

Определение усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ-УФ

А.В. Никулин¹, С.И. Ямщикова², О.Г. Потанина¹, Р.А. Абрамович¹

¹Российский университет дружбы народов,

Центр коллективного пользования (Научный образовательный центр),

Российская Федерация, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6;

²Северо-Восточный федеральный университет им. М.К. Аммосова, Медицинский институт,

Российская Федерация, 677000, Якутск, ул. Ойунского, д. 27

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Никулин Александр Владимирович – заведующий лабораторией физико-химических методов исследований Центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (Научно-образовательного центра) Российского университета дружбы народов (ЦКП (НОЦ) РУДН), кандидат химических наук. Тел.: +7 (916) 019-77-05. E-mail: r251@yandex.ru. *ORCID: 0000-0002-8490-444X*

Ямщикова Саргылана Ивановна – аспирант ЦКП (НОЦ) РУДН, ассистент кафедры фармакологии и фармации Медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова. Тел. +7 (914) 223-83-82. E-mail: sssontoeva@gmail.ru. *ORCID: 0000-0001-7970-0816*

Потанина Ольга Георгиевна – заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (967) 140-78-77, E-mail: microly@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-0284-419X*

Абрамович Римма Александровна – заведующая кафедрой технологии получения лекарств и организации фармацевтического дела факультета повышения квалификации медицинских работников, директор ЦКП (НОЦ) РУДН, доктор фармацевтических наук. Тел.: +7 (916) 694-50-49. E-mail: abr-rimma@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

Введение. Ягель, представляющий собой совокупность лишайников рода *Cladonia*, содержит биологически активные вещества (лишайниковые кислоты, фенольные соединения и др.), обладающие антибактериальными и противовирусными свойствами. Натриевые соли усниновой кислоты давно используются в фармацевтической практике. Для определения усниновой кислоты в растительном материале используются различные методы: тонкослойная хроматография (ТСХ), твердофазный иммунофлюоресцентный анализ (ИФА), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) с масс-спектрометрией (МС) и др. Ягель не является официальным сырьем и оценка его по содержанию усниновой кислоты отсутствует.

Цель исследования – разработка и валидация методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia*.

Материал и методы. Объектом изучения были образцы слоевищ ягеля, собранные в Республике Саха (Якутия). Усниновую кислоту определяли методом ВЭЖХ/УФ.

Результаты. Разработана и валидирована методика количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ с ошибкой определения $\pm 4,47\%$.

Заключение. Показана перспективность разработанной методики для анализа субстанции растительного происхождения на содержание усниновой кислоты. С ее помощью установлено, что содержание усниновой кислоты в слоевищах ягеля, произрастающего в разных районах Якутии колеблется от 0,88 до 1,02%.

Ключевые слова: усниновая кислота, слоевища лишайника рода *Cladonia*, количественное определение, ВЭЖХ-УФ.

Для цитирования: Никулин А.В., Ямщикова С.И., Потанина О.Г., Абрамович Р.А. Определение усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ-УФ. Фармация, 2020; 69 (3): 44–49. <https://doi.org/10/29296/25419218-2020-03-06>

DETERMINATION OF USNIC ACID IN THE BLASTEMAS OF A LICHEN OF THE GENUS *CLADONIA* BY HPLC/UV

A.V. Nikulin¹, S.I. Yamshchikova², O.G. Potanina¹, R.A. Abramovich¹

¹Collective Usage Center (Research Educational Center), People's Friendship University of Russia; 6, Miklukho-Maklai St., Moscow 117198, Russian Federation

²Medical Institute, M.K. Ammosov North-Eastern Federal University; 27, Oiunsky St., Moscow 677000, Russian Federation

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Nikulin Alexander Vladimirovich – Head of the Laboratory of physicochemical method of the Shared Research and Education Center of the Peoples' friendship university of Russia (PFUR), PhD (Chem.). Tel.: +7 (916) 019-77-05. E-mail: r251@yandex.ru. *ORCID: 0000-0002-8490-444X*

Yamshchikova Sargylana Ivanovna – postgraduate student of the Shared Research and Education Center of the Peoples' friendship university of (PFUR), assistant of department of pharmacology and pharmacy of Medical institute of North-Eastern Federal University of M.K. Ammosov. Tel.: +7 (914) 223-83-82. E-mail: ssontoeva@gmail.ru. *ORCID: 0000-0001-7970-0816*

Potanina Olga Georgievna – Head of the pharmaceutical chemistry and pharmacognosy chair, Director of the Research and Development department of the Shared Research and Education Center of the PFUR, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (967) 140-78-77. E-mail: microlly@mail.ru. *ORCID: 0000-0002-0284-419X*

Abramovich Rimma Aleksandrovna – Head of drugs technology and pharmacy management chair of Advanced Training Faculty of medical employee, Director Shared Research and Educational Center of the PFUR, Doctor of Pharmaceutical Sciences. Tel.: +7 (916) 694-50-49. E-mail: abr-rimma@yandex.ru

SUMMARY

Introduction. Cup moss that is a combination of lichens of the genus *Cladonia* contains biologically active substances (usnic acids, phenolic compounds, etc.) that have antibacterial and antiviral properties. The sodium salts of usnic acid have long been used in pharmaceutical practice. Various methods (TLC, ELISA, HPLC/MS, etc.) are used to determine usnic acid in plant materials. Cup moss is not an officinal raw material and its estimation by the content of usnic acid is absent.

Objective: to develop and validate a procedure for the quantitative determination of usnic acid in the blastemas of the lichen of the genus *Cladonia*.

Material and methods. The investigation object was cup moss samples collected in the Republic of Sakha (Yakutia). Usnic acid was determined by HPLC-UV.

Results. A procedure for the quantitative determination of usnic acid in the blastemas of the lichen of the genus *Cladonia* was developed and validated by HPLC with a measurement error of $\pm 4.47\%$.

Conclusion. The developed method was shown to be promising in analyzing the plant substance for the levels of usnic acid. With its usage, it was found that the content of usnic acid in the blastemas of the cup moss growing in different regions of Yakutia ranges from 0.88 to 1.02%.

Key words: usnic acid, blastemas of the lichen of genus *Cladonia*, quantification, HPLC-UV.

For reference: Nikulin A.V., Yamshchikova S.I., Potanina O.G., Abramovich R.A. Determination of usnic acid in the blastemas of a lichen of the genus *Cladonia* by HPLC-UV. *Farmatsiya*, 2020; 69 (3): 44–49. <https://doi.org/10.29296/25419218-2020-03-06>

Введение

Одним из растений, о лекарственных свойствах которого издавна известно на Севере, является ягель, представляющий собой совокупность лишайников рода *Cladonia*. В слоевищах ягеля обнаружены полисахариды, фенольные вещества, лишайниковые кислоты – усниновая, леканоровая, перлатолиевая и др. [1, 2]. Доказано, что усниновая кислота обладает высокими антибактериальными, противотуберкулезными, противовирусными свойствами [3]. Натриевые соли усниновой кислоты давно используются в фармацевтической практике. Так, в Российской Федерации известен препарат «Бинан». Ввиду постоянно растущей антибиотикорезистентности особенно актуальна разработка новых лекарственных средств (ЛС) на основе субстанций природного происхождения, содержащих антибактериальные компоненты.

Ягель не является фармакопейным сырьем. В настоящее время нет удовлетворительной методики, разработанной с учетом современных возможностей аналитической химии, пригодной для количественного определения и последующей стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Для определения усниновой кислоты в растительном материале используются: для качествен-

ного анализа – тонкослойной хроматографии (ТСХ) в слое микрокристаллической целлюлозы в системе растворителей н-бутанол–уксусная кислота–вода [4–6], для количественного иммуноферментного анализа путем конъюгации альбумина саналитом в условиях формальдегидной конденсации [7] и др. Усниновую кислоту определяют также методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ. Для анализа лишайниковых метаболитов в качестве подвижных фаз применяли муравьиную кислоту и метиловый спирт [8]. Однако данная методика имеет ряд существенных недостатков, в частности, метиловый спирт в фармацевтической практике нежелательно применять в качестве экстрагента из-за фармакологической неиндифферентности, подвижные фазы сложны по составу, а использовать такое оборудование, как ультра-ВЭЖХ-МС, слишком дорого для рутинных анализов. В литературе есть описание ВЭЖХ-методики, позволяющей ла достигнуть хорошего разрешения между аналитами, но она была апробирована только на модельных смесях лишайниковых веществ [9].

Цель данной работы – разработка и валидация методики количественного определения усниновой кислоты методом ВЭЖХ-УФ в слоевищах лишайника рода *Cladonia* и оценка ее основных метрологических характеристик.

Материал и методы

Объект исследования – образцы слоевищ ягеля, собранные в Республике Саха (Якутия) летом 2016 г. При разработке методики количественного определения усниновой кислоты опирались на данные G.B. Feige. и H.T. Lumbsch [9], которые подобрали условия хроматографического разделения лишайниковых кислот. Усниновую кислоту определяли с помощью хроматографа Varian Pro Star, колонка Phenomenex Luna 5μ C18(2), 250×4,6 мм, подвижные фазы – ПФ А: 1% раствор ортофосфорной кислоты; ПФ В: метиловый спирт; скорость потока элюента – 0,7 мл/мин; температура колонки – 40°C; детектор – УФ (длина волны – 285 нм); объем аликвоты – 20 мкл; время хроматографирования – 80 мин. Хроматографический градиент представлен в табл. 1.

Результаты и обсуждение

В ходе изучения влияния различных факторов на полноту извлечения усниновой кислоты из слоевищ *Cladonia* (табл. 2) установлено, что наилучшее извлечение усниновой кислоты достигается при степени измельчения субстанции растительного происхождения 0,5 мм, концентрации этилового спирта в экстрагенте 70%, соотношении сырье–экстрагент 1:100, времени экстракции 30 мин, кратности экстракции 2.

На основании полученных данных была разработана методика

количественного определения усниновой кислоты в слоевищах *Cladonia*:

- Раствор СО усниновой кислоты. Около 0,01 г (точная навеска) СО усниновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 15 мл метилового спирта, нагревают до растворения, охлаждают, объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают.
- 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, объем раствора доводят метиловым спиртом до метки, перемешивают, фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор – 0,45 мкм) в вialу, отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата.

Таблица 2

Влияние параметров экстракции на полноту извлечения усниновой кислоты из сырья *Cladonia* (n=3; p=0,95)

Table 2

Impact of extraction parameters on the completeness of usnic acid extraction from *Cladonia* raw materials (n=3; p=0.95)

Концентрация этилового спирта	Измельченность сырья, мм	Соотношение сырье : экстрагент	Время экстракции, мин	Содержание усниновой кислоты, %
20	0,5	1:100	60	0,13±0,01
40				0,47±0,02
70				0,87±0,02
90				0,42±0,02
40	0,5	1:100	60	0,46±0,02
	1			0,37±0,03
	2			0,36±0,03
	3			0,28±0,02
	5			0,20±0,02
	7			0,21±0,03
70	0,5	1:50	60	0,43±0,02
		1:100		0,50±0,02
		1:200		0,13±0,03
		1:250		0,08±0,02
70	0,5	1:100	30	0,45±0,03
			60	0,41±0,02
			90	0,39±0,01
			120	0,39±0,02
70	0,5	1:100	30	0,45±0,03
			30	0,49±0,01
			30	0,50±0,01

Таблица 1

Хроматографический градиент методики

Table 1

Chromatography gradient in the procedure

Время, мин	ПФ А, %	ПФ В, %
0	70	30
1	70	30
15	30	70
45	0	100
63	70	30
80	70	30

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 40 мл этилового спирта 70%, присоединяют к обратному холодильнику и кипятят в течение 30 мин на водяной бане. Извлечение охлаждают, фильтруют через 5 слоев марли в мерную колбу вместимостью 100 мл, процедуру экстракции повторяют. Полученные извлечения объединяют. Объем раствора доводят этиловым спиртом 70% до метки, перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А помешают в мерную колбу вместимостью 10 мл, объем раствора доводят этиловым спиртом до метки, перемешивают (раствор Б). Раствор Б фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор – 0,45 мкм) в виалу, отбрасывая первые 1–2 мл фильтрата.

Последовательно хроматографируют испытуемый раствор (раствор Б) и раствор СО усниновой кислоты не менее 3 раз, регистрируют хроматограммы.

Содержание усниновой кислоты (X %) в препарате, рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 10 \cdot 100 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 1 \cdot 25 \cdot 50 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot 80 \cdot P}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S – площадь пика усниновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; S₀ – площадь пика на хроматограмме раствора СО усниновой кислоты; а – навеска сырья, г; а₀ – навеска СО усниновой кислоты; г; P – содержание основного вещества в СО усниновой кислоты; %; W – влажность сырья, %.

Валидация методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах *Cladonia* методом ВЭЖХ проводилась по параметрам: эффективность хроматографической системы, специфичность, линейность, правильность.

Для оценки специфичности методики количественного определения усниновой кислоты получены хроматограммы растворителя, стандартного раствора и испытуемого раствора (рис. 1–3). Хроматограммы растворителя свидетельствуют об отсутствии влияния растворителя на результаты количественного определения усниновой кислоты. Время удерживания пика усниновой кислоты на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора совпадают с точностью >99,0% (табл. 3).

Установлено, что эффективность хроматографической системы, рассчитанная по пику усниновой кислоты на хроматограммах раствора стандартного

образца, не менее 3000 теоретических тарелок. Фактор асимметрии пика усниновой кислоты на хроматограммах стандартного раствора составляет ≥0,8 и ≤1,5. Относительное стандартное отклонение (RSD) значений времен удерживания на хроматограммах

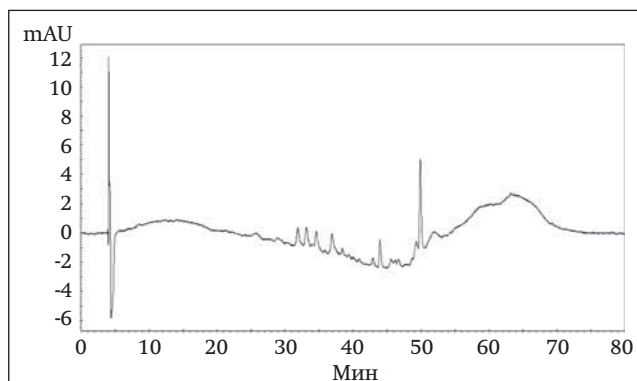


Рис. 1. Типичная хроматограмма растворителя
Fig. 1. Typical solvent chromatogram

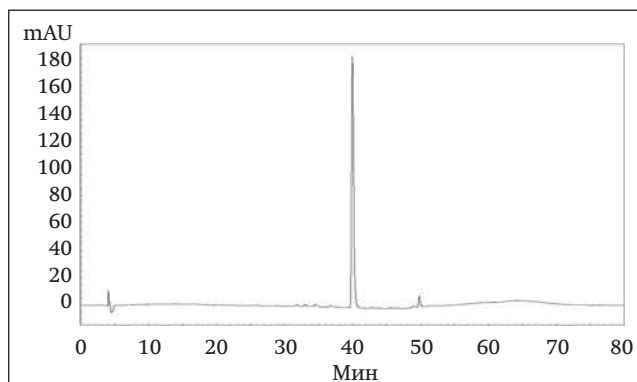


Рис. 2. Типичная хроматограмма стандартного раствора усниновой кислоты
Fig. 2. Typical chromatogram of a standard usnic acid solution

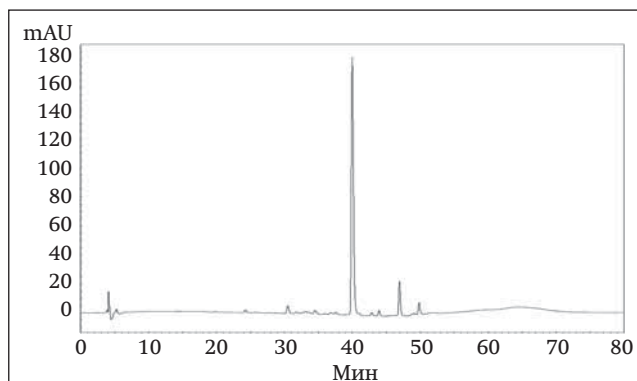


Рис. 3. Типичная хроматограмма испытуемого раствора слоевищ ягеля
Fig. 3. A typical chromatogram of a test cup moss blastema solution

Таблица 3
Специфичность методики определения усниновой кислоты

Table 3
Specificity of the procedure for determination of usnic acid

Время удерживания	Стандартный раствор	Испытуемый раствор	Совпадение, %
RT ₁	39,99	39,93	99,9
RT ₂	39,95	39,95	100,0
RT ₃	39,97	39,97	100,0

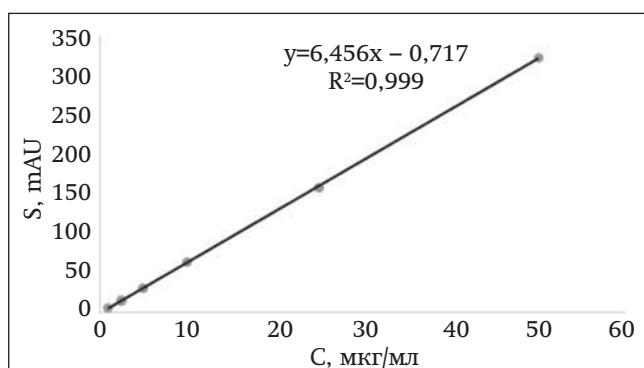


Рис. 4. Линейная зависимость аналитического сигнала от концентрации усниновой кислоты в растворе
Fig. 4. The linear relationship of the analytical signal to the concentration of usnic acid in solution

Правильность определения усниновой кислоты

The accuracy of determination of usnic acid

Концентрация раствора добавки в 1 образце, мкг/мл	S _{добавки}	Ожидаемое S	Найдено S	Открываемость, %
5	20,3867	50,3272	50,8979	101,13
5	21,0852	51,0257	52,1452	102,19
5	20,6547	50,5952	51,0464	100,89
10	41,04266	70,9831	71,2217	100,33
10	41,6504	71,5909	71,42	99,76
10	40,9247	70,8652	71,6449	101,10
40	212,1647	242,1052	245,6099	101,44
40	197,2946	227,2351	228,0952	100,37
40	199,2734	229,2139	230,3551	100,49

Примечание. Данные для усниновой кислоты, содержащейся в спиртовом извлечении из слоевищ *Cladonia*: – a=1,0054 г, S=29,9405

Note. Data for usnic acid contained in alcohol extract from *Cladonia* lichen blastemas: – a=1.0054 g, S=29.9405

стандартного раствора усниновой кислоты при n=5 не превышает 2,0%, площадей пиков – не более 4%.

Для определения линейности методики готовили серии растворов стандартного образца усниновой кислоты в пределах от 1 до 50 мкг/мл. График приведен на рис. 4. Коэффициент корреляции составляет R²=0,9999, что подтверждает линейность методики количественного определения усниновой кислоты.

Правильность методики количественного определения усниновой кислоты доказывали методом добавок. Согласно анализу полученных данных (табл. 4), правильность количественного определения усниновой кислоты для средней величины каждого из 3 определений находится в диапазоне от 95,0 до 105,0%. Коэффициент вариации количественного определения усниновой кислоты при n=9 не превышает 2,0%.

На основании метрологических характеристик разработанной методики количественного определения усниновой кислоты в слоевищах ягеля (табл. 5) установили, что ошибка определения не превышает 5%.

Разработанная методика была использована для определения содержания усниновой кислоты в образцах ягеля, собранного в разных районах Якутии (табл. 6).

Заключение

Разработана и валидирована методика количественного определения усниновой кислоты в слоевищах лишайника рода *Cladonia* методом ВЭЖХ с ошибкой определения ±4,47%. Показана перспективность разработанной методики для анализа субстанции растительного происхождения на содержание усниновой кислоты. Согласно полученным результатам, содержание усниновой кислоты в слоевищах ягеля, произрастающего в разных районах Якутии, колеблется от 0,88 до 1,02%.

Результаты были получены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки России (FSRG-2020-0019).

The results were obtained as part of the state task of the Ministry of Education and Science of Russia (FSRG-2020-0019).

Таблица 5

Метрологические характеристики разработанной методики

Metrological characteristics of the developed procedure

Table 5

f	W, %	\bar{X} , %	s	P, %	t (p, f)	$\Delta\bar{X}$	E, %
5	8,0	0,78	0,03	95	2,57	0,03	4,47

Таблица 6

Содержание усниновой кислоты в образцах *Cladonia* (n=3, p=0,95)

Usnic acid levels in *Cladonia* samples (n=3; p=0.95)

Table 6

Район заготовки сырья	Содержание усниновой кислоты, %
Томпонский	0,93±0,02
Таттинский	0,96±0,02
Олекминский	0,96±0,02
с. Владимировка	1,02±0,02
Лесничество	0,88±0,02

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

Литература

1. Подтероб А.П. Химический состав лишайников и их медицинское применение. Химико-фармацевтический журнал. 2008; 42 (10): 32–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-10-32-38>
2. Дембицкий В.М., Толстикова Г.А. Органические метаболиты лишайников. Новосибирск: Издательство СО РАН, Филиал «Гео»; 2005.
3. Павлова Е.С., Павлов Н.Г. Лишайники рода цетрарии (*Cetraria*) и кладонии (*Cladonia*) в экспериментальном исследовании. Материалы III Международной научной интернет-конференции: в 2 томах. Биотехнология. Взгляд в будущее, Казань, 2014: 36–42.
4. Загоскина Н.В., Николаева Т.Н., Лапшин П.В., Заварзин А.А., Заварзина А.Г. Водорастворимые фенольные соединения у лишайников. Микробиология. 2013; 82 (4): 434–41. <https://doi.org/10.7868/S0026365613030166>
5. Чахирова В.А., Верещагина В.В., Погорелов В.И. Определение содержания биологически активных веществ в сырье ягеля (оленьего мха). Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. Спецвыпуск Фармакология. 2006; 58–9.

6. Chikita F. Culberson, Hör-Dur Kristinsson. A standardized method for the identification of lichen products. Journal of chromatography, 1970; 46: 85–93.

7. Буркин А.А., Кононенко Г.П., Толпышева Т.Ю. Иммуноферментный анализ усниновой кислоты в лишайниках. Прикладная биохимия и микробиология, 2013; 49 (3): 322–8. <https://doi.org/10.7868/S0555109913030069>

8. Прокопьев И.А., Шаварда И.Л., Филиппова Г.В., Шейн А.А. Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии для определения содержания вторичных метаболитов лишайников. Журнал аналитической химии, 2017; 72 (11): 1025–31. <https://doi.org/10.7868/S004445021711007X>

9. Feige G.B., Lumbsch H.T. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography, 1993; 646: 417–27.

References

1. Podterob A.P. Chemical compound of lichens and its medical usage. Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal. 2008; 42 (10): 32–8. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2008-42-10-32-38> (in Russian).
2. Dembitsky V.M., Tolstikov G.A. Organical metabolites of lichens. Novosibirsk: Publishing house of Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 2005 (in Russian).
3. Pavlova Ye.S., Pavlov N.G. Lichens of genus cetraria (*Cetraria*) and cladonia (*Cladonia*) in an experimental study. Materials of III International scientific Internet-conference: in 2 volumes. Biotechnology. A look into the future, Kazan. 2014: 36–42 (in Russian).
4. Zagoskina N.V., Nikolaeva T.N., Lapshin P.V., Zavarzin A.A., Zavarzina A.G. Water-soluble phenolic compounds of lichens. Microbiologiya. 2013; 82 (4): 434–41. <https://doi.org/10.7868/S0026365613030166> (in Russian)
5. Chakhirova V.A., Vreschagina V.V., Pogorelov V.I. Determination of the content of biologically active substances in the raw material of moss (deer moss). Izvestiyavuzov. Severo-Kavkazskiy Region. Estestvennye nauki. Specvypusk Pharmacologiya. 2006; 58–9 (in Russian).
6. Chikita F. Culberson, Hör-Dur Kristinsson. A standardized method for the identification of lichen products. Journal of chromatography. 1970; 46: 85–93.
7. Burkin A.A., Kononenko G.P., Tolpysheva T.Yu. Immune assay of usnic acid in lichens. Prikladnaya biokhimiya i microbiologiya. 2013; 49 (3): 322–8. <https://doi.org/10.7868/S0555109913030069> (in Russian).
8. Prokopyev I.A., Shavarda I.L., Filippova G.V., Shein A.A. The use of high performance liquid chromatography to determine the content of secondary metabolites of lichens. Zhurnal analiticheskoy khimii. 2017; 72 (11): 1025–31. <https://doi.org/10.7868/S004445021711007X> (in Russian).
9. Feige G.B., Lumbsch H.T. Identification of lichen substances by a standardized high-performance liquid chromatographic method. Journal of Chromatography. 1993; 646: 417–27.

Поступила 25 апреля 2019 г.

Received 25 April 2019

Принята к публикации 10 декабря 2019 г.

Accepted 10 December 2019