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до 2–3 мм, экстрагируют дважды на кипящей водяной бане водой в соотношении 1 : 45 в течение 1 ч. Извлечения фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят водой до метки (раствор А). 2 мл раствора А переносят в центрифужную пробирку, прибавляют 6 мл 96% этилового спирта и через 1 ч центрифугируют в течение 5 мин со скоростью 2600 об/мин. Полученный осадок количественно переносят водой в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл разбавленной хлористоводородной кислоты и доводят водой до метки (раствор Б).

К 1 мл раствора Б прибавляют 2 мл 0,2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной, охлаждают при 8–10 °С 5 мин и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 625 нм. В качестве раствора сравнения используют смесь из 1 мл воды очищенной и 2 мл 0,2% раствора антрона, приготовленную в тех же условиях.

Содержание полисахаридов вычисляют по калибровочному графику, для построения которого 0,1 г (точная навеска) глюкозы, высушенной до постоянной массы при 100 °С, растворяют в мерной колбе вместимостью 100 мл и доводят водой до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор Б). Из раствора Б и воды готовят серию разведений так, чтобы объем полученного раствора составил 1 мл. Затем к каждому разведению добавляют по 2 мл 0,2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной и выдерживают в тех же условиях, что и опытную смесь. По полученным данным строят калибровочный график зависимости оптической плотности полученного раствора от содержания глюкозы (мкг/мл).

Количество полисахаридов в пересчете на воздушно-сухое сырье вычисляют по формуле:

$$X\% = \frac{m_{\text{гл}} * 100 * 25 * 100 * 100}{m_{\text{сырья}} * 10^6 * 2 * (100 - w)}$$

где $m_{\text{гл}}$ – количество глюкозы, определенное по калибровочному графику, мкг/мл; $m_{\text{сырья}}$ – масса навески сырья, г; 10^6 – пересчет микрограммов в граммы; w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Обсуждение результатов

Результаты изучения фракционного состава полисахаридного комплекса показали, что мономерный состав ВПРС *S. controversa* (выход 6,0%) представлен L-арабинозой, D-галактозой и D-глюкозой. Сумма КПС с аналогичным качественным составом определена в 1,3%, а пектиновых веществ, состоящих из L-арабинозы и D-галактуроновой кислоты, – 16,0%.

При разработке методики количественного определения полисахаридов в надземной части *S. controversa* установили, что оптимальным условием для их извлечения является двухкратная экстракция водой в соотношении с сырьем 1 : 45 при температуре 95–100 °С в течение 60 мин (табл. 1).

Построение калибровочного графика основывалось на шести разведениях стандартного раствора глюкозы. График представлял собой линейную зависимость оптической плотности от содержания глюкозы в растворе с коэффициентом корреляции 0,9966 (рис. 2).

Таблица 1. Влияние условий экстракции на выход полисахаридов *Saussurea controversa* DC

Условия экстракции, n=6		\bar{A}	\bar{X} , %
Соотношение (сырье : экстрагент)	1 : 90, N=1	0,439	3,41
	1 : 45, N=2	0,488	3,73
	1 : 30, N=3	0,451	3,49
Температура нагревания, °С	70	0,432	3,37
	80	0,436	3,40
	95–100	0,443	3,45
Время экстракции, мин	30	0,451	3,49
	60	0,458	3,55
	90	0,457	3,52
Измельченность сырья, мм	0,5–1	0,434	3,39
	2–3	0,443	3,45
	5–7	0,433	3,38
	8–10	0,424	3,32

Апробацию методики спектрофотометрического определения полисахаридов в надземной части *S. controversa* по реакции с антронсерным реактивом проводили на трех образцах сырья, собранных в 2010–2012 гг., в шести повторностях. Содержание полисахаридов варьировало от $3,73 \pm 0,13$ до $6,50 \pm 0,24\%$, при этом погрешность определения составила не более 4,5% (табл. 2).

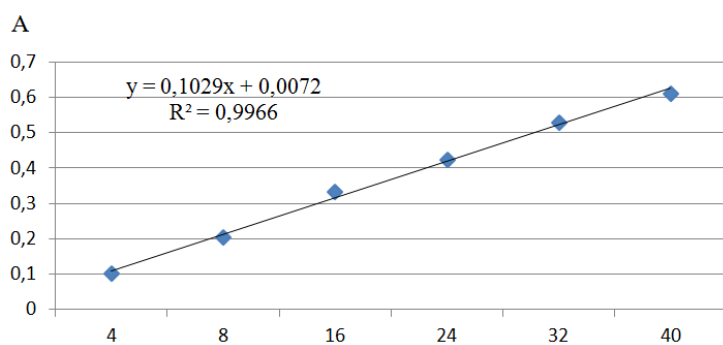


Рис. 2. Калибровочный график стандартных растворов глюкозы, мкг/мл

Таблица 2. Содержание полисахаридов в надземной части *Saussurea controversa* DC

№ образца	$\bar{X} \pm x$ (%), n = 6	Метрологические характеристики
1	$3,73 \pm 0,13$	$\sigma^2 = 0,0180$; $\sigma = 0,1341$; $\sigma_x = 0,0547$; $I_p = 0,1339$; E = 4,46%
2	$6,20 \pm 0,06$	$\sigma^2 = 0,0040$; $\sigma = 0,0632$; $\sigma_x = 0,0258$; $I_p = 0,0631$; E = 1,10%
3	$6,50 \pm 0,24$	$\sigma^2 = 0,0620$; $\sigma = 0,2489$; $\sigma_x = 0,1016$; $I_p = 0,2486$; E = 3,82%

Выводы

Надземная часть *Saussurea controversa* отличается значительным содержанием полисахаридного комплекса, который, вероятно, обуславливает ее иммуномодулирующую и противовоспалительную активность при экспериментальном остеомиелите. Он состоит из 6,0 и 1,3% водорастворимых полисахаридов, извлекаемых соответственно в нейтральной и кислой среде, а также 16,0% пектиновых веществ. Мономерный состав водорастворимых полисахаридов представлен L-арабинозой, D-галактозой и D-глюкозой; пектиновых веществ – L-арабинозой и D-галактуроновой кислотой.

Содержание полисахаридов в надземной части *S. controversa*, определенное спектрофотометрическим методом по реакции с антронсерным реактивом, в различных образцах сырья варьирует от $3,73 \pm 0,13$ до $6,50 \pm 0,24\%$.

Список литературы

1. Шалыгин В.А., Масликов В.М., Кравченко Н.М. Интенсивная терапия и хирургическое лечение острого гематогенного остеомиелита у детей. Томск, 2000. 29 с.
2. Кирдей Е.Г., Федосеев А.П., Белохвостикова Г.С., Рубашкина Э.В., Дмитриева Л.А., Бахешева М. Особенности иммунного статуса у больных с хроническими остеомиелитами – носителей некоторых условно-патогенных микроорганизмов // Диагностика и лечение политравм. Ленинск-Кузнецкий, 1999. С. 265–266.
3. Оводов Ю.С. Полисахариды цветковых растений: структура и физиологическая активность // Биоорганическая химия. 1998. Т. 24, №4. С. 483–501.
4. Авдеева Е.Ю., Зоркальцев М.А., Завадовская В.Д., Слизовский Г.В., Краснов Е.А., Пехенько В.Г., Степанов М.Ю. Сцинтиграфическое исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* и *Fillipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите // Бюллетень сибирской медицины. 2015. №3. С. 5–9.
5. Макаренко Н.Г. Антимикробные свойства лекарственных растений Горного Алтая : автореф. дис. ... канд. биол. наук. Томск, 1974. 18 с.
6. Krasnov E.A., Avdeeva E.Yu., Gorina Y.V., Sherstoboev E.Yu. The composition of biological active substances and pharmacological activity of perspective species flora of Siberia // 4th Annual Russian-Korean Conference «Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology». Novosibirsk, 2012. P. 37.
7. Semenov A.A. Natural Immunomodulators from Siberian Plants // Int. conf. on Nat. Prod. and Physiol. Activ Subst. Novosibirsk, 1998. P. 11.
8. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейства Нудрагевые – Haloragaceae. Л., 1987. 326 с.
9. Авдеева Е.Ю., Краснов Е.А., Семенов А.А. Исследование химического состава соссюреи спорной // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. 2010. №7. С. 14–16.

10. Авдеева Е.Ю., Краснов Е.А., Семенов А.А., Соколова С.Н. Исследование фенольных соединений сосюреи спорной // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья. Барнаул, 2012. С. 259–260.
11. Авдеева Е.Ю., Краснов Е.А., Семенов А.А., Хусаинова А.Ф. Исследование флавонолгликозидов сосюреи спорной // Химия и фармакология растительных веществ. Сыктывкар, 2014. С. 5–6.
12. Сафонова М.Ю., Саканян Е.И., Лесиовская Е.Е. Спектрофотометрический метод определения содержания полисахаридов в слоевищах *Cetraria islandica* (L.) Ach. // Растительные ресурсы. 1999. Т. 35, вып. 2. С. 101–105.

Поступило в редакцию 25 февраля 2015 г.

После переработки 20 июня 2015 г.

Avdeeva E.Yu.^{1*}, Krasnov E.A.¹, Semenov A.A.² THE CONTENT OF POLYSACCHARIDES IN ABOVEGROUND PARTS SAUSSUREA CONTROVERSA DC

¹Siberian State Medical University, Moskovskii trakt, 2, Tomsk, 634050 (Russia), e-mail: elenaavdeev@yandex.ru

²Scientific Production Association "Baikal-Biosynthesis", Lermontova, 87, Irkutsk, 664074 (Russia), e-mail: solvey@irk.ru

The qualitative and quantitative composition of the polysaccharide content in the grass *Saussurea controversa* DC (Sem. Asteraceae) as the biologically active components that determine its immunomodulatory and anti-inflammatory activity in osteomyelitis. From the aerial parts *Saussurea controversa* DC isolated polysaccharide complex consisting of water-soluble polysaccharides derived from a neutral solution in a yield of 6,0%, water-soluble polysaccharides derived from the acidic solution in a yield of 1,3% and pectin in a yield of 16,0%. The monomer composition as the water-soluble polysaccharides from neutral and from an acidic solution contains L-arabinose, D-galactose and D-glucose. Pectin substances consisting of L-arabinose to D-galacturonic acid in the polymer composition is dominated plant. A method for spectrophotometric determination of polysaccharides in the aerial part of *Saussurea controversa* DC. Testing techniques performed on three samples of raw materials, the content of water-soluble polysaccharides varies from 3,73±0,13 to 6,50±0,24%.

Keywords: *Saussurea controversa* DC, polysaccharides, pectin, spectrophotometric determination.

References

1. Shalygin V.A., Maslikov V.M., Kravchenko N.M. *Intensivnaia terapiia i khirurgicheskoe lechenie ostrogo gematogenno osteomielita u detei*. [Intensive therapy and surgical treatment of acute osteomyelitis in children]. Tomsk, 2000, 29 p. (in Russ.).
2. Kirdei E.G., Fedoseev A.P., Belokhvoshtikova G.S., Rubashkina E.V., Dmitrieva L.A., Bakhisheva M. *Diagnostika i lechenie politravm*. [Diagnosis and treatment of polytrauma]. Leninsk-Kuznetsky, 1999, pp. 265–266. (in Russ.).
3. Ovodov Iu.S. *Bioorganicheskai khimiia*, 1998, vol. 24, no. 4, pp. 483–501. (in Russ.).
4. Avdeeva E.Iu., Zorkal'tsev M.A., Zavadovskaia V.D., Slizovskii G.V., Krasnov E.A., Pekhen'ko V.G., Stepanov M.Iu. *Biulleten' sibirskoi meditsiny*, 2015, no. 3, pp. 5–9. (in Russ.).
5. Makarenko N.G. *Antimikrobnnye svoistva lekarstvennykh rastenii Gornogo Altaia : avtoref. dis. ... kand. biol. nauk*. [The antimicrobial properties of medicinal plants of the Altai Mountains: the Dissertation of the candidate of biological sciences]. Tomsk, 1974. 18 p. (in Russ.).
6. Krasnov E.A., Avdeeva E.Yu., Gorina Y.V., Sherstoboev E.Yu. 4th Annual Russian-Korean Conference «Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology». Novosibirsk, 2012. P. 37.
7. Semenov A.A. Int. conf. on Nat. Prod. and Physiol. Activ Subst. Novosibirsk, 1998. P. 11.
8. *Rastitel'nye resursy SSSR: Tsvetkovye rasteniia, ikh khimicheskii sostav, ispol'zovanie; Semeistva Hydrangeaceae – Haloragaceae*. [Plant resources of the USSR: Flowering plants, their chemical composition, the use of; Families Hydrangeaceae – Haloragaceae]. Leningrad, 1987, 326 p. (in Russ.).
9. Avdeeva E.Iu., Krasnov E.A., Semenov A.A. *Vestnik Permskoi gosudarstvennoi farmatsevticheskoi akademii*, 2010, no. 7, pp. 14–16. (in Russ.).
10. Avdeeva E.Iu., Krasnov E.A., Semenov A.A., Sokolova S.N. *Novye dostizheniia v khimii i khimicheskoi tekhnologii rastitel'nogo syr'ia*. [Advances in chemistry and chemical technology of vegetable raw materials]. Barnaul, 2012, pp. 259–260. (in Russ.).
11. Avdeeva E.Iu., Krasnov E.A., Semenov A.A., Khusainova A.F. *Khimiia i farmakologiia rastitel'nykh veshchestv*. [Chemistry and Pharmacology of plant substances]. Syktyvkar, 2014, pp. 5–6. (in Russ.).
12. Safonova M.Iu., Sakanian E.I., Lesiovskaia E.E. *Rastitel'nye resursy*, 1999, vol. 35, issue 2, pp. 101–105. (in Russ.).

Received February 25, 2015

Revised Juny 20, 2015

* Corresponding author.