

Рекомендована д. фармац. наук, проф. В. М. Ковальовим

УДК 582.929.4:577.124.4

ВИВЧЕННЯ ВОДОРОЗЧИННИХ ПОЛІСАХАРИДІВ ЧЕБРЕЦЮ ПОВЗУЧОГО

© Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, М. Б. Чубка

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: наведено результати якісного і кількісного вивчення полісахаридів та відновлювальних моносахаридів у лікарській рослинній сировині чебрецю повзучого.

Ключові слова: чебрець повзучий, водорозчинні полісахариди, гравіметрія, спектрофотометрія.

Вступ. За даними різних джерел, чебрець повзучий (*Thymus serpyllum*) родини Губоцвіті (*Lamiaceae*) містить флавоноїди, амінокислоти, дубильні речовини, фенолокислоти, ефірну олію, які у комплексі зумовлюють різносторонню фармакологічну активність [1, 2]. Лікарські засоби, зареєстровані на основі чебрецю, містять його екстракти, отримані за допомогою різних екстрагентів (вода, водно-спиртові розчини): Стоптусин фіто (рідкий спиртовий екстракт), Гербіон сироп первоцвіту (водний екстракт), Бронхіал плюс з алтеєю, чебрецем і вітаміном С (рідкий спиртовий екстракт), Пертусин (рідкий спиртовий екстракт), Пекторал (спиртовий екстракт чебрецю) тощо. Кожен з виробників, вибираючи той чи інший екстрагент, керувався завданням вилучення певних БАР, які, на його думку, найефективніше діяли б при захворюваннях верхніх дихальних шляхів [3].

Якість трави чебрецю, за вимогами Державної фармакопеї України, регламентується вмістом ефірної олії та її компонентів [4]. Попередніми дослідженнями встановлено, що у витягах із трави чебрецю, отриманих за допомогою води і розчинів з низькими концентраціями спирту, наявні полісахариди [5]. У доступних літературних джерелах немає відомостей про полісахариди чебрецю повзучого, оскільки його сировина завжди позиціонувалась як ефірно-олійна і об'єктом різноманітних досліджень була ефірна олія, а окремі роботи стосувались вивчення флавоноїдного складу [6]. Досвід ефективного застосування готових лікарських засобів на основі чебрецю, отриманих при використанні низьких концентрацій спиртів або води як екстрагентів, нашою групою на пошук інших класів БАР, відповідальних за муколітичну дію і присутніх у траві. Полісахариди за природою є гідрофільним класом сполук і мають муколітичну та секретолітичну та інші види активності [7, 8].

Тому метою нашої роботи було дослідження складу і вмісту полісахаридів у сировині чебрецю повзучого.

Методи дослідження. Для дослідження використовували ЛРС різних серій Житомирської ФФ «Ліктрави» (с. 61010; с. 40810; с. 30111) та дикорослі зразки сировини, зібрані у різних регіонах.

Вивчали фракцію водорозчинних полісахаридів. Водне вилучення з трави чебрецю повзучого, яке містить цю фракцію полісахаридного комплексу, отримували після попереднього знежирення сировини хлороформом і вилучення поліфенольних сполук 96 % спиртом.

Вивчення якісного складу полісахаридів у водорозчинному полісахаридному комплексі проводили, виконуючи якісні реакції, а моносахариди, отримані після гідролізу, досліджували методом тонкошарової хроматографії. Хроматографічні дослідження проводили на хроматографічних пластинках Silica gel 60 F₂₅₄ ("Merck", Німеччина) з використанням рухомої фази вода Р – ацетонітрил Р (15:85) та обробкою пластин розчином тимолу (0,5 г тимолу, 0,5 мл кислоти сірчаної Р, 95 мл 96 % спирту). Як свідки застосовували стандартні зразки глюкози, фруктози, арабінози, ксилози, рамнози, галактози, глюкуронової і галактуронової кислот.

Кількісне визначення полісахаридів у сировині та в рідкому екстракті чебрецю повзучого проводили гравіметрично, а вміст відновлюючих моносахаридів спектрофотометрично [9, 10].

Результати й обговорення. Отримання водного вилучення з трави чебрецю повзучого проводили за такою методикою.

10 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщали у конічну колбу місткістю 200 мл з притертим шліфом, додавали 100 мл хлороформу і нагрівали зі зворотним холодильником 1 год на киплячій водяній бані. Після охолодження хлороформної витяжки її відкидали, а шрот висували на повітрі. Шрот поміщали у конічну колбу місткістю 200 мл, додавали 100 мл 96 % спирту і нагрівали зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані протягом 1 год. Після охо-

лодження спиртове вилучення відкидали, шрот висушували до повітряно-сухого стану, поміщали у конічну колбу місткістю 200 мл, додавали 100 мл води Р та нагрівали зі зворотним холодильником на киплячій водянній бані 3 год. Водне вилучення фільтрували в мірну колбу на 100 мл, шрот віджимали, промивали колбу водою Р, додаючи отримані розчини до фільтрату та доводячи об'єм фільтрату до позначки водою Р. Одержаний фільтрат аналізували на вміст полісахаридів [10], а після осадження полісахаридів та їх гідролізу спектрофотометрично визначали вміст відновлюючих моносахаридів.

При вивченні якісного складу моносахаридів проводили осадження комплексу водорозчинних полісахаридів з водного вилучення трави 96 % спиртом (співвідношення водне вилучення – спирт 1:3). Одержаний водорозчинний полісахаридний комплекс чебрецю повзучого є аморфним осадом світло-сірого з коричневим відтінком забарвлення, розчинним у воді та нерозчинним в органічних розчинниках. За результатами якісних реакцій з розчином Люголя, 1 % розчином заліза (III) хлориду, 10 % розчином купруму сульфату та натрію гідроксиду слід зробити висновок про відсутність крохмалю, фенольних сполук і пептидів у досліджуваному комплексі.

Внаслідок кислотного гідролізу досліджуваного полісахаридного комплексу в присутності кислоти сірчаної при нагріванні на киплячій водянній бані протягом 1 год отримано кислий розчин моносахаридів, який нейтралізували барій карбонатом до нейтральної реакції за універсальним індикаторним папірцем, після чого суміш центрифугували і піддавали дослідженню надосадову рідину.

Для якісного вивчення отриманих після гідролізу моносахаридів використали ряд якісних реакцій і хроматографічне дослідження. Якісною реакцією з 0,5 % розчином карбазолу виявлено у складі полісахаридів кислі моносахариди, а реакцією з реактивом Фелінга відновлюючі моносахариди.

У результаті хроматографічних досліджень встановлено присутність фруктози, глюкози, арабінози, ксилози і рамнози, а також кислоти галактуронової у складі водорозчинного поліса-

харидного комплексу чебрецю повзучого. За співвідношенням розміру та інтенсивності забарвлення плям на хроматограмах було зроблено висновок, що переважаючим моносахаридом є фруктоза, а з відновлюючих моносахаридів – глюкоза, тому в подальшому розрахунки вмісту відновлюючих моносахаридів проводили в перерахунку на цю речовину.

При гравіметричному визначенні вмісту полісахаридів застосовували нижче представлену методику, яка була адаптована нами для аналізу полісахаридів чебрецю повзучого.

Методика гравіметричного визначення вмісту полісахаридів.

20,0 мл отриманого водного витягу поміщають у стакан місткістю 200 мл, додають 60 мл 96 % спирту Р, перемішують і нагрівають на водянній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв. Витримують 1 год і фільтрують під вакуумом через скляний фільтр ПОР 16, попередньо висушений при температурі 100–105 °С до постійної маси. Осад кількісно переносять на фільтр за допомогою 15 мл суміші вода Р – 96 % спирт Р (1:2) і послідовно промивають 10 мл 96 % спирту Р, 15 мл ацетону Р та 15 мл етилацетату Р. Фільтр з осадом сушать на повітрі, потім висушують при температурі 100 – 105 °С до постійної маси, охолоджують в ексикаторі і зважують.

Вміст полісахаридів, у перерахунку на суху сировину, у відсотках розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot 100 \cdot 100}{20 \cdot m_{\text{нав}} \cdot (100 - W)} \cdot 100,$$

де m_0 – маса осаду після висушування, г;
 $m_{\text{нав}}$ – маса наважки сировини, взятої для аналізу, г;

W – вміст води в сировині, %.

Результати проведених гравіметричних досліджень різних зразків трави чебрецю повзучого наведено у таблиці 1.

Кількісне визначення відновлюючих моносахаридів проводили з використанням фотометричної реакції відновлення пікринової кислоти до пікرامінової, методика визначення представлена нижче.

Таблиця 1. Вміст водорозчинних полісахаридів у лікарській рослинній сировині чебрецю повзучого

Об'єкт дослідження	Вміст, %
Житомирська ФФ «Ліктрави» с. 61010	8,44 ± 0,03
Житомирська ФФ «Ліктрави» с. 30111	6,23 ± 0,03
Житомирська ФФ «Ліктрави» с. 40810	5,67 ± 0,02
Дикоросла сировина, Тернопільська область, Гусятинський район	6,53 ± 0,03
Дикоросла сировина, Львівська область, Сколівський район	4,56 ± 0,03
Дикоросла сировина, Львівська область, Самбірський район	4,51 ± 0,02

Методика кількісного визначення вмісту відновлюючих моносахаридів.

10,0 мл отриманого водного витягу поміщають у центрифужну пробірку місткістю 50 мл, додають 30 мл 96 % спирту Р, перемішують і нагрівають на водяній бані при температурі 30 °С протягом 5 хв. Витримують 1 год, вміст центрифугують, надосадову рідину відкидають, а осад переносять за допомогою 5,0 мл кислоти хлористоводневої розведеної Р та 5,0 мл води Р у конічну колбу місткістю 50 мл зі шліфом та нагрівають впродовж 1 год зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані. Колбу з вмістом охолоджують, поміщають в колбу невеликий шматок паперу конго і додають по краплях 40 % розчин натрію гідроксиду до почервоніння паперу, потім додають по краплях кислоту хлористоводневу розведену до посиніння паперу, а потім по краплях 10 % розчин натрію гідроксиду до почервоніння паперу. Отриманий розчин кількісно переносять за допомогою води Р в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки, перемішують і фільтрують, відкидаючи перші 5 мл фільтрату (розчин А).

Випробуваний розчин. 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової поміщають в плоскодонну колбу місткістю 25 мл, додають 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл розчину А. Колбу з вмістом витримують на киплячій водяній бані протягом 10 хв, потім охолоджують до кімнатної температури. Вміст колби кількісно переносять за допомогою води Р у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину водою Р до позначки.

Розчин стандартного зразка глюкози. 0,14 г (точна наважка) стандартного зразка глюкози (Fluka), висушеної при температурі від 100 до 105 °С до постійної маси, поміщають в мірну колбу місткістю

100 мл, розчиняють у 50 мл води Р, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують. 10,0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, доводять об'єм розчину водою Р до позначки і перемішують.

Розчин порівняння. 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової, 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл розчину стандартного зразка глюкози, оброблений аналогічно досліджуваному розчину, починаючи зі слів: «Колбу з вмістом витримують...».

Компенсаційний розчин. 1,0 мл 1 % розчину кислоти пікринової, 3,0 мл 20 % розчину натрію карбонату і 1,0 мл води Р, оброблений аналогічно досліджуваному розчину, починаючи зі слів «Колбу з вмістом витримують...».

Оптичну густину випробуваного розчину і розчину порівняння вимірюють при довжині хвилі 460 нм відносно компенсаційних розчинів для кожного з розчинів відповідно.

Вміст відновлюючих моносахаридів в сировині, у відсотках, в перерахунку на глюкозу, розраховують за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot m_0}{A_0 \cdot m_{\text{нав}}} \cdot 100,$$

де A_x – оптична густина випробуваного розчину;

A_0 – оптична густина стандартного зразка глюкози;

m_0 – маса наважки стандартного зразка глюкози, г;

$m_{\text{нав}}$ – маса наважки сировини, г.

Результати проведених спектрофотометричних досліджень різних зразків трави чебрецю повзучого наведено у таблиці 2.

Таблиця 2. Вміст відновлюючих моносахаридів у лікарській рослинній сировині чебрецю повзучого

Об'єкт дослідження	Вміст, %
Житомирська ФФ «Ліктрави» с. 61010	1,09 ± 0,03
Житомирська ФФ «Ліктрави» с.40810	1,16 ± 0,02
Житомирська ФФ «Ліктрави» с. 20111	1,28 ± 0,02
Дикоросла сировина Тернопільська область, Гусятинський район	1,35 ± 0,03
Дикоросла сировина, Львівська область, Сколівський район	0,86 ± 0,03
Дикоросла сировина, Львівська область, Самбірський район	0,92 ± 0,02

Як видно з отриманих результатів, кількісний вміст полісахаридів і відновлюючих моносахаридів у сировині різних серій дещо відрізняється, що можна пояснити кліматичними умовами зростання та висушування ЛРС. Враховуючи, що для виробництва ГЛЗ з трави чебрецю повзучого окремі виробники застосовують воду, слід переглянути підходи до стандартизації цієї ЛРС та

технології його екстрактів. Проведене дослідження показало, що сировина чебрецю повзучого багата на полісахариди і відновлюючі моносахариди, що потребує подальшого їх вивчення з метою випробування їхньої біологічної активності.

Висновки. 1. Кількісний вміст полісахаридів у траві чебрецю різних серій коливається у широких межах 4 – 8 %, а відновлюючих моносахаридів

ридів, незначно відрізняється один від одного 0,8 – 1,4 %. Зважаючи на високий вміст полісахаридів необхідно переглянути показники і критерії стандартизації трави чебрецю повзучого.

Література

1. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно – профилактических средств / [Н. А. Криштанова, М. Ю. Сафонова, В. Ц. Болотова и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 212–221.
2. Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Чебрець повзучий» / [Е. Е. Котова, Н. І. Тихоненко, А. Г. Котов та ін.] // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 30–35.
3. Зарівна Н. О. Аналіз ринку лікарських засобів на основі чебрецю звичайного / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, М. М. Михалків // Фармацевтичний часопис. – 2010. – № 4. – С. 59–63.
4. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково – експертний фармакопейний центр» – 1-ше вид.- Доповнення 3. – Харків: Державне підприємство «Науково – експертний фармакопейний центр», 2009. – 233 с.
5. Зарівна Н. О. Вивчення динаміки складу і вмісту полісахаридів в рідких екстрактах чебрецю / Н. О. За-

ривна, Л. В. Вронська // Актуальні питання сучасної медицини: міжнар. наук. – практ. гонф., 12-14 жовтня 2011р. : тези доповідей. – Київ, 2011. – С. 463.

2. Перспективним є створення нових лікарських засобів на основі водних екстрактів трави чебрецю повзучого.

6. Толоч А. Я. Порівняльний аналіз фенольних сполук в екстрактах чебрецю / А. Я. Толоч, Н. Р. Батура // Вісник Запорізького держ. ун-ту. – 1998. – № 1. – С. 161–171.
7. Rashmi Srivastava. Bioactive polysaccharides from plants / Rashmi Srivastava, Dinesh K. Kulshreshtha // Phytochemistry. – 1989. – V. 28, № 11. – P. 2877–2883.
8. Stella Rovio. Determination of monosaccharide composition in plant fiber materials by capillary zone electrophoresis / Stella Rovio, Helena Simolin, Krista Koljonen, Heli Siren // J. of Chromatography A. – 2008. – V. 1185, № 1. – P. 139–144.
9. Мухамедова М. Ш. Изучение полисахаридов корней *Althaea nudiflorae* L. / М. Ш. Мухамедова, А. К. Ганиев // Провизор. – 2004. – № 2. – С. 33–34.
10. Практикум по фармакогнозии / под ред. В. Н. Ковалева. – Х. : Золотые страницы, 2003. – С. 40–45.

ИЗУЧЕНИЕ ВОДРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ ЧАБРЕЦА ПОЛЗУЧЕГО

Н. О. Заривна, Л. В. Вронська, М. Б. Чубка

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: приведены результаты качественного и количественного изучения полисахаридов и восстанавливающих моносахаридов в лекарственном растительном сырье чабреца ползучего.

Ключевые слова: чабрец ползучий, водорастворимые полисахариды, гравиметрия, спектрофотометрия.

THE STUDY OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES OF WILD THYME

N. O. Zarivna, L. V. Vronska, M. B. Chubka

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: the results of qualitative and quantitative study of polysaccharides and reducing sugars in the wild thyme herbal substance are shown.

Key words: wild thyme, water-soluble polysaccharides, gravimetry, spectrophotometry.