

# Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой

В.Н. Бубенчикова, И.В. Степнова, М.С. Шкабунова

Курский государственный медицинский университет,  
Российская Федерация, 305041, Курск, ул. К. Маркса, д. 3

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Бубенчикова Валентина Николаевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники Курского государственного медицинского университета. Тел.: +7 (4712) 58-07-39. E-mail: bubenjikova.ksmu@yandex.ru

**Степнова Ирина Владимировна** – заочный аспирант кафедры фармакогнозии и ботаники, Курский государственный медицинский университет. Генеральный директор испытательного центра «Фармоборона», Москва. Тел.: +7 (905) 042-20-32. E-mail: leader@farmoborona.ru

**Шкабунова Марина Сергеевна** – студентка 4 курса Курского государственного медицинского университета. Тел.: +7 (908) 121-50-04. E-mail: bubenjikova.ksmu@yandex.ru

**Введение.** Горлюха ястребинковая (*Picris hieracioides* L.) семейства астровых (*Asteraceae*) – широко распространена в средней полосе Европейской части России. Одной из групп действующих веществ горлюхи ястребинковой являются полисахариды, что требует разработки методики количественного определения полисахаридов для стандартизации сырья.

**Цель исследования** – разработка методики гравиметрического определения полисахаридов и проведение валидации методики.

**Материал и методы.** Объект исследования – трава горлюхи ястребинковой, заготовленная в 2015–2017 гг. в фазу цветения растений в областях Центрального Черноземья. В основу метода количественного определения полисахаридов положен гравиметрический метод.

**Результаты.** Изучены оптимальные условия экстракции и осаждения полисахаридов: степень измельчения сырья – 2 мм, время экстрагирования – 120 мин (4 раза по 30 мин), соотношение водного извлечения и спирта этилового 96% – 1:3. Проведена валидация разработанной методики. Суммарное содержание полисахаридов в исследуемых образцах колебалось от 7,81 до 10,77%.

**Заключение.** Разработана методика гравиметрического определения суммы полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой. Методика валидирована по показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость.

**Ключевые слова:** горлюха ястребинковая, *Picris hieracioides* L., трава, полисахариды, гравиметрия, валидация.

**Для цитирования:** Бубенчикова В.Н., Степнова И.В., Шкабунова М.В. Разработка методики количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой. Фармация, 2018; 67 (5): 19–23. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-04>.

## DEVELOPMENT OF A PROCEDURE FOR QUANTIFICATION OF POLYSACCHARIDES IN HAWKWEED OXTONGUE (*PICRIS HIERACIOIDES*) HERB

V.N. Bubenchikova, I.V. Stepnova, M.S. Shkabunova

Kursk State Medical University; 3, K. Marx St., Kursk 305041, Russian Federation

## INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Bubenchikova Valentina N.** – Doctor of Pharmacy, professor, head of the Chair of Pharmacognosy and Botany Kursk State Medical University. Tel.: +7 (4712) 58-07-39. E-mail: bubenjikova.ksmu@yandex.ru

**Stepnova Irina V.** – Post-graduate student of the Chair of Pharmacognosy and Botany Kursk State Medical University, Testing laboratory director of centre "Farmoborona", Moscow. Tel.: +7 (905) 042-20-32. E-mail: leader@farmoborona.ru

**Shkabunova M.S.** – 4th year student of the Kursk State Medical University. Tel.: +7 (908) 121-50-04. E-mail: bubenjikova.ksmu@yandex.ru

## SUMMARY

**Introduction.** Hawkweed oxtongue (*Picris hieracioides* L.) in the Aster family (*Asteraceae*) is widespread in the middle belt of the European part of Russia. One of the groups of the active substances of hawkweed oxtongue is polysaccharides, which requires the development of a procedure for their quantification for the standardization of raw materials.

**Objective:** to develop a procedure for gravimetric determination of polysaccharides and to validate the procedure.

**Material and methods.** The investigation object was the herb of hawkweed oxtongue stored in its flowering period in the Central Black Earth regions in 2015–2017. The basis for quantification of polysaccharides is a gravimetric method.

**Results.** The optimal extraction and precipitation conditions for polysaccharides were studied: these were as follows: the fineness of raw material grinding was 2 mm; extraction time was 120 min (four times for 30 min for each step); the ratio of water extraction to 96% ethyl alcohol was 1:3. The developed procedure was validated. The total content of polysaccharides in the examined samples ranged from 7.81 to 10.77%.

**Conclusion.** The procedure has been developed for gravimetric determination of the amount of polysaccharides in the hawkweed oxtongue herb and validated by the following parameters: linearity, repeatability, and reproducibility.

**Key words:** hawkweed oxtongue, *Picris hieracioides* L., herb, polysaccharides, gravimetry, validation.

**For citation:** Bubenikovich V.N., Stepnova I.V., Shkabunova M.S. Development of a procedure for quantification of polysaccharides in hawkweed oxtongue (*Picris hieracioides*) herb. Farmatsiya (Pharmacy), 67 (5): 19–23. <https://doi.org/10.29296/25419218-2018-05-04>.

## Введение

Горлюха ястребинковая (*Picris hieracioides* L.) представляет собой двулетнее, иногда многолетнее травянистое растение семейства астровых (*Asteraceae*), широко распространенное в средней полосе Европейской части России. Горлюха ястребинковая применяется в народной медицине в качестве слабительного, диуретического, желчегонного, обезболивающего, мягчительного средства. При фармакологическом изучении была установлена антиоксидантная активность спиртового экстракта из плодов и водно-спиртового экстракта из надземной части растения. Наряду с этим трава горлюхи ястребинковой проявляет антибактериальную, противовоспалительную и цитотоксическую активность [1, 2].

Ранее нами были изучены полисахариды травы горлюхи ястребинковой. Оказалось, что растение может быть источником водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ [3]. Для полисахаридов характерно наличие отхаркивающих, противовоспалительных, обволакивающих, мягчительных, антиоксидантных, гепатопротекторных свойств [4–7]. В литературе имеются данные о способности полисахаридов повышать работоспособность, а также об их иммуномодулирующей и противоопухолевой активности [8, 9]. Следовательно, полисахариды как одна из групп действующих веществ горлюхи ястребинковой могут оказывать противовоспалительное, противоопухолевое, антиоксидантное действие.

Цель работы – разработка методики количественного определения полисахаридов для травы горлюхи ястребинковой с целью стандартизации ее сырья и проведения ее валидации.

## Материал и методы

Объект исследования – трава горлюхи ястребинковой, заготовленная в фазу цветения в областях Центрального Черноземья в 2015–2017 гг.

Для анализа полисахаридов в лекарственном растительном сырье (ЛРС) наиболее доступным и часто применяемым является гравиметрический метод, в основе которого лежит экстракция полисахаридов из сырья водой очищенной, с дальнейшим их осаждением спиртом этиловым 96% [10, 11]. В процессе разработки методики были изучены стадии извлечения полисахаридов из сырья, а также условия их осаждения. Валидация методики проводилась по показателям: линейность, воспроизводимость, повторяемость [11, 12].

Статистическую обработку полученных результатов проводили согласно требованиям Государственной Фармакопеи XIII издания (ГФ РФ XIII) с использованием t-критерия Стьюдента [11] и программы Microsoft Excel 2010.

## Результаты и обсуждение

На 1-м этапе исследований изучали влияние дисперсности сырья и времени экстракции на полноту экстрагирования полисахаридов из травы горлюхи ястребинковой. Экстрагентом для выделения полисахаридов служила вода очищенная.

Для изучения влияния дисперсности сырья траву горлюхи ястребинковой с влажностью 13% измельчали до размера частиц 1, 2, 3 мм. Установлено, что наибольший переход полисахаридов в воду наблюдается при измельчении сырья до 2 мм (табл. 1). Для экстрагирования полисахаридов из растительного сырья использовали многократную экстракцию до полного извлечения полисахаридов. Максимальное количество полисахаридов извлекается при применении 4-кратной экстракции сырья водой очищенной в течение 120 мин (4 раза по 30 мин) при соотношении сырье–экстрагент (1:10).

Дальнейшие исследования показали, что при соотношении водного извлечения и спирта этилового 96% (1:3) наблюдается наиболее полное осаждение полисахаридов (см. табл. 1).

Полученные данные позволили разработать методику количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой.

**Методика количественного определения полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой.** Точную навеску (около 5,0 г) измельченного сырья, просеянного сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, помещают в колбу объемом 250 мл, приливают 100 мл воды очищенной, колбу вместе с содержимым, соединенную с обратным холодильником, нагревают в течение 30 мин при периодическом перемешивании. Извлечение полисахаридов проводят еще 3 раза в тех же условиях, каждый раз приливая по 100 мл воды очищенной. Все полученные водные извлечения объединяли.

Объединенные извлечения в течение 10 мин центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин. Затем извлечение фильтруют в мерную колбу вместимостью 250 мл через 5 слоев, предварительно смоченной водой очищенной марли, помещенной в стеклянную воронку. Фильтр промывают водой очищенной и доводят объем извлечения водой до 500 мл (раствор А).

25 мл полученного извлечения (раствор А) помещают в центрифужную пробирку и приливают к нему 75 мл спирта этилового 96% для осаждения полисахаридов. Полученную смесь перемешивают и выдерживают 5 мин при температуре 60°C на водяной бане. Через 60 мин содержимое пробирки в течение 30 мин центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин.

Надосадочную жидкость вначале фильтруют при пониженном давлении (13–16 кПа) через стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм, высушенный в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 100–105°C. Затем на этот же фильтр количественно переносят полученный после центрифугирования осадок и промывают его 15 мл смеси спирта этилового 96% и воды очищенной (4:1). Осадок на фильтре высушивают сначала на воздухе, затем – в сушильном шкафу при температуре 100–105°C до постоянной массы.

Содержание полисахаридов (X) в процентах в пересчете на абсолютно сухое сырье вычислили по формуле:

$$X = \frac{(m_1 - m_2) \cdot 250 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - w)},$$

где  $m_1$  – масса высушенного фильтра, г;  $m_2$  – масса высушенного фильтра с осадком, г;  $m$  – навеска сырья, г;  $w$  – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Разработанную методику количественного определения полисахаридов валидировали по следующим характеристикам: установление диапазона использования методики, повторяемость и воспроизводимость.

Диапазон использования методики устанавливали на извлечениях различной концентрации. С этой целью готовили извлечения из навесок сырья горлюхи ястребинковой массой 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 10,0 г и определяли в них содержание полисахаридов по разработанной методике. По полученным результатам строили градуированный график, который показал, что содержание суммы полисахаридов в зависимости от массы навески сырья имеет линейный характер (см. рисунок, табл. 2).

Повторяемости определяли на 6 параллельных определениях, при этом вычисляли величину стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения ( $E_{отн}$ ). Величина относительного стандартного отклонения составила 2,69% (не более 10%), что говорит о прецизионности разработанной методики в условиях повторяемости (табл. 3).

Таблица 1

**Условия экстрагирования и осаждения полисахаридов из травы горлюхи ястребинковой**

Условия экстрагирования и осаждения		Содержание полисахаридов, %
<i>Условия экстрагирования</i>		
Измельченность сырья, мм	1,0	6,04±0,17
	2,0	8,97±0,37
	3,0	5,67±0,25
Время экстрагирования, мин	30	2,62±0,10
	60 (2×30)	6,05±0,13
	90 (3×30)	8,06±0,17
	120 (4×30)	8,94±0,20
	150 (5×30)	8,58±0,23
<i>Условия осаждения</i>		
Соотношение водного извлечения и спирта этилового 96%	1:1	5,01±0,14
	1:2	7,12±0,21
	1:3	8,61±0,32
	1:4	8,77±0,35

Примечание. Экстрагент – вода очищенная.

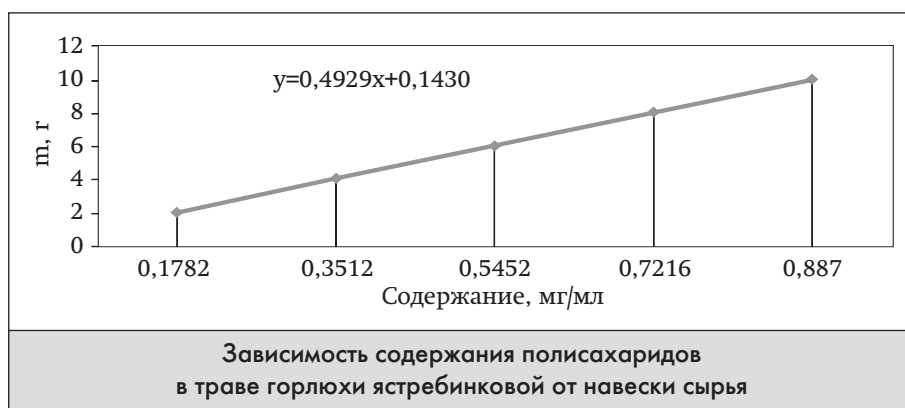


Таблица 2

**Результаты расчета коэффициента корреляции**

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	B	a	R
4	0,53664	0,4075	0,49291942	0,14298	0,99788

Таблица 3

**Результаты определения повторяемости методики количественного определения полисахаридов в траве горюхи ястребинковой**

Повторяемость	Содержание полисахаридов, %	Метрологические характеристики
1	9,01	$X_{cp} = 8,92$ $S_x^2 = 0,00894$ $S_{xcp} = 0,094552$ $\Delta x = 0,24$ $E_{отн} = 2,69$ $X_{cp} + \Delta x_{cp} = 8,92 \pm 0,24$
2	8,93	
3	8,96	
4	8,92	
5	8,74	
6	8,97	

Таблица 4

**Определение воспроизводимости методики количественного определения полисахаридов в траве горюхи ястребинковой**

Повторяемость	Аналитик	Содержание суммы полисахаридов в траве горюхи ястребинковой, %		
		образец 1	образец 2	образец 3
1	1	8,85	10,65	9,28
2		9,03	10,40	9,30
3		8,73	10,86	9,54
4	2	8,95	11,23	9,35
5		9,20	10,71	9,71
6		8,98	10,75	9,02
Среднее значение		8,96	10,77	9,37
Погрешность измерения ( $\Delta x$ )		$\pm 0,41$	$\pm 0,70$	$\pm 0,61$
Относительное стандартное отклонение, (RSD)		4,58	6,50	6,51

Воспроизводимость устанавливали 2 аналитиками, каждый исследовал 3 образца сырья, причем каждый образец в 3 повторностях. Величина относительного стандартного отклонения не превышала 6,51, что свидетельствует о том, что методика является прецизионной в условиях воспроизводимости (табл. 4).

По разработанной методике было определено содержание полисахаридов в траве горюхи ястребинковой, заготовленной в различных местах произрастания в течение 2015–2017 гг. (табл. 5). Оно колебалось от 7,81 до 10,77%. На основании этих данных предложена норма содержания суммы полисахаридов в сырье – не менее 7,0%. Ошибка метода количественного определения суммы полисахаридов с 95% вероятностью не превышает 3,90%.

**Заключение**

Разработана методика гравиметрического определения суммы полисахаридов в траве горюхи ястребинковой. Установлены оптимальные параметры экстракции и осаждения полисахаридов: диаметр частиц сырья – 2 мм, время экстракции – 120 мин; соотношение водного извлечения и спирта этилового 96% – 1:3. Методика валидирована по показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость.

**Конфликт интересов**

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest.

**Содержание полисахаридов в траве горлюхи ястребинковой (n=5; p=95%)**

Место и дата сбора сырья	Метрологическая характеристика методики				
	X, %	S <sup>2</sup>	S	ΔX	E <sub>отн</sub> , %
Курская область, Курский р-н, 2015 г.	8,96	0,01387	0,11777	0,33	3,68
Орловская область, Мценский р-н, 2016 г.	10,77	0,02265	0,1505	0,42	3,90
Белгородская область, Красногвардейский р-н, 2016 г.	9,37	0,01118	0,10574	0,29	3,09
Курская область, Курский р-н, 2017 г.	7,81	0,01075	0,10368	0,29	2,29
Белгородская область, Красногвардейский р-н, 2017 г.	8,72	0,0079	0,08888	0,25	2,87

**Литература**

**References**

1. Махлаук В.П. Лекарственные растения в народной медицине. Саратов: Приволжское книжное изд-во, 1993; 544.
2. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Т. 5. Семейство *Asteraceae* (*Compositae*). Часть 2. Роды *Echinops* – *Youngia* (отв. ред. А.Л. Буданцева). СПб.; М.: КМК, 2013; 312.
3. Бубенчикова В.Н., Степнова И.В., Воробьева Е.А. Изучение веществ первичного биосинтеза горлюхи ястребинковой (*Picris hieracioides* L.). Медицинский вестник Башкортостана, 2016; т. 11, 5 (65): 67–70.
4. Бубенчикова В.Н., Азарова А.В. Состав и отхаркивающая активность водорастворимых полисахаридных комплексов девясила иволистного. Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки, 2011; 9 (104), вып. 15/2: 188–90.
5. Лесиовская Е.Е., Пастушенков Л.В. Фармакотерапия с основами фитотерапии. М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003; 592.
6. Пилат Т.Л., Иванов А.А. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение). М.: Аввалон, 2002; 710.
7. Муравьева Т.И. Фармакосанирующие эффекты полисахаридов растительного происхождения. Автореф. дис. канд. мед. наук. Владивосток, 1999; 24.
8. Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Макаренко О.А. Получение высокочистого арабиногалактана лиственницы и исследование его иммуномодулирующих свойств. Химия растительного сырья, 2004; 4: 17–23.
9. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц. и др. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств. Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация, 2005; 1: 212–21.
10. Бубенчикова В.Н., Старчак Ю.А. Фенольные соединения и полисахариды подмаренника цепкого (*Galium aparine* L.). Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2008; 3: 117–21.
11. Государственная фармакопея РФ XIII издание. Том 3. [Электронное издание]. Режим доступа: <http://femb.ru/feml>
12. Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2 (R1). Фармация, 2008; 4: 3–10.

1. Makhlayuk V.P. Medicinal plants in folk medicine. Saratov: Privolzh. book. publishing house, 1993; 544 (in Russian).
2. Vegetable resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. T. 5. Family *Asteraceae* (*Compositae*). Part 2. Genera *Echinops* – *Youngia* (ed. by A.L. Budantsev). St. Petersburg; Moscow: KMK, 2013; 312 (in Russian).
3. Bubenchikova V.N., Stepnova I.V., Vorobyeva E.A. The study of the substances of the primary biosynthesis of hawks of yastrebic (*Picris hieracioides* L.). Meditsinskiy vestnik Bashkortostana, 2016; т. 11, 5 (65): 67–70 (in Russian).
4. Bubenchikova V.N., Azarova A.V. Composition and expectorant activity of water-soluble polysaccharide complexes *Inula salicina*. Nauchnye vedomosti BelGU. Seriy: Estestvennye nauki, 2011; 9 (104), Issue 15/2: 188–90 (in Russian).
5. Lesiovskaya E.E., Pastushenkov L.V. Pharmacotherapy with the basics of phytotherapy. Moscow: GEOTAR-MED, 2003; 592 (in Russian).
6. Pilat T.L., Ivanov A.A. Biologically active food additives (theory, production, application). Moscow: Avvalon, 2002; 710 (in Russian).
7. Muraveva T.I. Farmakosaniiruyuschie effects polysaccharides of plant origin. Author's abstract. Dis. Cand. Med. Science. Vladivostok, 1999; 24 (in Russian).
8. Medvedeva E.N., Babkin V.A., Makarenko O.A. Production of high-purity arabinogalactan of larch and investigation of its immunomodulating properties. Khimiya rastitel'nogo syr'ya, 2004; 4: 17–23 (in Russian).
9. Krishtanova N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.Ts. et al. Prospects for the use of plant polysaccharides as therapeutic and therapeutic-prophylactic agents. Vestnik VGU. Seriy: Khimiya. Biologiy. Farmatsiya, 2005; 1: 212–21 (in Russian).
10. Bubenchikova V.N., Starchak Yu.A. Phenolic compounds and polysaccharides of the *Galium aparine* (*Galium aparine* L.). Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorov'e», 2008; 3: 117–21 (in Russian).
11. The State Pharmacopoeia of The Russian Federation, XIII-ed. Volume 3. [Electronic resource]. Access mode: <http://femb.ru/feml> (in Russian).
12. Manual ICH «Validation of analytical techniques. Contents and methodology» Q2 (R1). Farmatsiya, 2008; 4: 3–10 (in Russian).

Поступила 25 апреля 2018 г.