

Викторов Виталий Васильевич – д.м.н., зав. кафедрой факультетской педиатрии с курсами педиатрии, неонатологии и симуляционным центром ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.
Федоров Сергей Владимирович – д.м.н., профессор кафедры хирургии с курсом эндоскопии ИДПО ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450008, г. Уфа, ул. Ленина, 3.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белобородов, В.А. Абдоминальный компартмент-синдром: эпидемиология, этиология, патофизиология /В.А. Белобородов, А.А. Белобородов, Д.С. Бердников // Сибирское медицинское обозрение. – 2009. – №2(50). – С.100-104.
2. Райбужис, Е.Н. Внутривисцеральная гипертензия и абдоминальный компартмент-синдром: современные представления о диагностике и лечении / Е.Н.Райбужис [и др.] //Вестник анестезиологии и реаниматологии. – 2010. – Т.7, № 4. – С.14-21.
3. Западнюк, И.П. Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте: учебное пособие для студентов биол. спец. вузов – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев: Вища шк., 1983. – 383 с.
4. Плохинский, Н.А. Биометрия / Н.А. Плохинский. – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
5. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA/О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
6. Холлендер, М. Непараметрические методы статистики / М. Холлендер. – М.: Финансы и статистика, 1983. – 518 с.

REFERENCES

1. Beloborodov, V.A. Abdominal'nyj kompartment-sindrom: ehpidemiologiya, ehtiologiya, patofiziologiya. /V.A.Beloborodov, A.A.Beloborodov, D.S. Berdnikov // Sibirskoe medicinskoe obozrenie. – 2009-№2(50). – S.100-104. [In Russ].
2. Rajbuzhis, E.N. Vnutribryushnaya gipertenziya i abdominal'nyj kompartment-sindrom: sovremennye predstavleniya o diagnostike i lechenii / E.N.Rajbuzhis [i dr.] //Vestnik anesteziologii i reanimatologii. – 2010. – T.7. – № 4. – S.14-21. [In Russ].
3. Zapadnyuk, I.P. /Laboratornye zhivotnye: razvedenie, sodержание, ispol'zovanie v ehksperimente: uchebnoe posobie dlya studentov biol. spec. vuzov – 3-e izd., pererab. i dop. – Kiev: Vishcha shk., 1983. – 383 s. [In Russ].
4. Plohinskij, N.A. Biometriya / N.A. Plohinskij.- M.: MGU, 1970 - 367 s. [In Russ].
5. Rebrova, O.YU. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA/O.YU. Rebrova. – Moskva: MediaSfera, 2002. – 312 s. [In Russ].
6. Hollender, M. Neparаметрические методы статистики / M.Hollender.- Moskva: Finansy i statistika, 1983. – 518 s. [In Russ].

УДК 615.074; 54.062; 543.062; 543.066

© Коллектив авторов, 2019

К.И. Ровкина^{1,2}, С.В. Кривошеков¹, А.М. Гурьев¹,
 М.С. Юсубов², Е.А. Безверхняя^{1,2}, М.В. Белоусов¹

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ ЛИСТЬЕВ БЕРЕЗЫ

¹ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Томск

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский политехнический университет», г. Томск

Природные полисахариды, обладая широким спектром физиологических эффектов, могут быть перспективными лекарственными кандидатами. Предложенные государственной фармакопеей методы для определения сахаров не во всех случаях подходят для анализа сложных полимеров. Цель данной статьи – модификация антрон-серного метода для количественного определения полисахаридов листьев березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) в субстанции. Были отработаны параметры гидролиза: предложено проводить гидролиз серной кислотой на кипящей водяной бане 98% в течение 30 минут. Ввиду особенностей состава изучаемого объекта, было предложено заменить стандартное вещество на рамнозу. Для увеличения специфичности методики перед анализом раствор полисахаридов необходимо подвергать ультрафильтрации. Установлено, что методика валидна по всем исследуемым характеристикам.

Ключевые слова: полисахариды, спектрофотометрия, *Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh., валидация.

K.I. Rovkina, S.V. Krivoschekov, A.M. Guriev,
 M.S. Yusubov, E.A. Bezverkhnyaya, M.V. Belousov

DEVELOPMENT OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYSACCHARIDES OF BIRCH LEAVES

Natural polysaccharides, possessing a wide spectrum of physiological effects, can be promising drug candidates. The methods proposed by the State Pharmacopoeia for the determination of sugars are not always suitable for the analysis of complex polymers. The purpose of this article is modification of the anthrone-sulfur method for the quantitative determination of birch leaves polysaccharides (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.) in a substance. The hydrolysis parameters were tested: it was proposed to carry out hydrolysis for 30 minutes in a boiling water bath with 98% sulfuric acid. It is proposed to replace the standard substance by rhamnose, due to the nature of the composition of the object being studied. Ultrafiltration should be applied before analysis to increase the specificity of the method. It was established that the method is valid by all studied characteristics.

Key words: polysaccharides, spectrophotometry, *Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh., validation.

В последние годы интерес мирового научного сообщества обращен к растительным полисахаридам ввиду потенциала их применения, включая разработку новых лекарственных средств [1,2]. Полисахариды растительного происхождения обладают раз-

личными терапевтическими эффектами (гепатопротекторными, антиоксидантными, антимикробными, гастропротективными и антикоагулянтными) при низкой токсичности [3-8]. Тем не менее разработку и использование полисахаридных препаратов по сравнению с другими соединениями затрудняют сложные процедуры выделения, очистки, характеристики и контроля качества из-за их сложного химического состава, большого размера макромолекул и затруднённой пространственной структуры. Стандартизация фармацевтической субстанции и готовой лекарственной формы полисахаридных препаратов – одна из сложнейших задач доклинических исследований.

Группа ученых СибГМУ занимается разработкой гипополипидемического препарата на основе полисахаридов березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.). Для выбора оптимальной методики количественного определения, пригодной для использования в фармацевтическом анализе и включения в нормативную документацию на разрабатываемое лекарственное средство, проведены экспериментальные исследования, а именно, показана возможность использования спектрофотометрического метода, основанного на модифицированной фармакопейной методике определения сахаров.

Материал и методы

В качестве объекта исследования использовали воздушно-сухое сырье – листья березы (*Betula pendula* Roth., *Betula pubescens* Ehrh.), собранные в окрестностях г. Томска в июне 2017 г.

Полисахариды листьев березы (ПСfВ) выделены по известной технологии [9]. Анализ мономерного состава проводили методом газовой хроматографии ацилированных полиолов [10]. Молекулярно-массовое распределение оценивали методом эксклюзионной хроматографии [11].

Для количественного определения точную навеску (100 мг) ПСfВ переносили в мерную колбу на 100 мл, добавляли 10 мл воды очищенной и растворяли при интенсивном перемешивании, доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Аликвоту 1,0 мл помещали в пробирку Vivaspin Turbo 4 и центрифугировали 10 минут при $4,4 \times 10^3$ rpm, затем добавляли 2 мл воды и повторно центрифугировали в тех же условиях. Супернатант количественно переносили в мерную колбу на 10 мл, объем раствора доводили до метки водой (рабочий раствор ПСfВ, $C=0,1$ мг/мл).

Приготовление раствора стандартного образца (РСО) рамнозы ($C=0,03$ мг/мл): точ-

ную навеску (300 мг) РСО рамнозы помещали в мерную колбу на 100 мл, растворяли в 30 мл воды и доводили объем раствора до метки. Аликвоту 1,0 мл переносили в мерную колбу на 100 мл, доводили объем раствора до метки водой.

Результаты и обсуждение

Предлагаемые Государственной фармакопеей XIII ОФС.1.2.3.0019.15 «Определение сахаров спектрофотометрическим методом» способы количественного определения сахаров: метод определения с пикриновой кислотой и метод определения с орциновым реактивом. Эти методы не нашли применения в стандартизации субстанции ПСfВ, так как они основаны на определении только восстанавливающих сахаров (с пикриновой кислотой) или пентоз (с орциновым реактивом). Третий метод, предлагаемый фармакопейной статьёй, метод определения с антроновым реактивом также имеет недостаток: количественный расчет проводится по стандарту глюкозы, что приводит к искажению результатов анализа полисахаридов, не содержащих ее в своей структуре.

На первом этапе исследования нами подобраны условия пробоподготовки – гидролиза ПСfВ. Для одновременного проведения процессов гидролиза полисахаридной молекулы и окисления образующихся моносахаров до производных фурфурола чаще всего используют растворы серной кислоты (98–70%) [12]. На процесс гидролиза – окисления полисахаридов влияют следующие параметры: время гидролиза, концентрация гидролизующего агента и температура нагревания водяной бани. Влияние каждого параметра оценивали поэтапно.

В первую очередь определяли наиболее эффективное время гидролиза – окисления. Для этого к 3 мл раствора ПСfВ ($C=0,1$ мг/мл), охлажденного на ледяной бане, добавляли 3 мл концентрированной H_2SO_4 и нагревали на кипящей водяной бане в течение 5, 10, 20, 30, 40 и 50 минут. Растворы гидролизатов вновь охлаждали и добавляли по 3 мл 0,2 % антронового реактива. Содержимое пробирок перемешивали и медленно нагревали на кипящей водяной бане в течение 15 минут. Оптическую плотность измеряли на приборе Unicо 2800 (США) в максимуме поглощения при длине волны 625 нм.

Далее оценивали степень влияния концентрации серной кислоты (80, 90, 98 %) на процесс гидролиза – окисления при длительности инкубирования 30 минут. Концентрации ниже 80% не рассматривали в связи с вы-

падением в осадок антрона. Как видно из диаграммы (рис.1), степень гидролиза ПСfВ возрастает с увеличением концентрации серной кислоты, поэтому в методике следует использовать 98 % раствор.

Определение оптимального времени нагревания для проведения процесса гидролиза – окисления полисахаридов (ПС) показало, что при увеличении времени с 10 до 30 минут происходит увеличение поглощения испытуемого раствора до максимума при нагревании в течение 30 минут, а при увеличении времени до 40 минут происходит снижение оптической плотности испытуемого раствора, что объясняется деструкцией и озолением. Поэтому по данной методике рекомендовано использовать время нагревания 30 минут (рис. 1).

На последнем этапе нами установлена степень влияния температуры водяной бани на гидролиз ПСfВ. Изучены температуры нагревания водяной бани: 60°C, 80°C и 100°C. Полученные данные показали, что с повышением температуры степень гидролиза увеличивается, поэтому в разрабатываемой методике целесообразно использовать кипящую водяную баню.

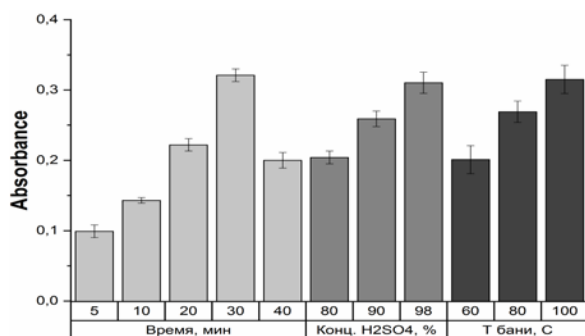


Рис. 1. Зависимость оптической плотности комплексов гидролизатов ПСfВ с антроном от времени нагревания, концентрации H_2SO_4 и температуры водяной бани



Рис. 2. Блок-схема разработанной методики количественного определения ПСfВ

Таким образом, нами разработаны оптимальные условия пробоподготовки ПСfВ для проведения количественного определения

с антроновым реактивом, алгоритм которого представлен на рис. 2.

Был проведен анализ состава ПСfВ (см. таблицу).

Таблица

Характеристика ПСfВ	
Показатель	Значение
Галактуриновая кислота, %	61,0±2,9
Рамноза, %	25,8±0,6
Арабиноза, %	1,3±0,1
Галактоза, %	7,5±0,4
Mw (средневесовая молекулярная масса), kDa	355,4
Mn (среднечисловая молекулярная масса), kDa	15,0

Нами получены электронные спектры продуктов реакции стандартов моносахаридов с антроном в разработанных условиях, входящих в состав ПСfВ. Спектры поглощения комплексов антрона с продуктами окисления рамнозы и галактозы имели максимум поглощения при длине волны 625±2 нм, что соответствует литературным данным [13,14]. Однако на спектрах галактуриновой кислоты и арабинозы отсутствовали полосы поглощения при длине волны 625±2 нм, о чем свидетельствовало отсутствие зеленой окраски растворов.

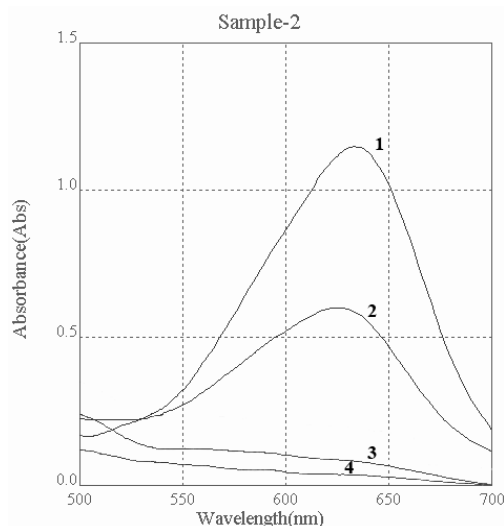


Рис. 3. Электронные спектры модельных растворов моносахаров в количестве 1 мг/мл с антроном в разработанных условиях: 1 – рамноза; 2 – галактоза; 3 – арабиноза; 4 – галактуриновая кислота

Таким образом, показана возможность использования рамнозы в качестве стандартного вещества. Для расчета содержания ПС использовали формулу:

$$X\% = \frac{m_{Rha} \times Abs_{ПСfВ} \times P \times 3}{Abs_{Rha} \times m_{ПСfВ}}$$

где X% – содержание ПСfВ в субстанции, m_{Rha} – масса навески стандарта рамнозы; $Abs_{ПСfВ}$ – оптическая плотность испытуемого раствора; P – содержание основного вещества в стандарте рамнозы; 3 – коэффициент пересчета на рамнозу; Abs_{Rha} – оптическая плот-

ность стандартного раствора; $m_{\text{ПСfВ}}$ – масса навески ПСfВ.

Заключение

Нами разработана методика количественного определения ПСfВ на основе фармакопейной методики. Для дальнейшего ис-

пользования данной методики необходимо проведение ее валидации.

Работа выполнена при финансовой поддержке ГК от 28 апреля 2017 г. № 14.N08.11.0132.

Сведения об авторах статьи:

Ровкина Ксения Игоревна – аспирант Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО НИ ТПУ. Адрес: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30. E-mail: rki91@bk.ru.

Кривошеков Сергей Владимирович – м.н.с. ЦНИЛ ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: ksv_tsu@mail.ru

Гурьев Артем Михайлович – д.фарм.н., руководитель Центра внедрения технологий ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: titan-m@mail.ru.

Юсубов Мехман Сулейман оглы – д.х.н., директор Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО НИ ТПУ. Адрес: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30. E-mail: yusubov@mail.ru.

Безверхняя Екатерина Александровна – аспирант Исследовательской школы химических и биомедицинских технологий ФГАОУ ВО НИ ТПУ. Адрес: 634050, г. Томск, пр. Ленина, 30. E-mail: katty_delicious@mail.ru.

Белоусов Михаил Валерьевич – д.фарм.н., зав. кафедрой фармацевтического анализа ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России. Адрес: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2. E-mail: mvb63@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yapo, B.M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model / B.M. Yapo // J. Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86, № 2. – P. 373-385.
2. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review / Y. Yu [et al.] // J. Carbohydrate polymers. – 2018. – Vol. 183. – P. 91-101.
3. Partain E.M. Industrially important polysaccharides / E.M. Partain // Applied Polymer Science: 21st Century. – Pergamon, 2000. – P. 303-323.
4. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii* / J. Chen [et al.] // J. Food chemistry. – 2012. – Vol. 130, № 3. – P. 687-694.
5. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Calocybe indica* var. APK2 / S. Govindan [et al.] // J. Experimental and Toxicologic Pathology. – 2016. – Vol. 68, № 6. – P. 329-334.
6. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) / P. T. A. N. Kungel [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 114. – P. 1161-1167.
7. Gastroprotective activity of a pectic polysaccharide fraction obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves / A. F. de Oliveira [et al.] // J. Phytomedicine. – 2018. – Vol. 41. – P. 7-12.
8. Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented *Sargassum* sp. / P. Shobharani [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – Vol. 65. – P. 542-548.
9. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (rosaceae) из флоры республики Башкортостан / Хасанова С.Р. [и др.] // Растительные ресурсы – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 397-406.
10. Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities / S. V. Popov [et al.] // J. Food chemistry. – 2014. – Vol. 143. – P. 106-113.
11. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai / K. I. Rovkina [et al.] // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2018. – Vol. 44, № 7. – P. 854-859.
12. Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid / K. Nagasawa [et al.] // J. Carbohydrate Research. – 1971. – Vol. 18, № 1. – P. 95-102.
13. Bailey, R.W. The reaction of pentoses with anthrone / R.W. Bailey // Biochem. J. – 1958. – Vol. 68, № 4. – P. 669-672.
14. Sondergaard, G. Micro-method for determination of blood galactose by means of glucose oxidase (notatin) and anthrone / G. Sondergaard // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1958. – Vol. 10, № 2. – P. 203-210.

REFERENCES

1. Yapo, B.M. Pectic substances: From simple pectic polysaccharides to complex pectins—A new hypothetical model / B.M. Yapo // J. Carbohydrate Polymers. – 2011. – Vol. 86, № 2. – P. 373-385.
2. Biological activities and pharmaceutical applications of polysaccharide from natural resources: A review / Y. Yu [et al.] // J. Carbohydrate polymers. – 2018. – Vol. 183. – P. 91-101.
3. Partain E.M. Industrially important polysaccharides / E.M. Partain // Applied Polymer Science: 21st Century. – Pergamon, 2000. – P. 303-323.
4. Hepatoprotective and hypolipidemic effects of water-soluble polysaccharidic extract of *Pleurotus eryngii* / J. Chen [et al.] // J. Food chemistry. – 2012. – Vol. 130, № 3. – P. 687-694.
5. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Calocybe indica* var. APK2 / S. Govindan [et al.] // J. Experimental and Toxicologic Pathology. – 2016. – Vol. 68, № 6. – P. 329-334.
6. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*) / P. T. A. N. Kungel [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2018. – Vol. 114. – P. 1161-1167.
7. Gastroprotective activity of a pectic polysaccharide fraction obtained from infusion of *Sedum dendroideum* leaves / A.F. de Oliveira [et al.] // J. Phytomedicine. – 2018. – Vol. 41. – P. 7-12.
8. Antioxidant and anticoagulant activity of polyphenol and polysaccharides from fermented *Sargassum* sp. / P. Shobharani [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2014. – Vol. 65. – P. 542-548.
9. Компонентный состав полисахаридного комплекса листьев *Crataegus sanguinea* (rosaceae) из флоры республики Башкортостан / Хасанова С.Р. [и др.] // Растительные ресурсы – 2015. – Т. 51, № 3. – С. 397-406.
10. Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities / S. V. Popov [et al.] // J. Food chemistry. – 2014. – Vol. 143. – P. 106-113.
11. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai / K. I. Rovkina [et al.] // Russ. J. Bioorg. Chem. – 2018. – Vol. 44, № 7. – P. 854-859.
12. Reaction between carbohydrates and sulfuric acid: Part I. Depolymerization and sulfation of polysaccharides by sulfuric acid / K. Nagasawa [et al.] // J. Carbohydrate Research. – 1971. – Vol. 18, № 1. – P. 95-102.
13. Bailey, R.W. The reaction of pentoses with anthrone / R.W. Bailey // Biochem. J. – 1958. – Vol. 68, № 4. – P. 669-672.
14. Sondergaard, G. Micro-method for determination of blood galactose by means of glucose oxidase (notatin) and anthrone / G. Sondergaard // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 1958. – Vol. 10, № 2. – P. 203-210.