

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Кокина Д.Г., Сычев И.А., 2017
УДК 615.322:547.458
DOI:10.23888/PAVLOVJ2017142-48

**ИЗУЧЕНИЕ СОСТАВА, НЕКОТОРЫХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПОЛИСАХАРИДНОГО КОМПЛЕКСА
ЛИСТЬЕВ ЛОПУХА БОЛЬШОГО**

Д.Г. Кокина, И.А. Сычев

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

В статье приведен способ выделения полисахаридного комплекса из листьев лопуха большого (*Arctium lappa* L.), впервые определен качественный состав полученного комплекса, относящийся к группе гетерогликанов. Изучены некоторые физико-химические свойства полисахаридного комплекса. Показано, что полисахаридный комплекс повышает каталазную активность и перекисную резистентности мембран эритроцитов здорового донора. По результатам исследования установлено, что полисахаридный комплекс лопуха большого повышает физическую работоспособность подопытных животных.

Ключевые слова: полисахарид, моносахарид, лопух большой, резистентность мембран эритроцитов, каталаза, физическая работоспособность.

**STUDY OF COMPOSITION, PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES
AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF POLYSACCHARIDE COMPLEX
OF ARCTIUM LAPPA LEAVES**

D.G. Kokina, I.A. Sychev

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov,
Vysokovolttnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

A method of isolation of polysaccharide complex from the leaves of Burdock (*Arctium lappa* L.) is described in the article. For the first time the qualitative composition of this complex was determined, belonging to the group of heteroglycans. Some of physical and chemical properties of polysaccharide complex were studied. It is shown that polysaccharide complex increases catalase activity and peroxide resistance of the erythrocyte membranes of healthy donors. The study found that polysaccharide complex of Burdock improves physical performance of test animals.

Keywords: polysaccharide, monosaccharide, Burdock, the resistance of the erythrocyte membranes, catalase, physical performance.

Растущий интерес к фитотерапии стимулируется за счет внедрения в научную ме-

дицину растений народной медицины и разработки новых фитопрепаратов на их основе.

Экстракты и отвары корня лопуха большого (*Arctium lappa* L.) и лопуха войлочного (*Arctium tomentosum* Mill) применяют как потогонное средство, используют при заболеваниях печени и желчного пузыря, как противоопухолевое и улучшающее обмен веществ; наружно – при экземах, фурункулезе, заболеваниях кожи головы [1]. В официальной медицине применение нашли только корни растения, а надземная часть остается невостребованной, поэтому листья лопуха являются перспективным сырьем для получения полисахаридного комплекса, изучения его физико-химических свойств и биологической активности [2].

В корнях лопуха большого содержится полисахарид инулин (до 50%), эфирное бардановое масло (до 0,18%), протеин (около 12%), витамины, минеральные вещества, жирные масла, дубильные вещества, флавоноиды, ириоидные гликозиды, ситостерин, стигмастерин, алкалоиды. Надземная часть растения не исследована, полисахариды, содержащиеся в стеблях и листьях растений не выделены и не изучены [3].

Особое внимание вызывают растительные полисахариды, обладающие высокой биологической активностью, являющиеся источником получения новых фармакологически активных веществ [4].

Целью работы являлось выделение полисахаридного комплекса из листьев лопуха большого, определение его моносахаридного состава, изучение некоторых физико-химических свойств и определение биологической активности в эксперименте.

Материалы и методы

Растения лопуха большого были собраны в период массовой бутонизации. Из измельченных воздушно-сухих листьев растения лопуха большого предварительной экстракцией 60%-ным и 40%-ным этанолом удаляли экстрактивные вещества, свободные моносахариды, олигосахариды, органические кислоты, аминокислоты, дубильные вещества, эфирные масла. Очищенное и высушенное сырье использовали для выделения полисахаридного комплекса 1%-ным раствором оксалата аммония в соотношении 1:10 на кипящей водяной бане в течение 1,5 часов. Из полученного экстрак-

та полисахарид осаждали трехкратным избытком 96%-го этанола. Полученный осадок полисахаридов последовательно очищали этанолом, ацетоном, хлороформом, высушивали в эксикаторе над концентрированной серной кислотой, после чего определяли его массу [5, 6].

Для исследования качественного и количественного состава проводилась экстракция 7 образцов лекарственного растительного сырья с последующей статистической обработкой результатов.

Моносахаридный состав полисахаридного комплекса исследовали после кислотного гидролиза в 1 М растворе серной кислоты, который проводили на кипящей водяной бане в течение 9 часов. Полученный гидролизат нейтрализовали карбонатом бария. Продукты гидролиза исследовали методом восходящей тонкослойной хроматографии и нисходящей бумажной в системе бутанол-1:уксусная кислота: вода (4:1:5) при температуре 25-27⁰С. Хроматограммы проявляли смесью анилина и фталевой кислоты, определяли качественный моносахаридный состав полисахаридного комплекса.

Уроновые кислоты количественно определяли гравиметрическим методом, осаждали полигалактурооновую кислоту из гидролизата полисахарида в виде пектата кальция.

Количественное определение свободных карбоксильных групп проводили методом алкалометрии (титрант 0,01 М раствор гидроксида натрия), индикатор – фенолфталеин.

Определение золы проводилось в соответствии с фармакопейной статьей: точную навеску высушенного растительного сырья и полисахаридного комплекса помещали в фарфоровый тигель и сжигали в муфельной печи при постоянном повышении температуры до постоянной массы золы [7].

Во всех биологических исследованиях использовали 5%-й раствор полисахарида лопуха большого, приготовленного на физиологическом растворе.

Исследовали действие полисахарида лопуха большого на каталазную активность крови. Для этого в мерную колбу на 100 мл наливали 10 мл воды очищенной и прибавляли микропипеткой 0,1 мл крови здорово-

го донора. Пипетку промывали несколько раз тем же раствором. Воду прибавляют в колбу до метки и получали основной раствор крови (1:1000), к которому добавляли раствор полисахарида лопуха большого в дозе $1 \cdot 10^{-4}$, перемешивали, наливали по 0,1 мл в стаканчики, приливали по 7 мл очищенной воды, в опытную пробу добавляли 2 мл 5%-го раствора полисахарида и 2 мл 1%-го перекиси водорода, в контрольную – 5 мл 10%-го раствора серной кислоты. Затем приливали в опытную колбу 5 мл 10%-го раствора серной кислоты, а в контрольную – 2 мл 1%-го раствора перекиси водорода, содержимое титровали 0,1 М раствором перманганата калия [8].

Для определения влияния полисахарида на перекисную резистентность мембран эритроцитов, брали кровь здорового донора с добавлением к ней полисахарида лопуха большого (ПСЛ), из расчета дозы $1 \cdot 10^{-4}$. Полученный раствор выдерживали в термостате в течение часа, а затем в пробирку с фосфатным буфером (рН 7,4), приготовленном на физиологическом растворе добавляли по 0,1 мл крови с полисахаридом. В контрольные образцы добавляли 0,1 мл крови без полисахарида. Для стабилизации к 1,5 мл крови добавляли 2 капли гепарина.

Во все пробы приливали равные объемы раствора Фентона (сульфат железа (II) 0,01 м/мл и перекись водорода 0,2 мг/мл), а степень гемолиза определяли на фотоэлектроколориметре КФК-3 при длине волны 490 нм [9], время инкубации эритроцитов с раствором полисахарида составило 30 минут. Одновременно проводили контрольные исследования, чтобы исключить ошибку, связанную со спонтанным гемолизом во временном факторе. Действие полисахарида на мембраны эритроцитов оценивали в процентах по отношению к контролю.

Вычисляли процент гемолиза в каждой пробирке, сравнивая величины экстинкции надосадочной жидкости с экстинкцией, принятой за 100%, по формуле: Процент гемолиза = $E_x \cdot 100 / E_1$, где E_1 – экстинкция надосадочной жидкости в пробирке раствором Фентона; E_x – экстинкция исследуемой пробы.

Исследования на животных выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией по защите и использованию позвоночных животных для экспериментов и других целей; Приказом № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации»; а также Приказом № 742 от 13 ноября 1984 г. «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Действие полисахарида лопуха большого на физическую работоспособность животных оценивали на модели принудительного плавания. Для этого у 25 крыс Вистар обоего пола, содержащихся в стандартных условиях вивария, определяли массу тела и подопытным животным ежедневно вводили полисахарид «рег ос» в дозе 0,2 г/кг массы тела в одно и то же время. Средняя масса экспериментальных животных составила $0,298 \pm 0,01$ (0,280-0,315). Контрольные животные получали в те же сроки равный объем физиологического раствора.

Исследование физической работоспособности проводили на 1, 5, 10, 15, 20, 25 сутки введения полисахарида и на 10 день отмены для оценки последствий. В эти же сроки определяли среднюю массу тела животных. К задней конечности животного привязывали груз, массой 10% от массы тела крысы. Животного с грузом помещали в стеклянный цилиндр диаметром 30 см с высотой водного столба 80 см (температура воды поддерживалась в пределах 29-30⁰С) и отмечали время плавания животных на поверхности воды до признаков утомления.

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «StatSoft Statistica 7.0». Тип распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Полученные данные обрабатывали тестом ANOVA (так как данные были распределены нормально). Межгрупповые различия определяли по критерию Ньюмена-Кейсла. Данные в таблицах представлены в виде среднего арифметического \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$).

Результаты и их обсуждение

Из 60 г сухого растительного сырья извлекли 7,5 г полисахаридного комплекса, представляющего собой аморфное вещество кремового цвета, выход которого составил

12,95%±0,57%. Выделенный полисахарид хорошо растворялся в воде очищенной и физиологическом растворе, образуя коллоидный раствор. В 5%-ном водном растворе полисахарида на лабораторном потенциометре определили величину рН, которая составила 4,87-4,88 при температуре 20⁰С.

Вязкость раствора полисахарида исследовали на вискозиметре Оствальда с диаметром капилляра 0,54 см, в сравнении с водой очищенной при температуре 22-23⁰С. Абсолютная вязкость составила 10,46*10⁻³ Па*с, что почти в 10 раз превышает вязкость воды при той же температуре. Рассчитанная золь-

ность для сухого растения и полисахаридного комплекса составила 14,82%±0,5% и 24,20%±0,8% соответственно.

Состав и некоторые физико-химические свойства выделенного полисахаридного комплекса представлены в таблице 1. Установлено, что в состав полисахарида входят моносахариды: арабиноза, глюкоза, галактоза и два неидентифицированных моносахарида. Было установлено, что полисахарид листьев лопуха большого содержит следовые количества урновых кислот (менее 0,05%), среднее содержание свободных карбоксильных групп составило 2,68%±0,13%.

Таблица 1

Состав и физико-химические свойства полисахаридного комплекса лопуха большого (в МиМ указано M±SD)

рН	Вязкость, Па*с	Моносахаридный состав	Урновые кислоты, %	Свободные карбоксильные группы, %	Зольность, %
4,87 ±0,01	10,46 *10 ⁻³	Арабиноза Глюкоза Галактоза Неидентифицированные моносахариды	Следовые количества	2,68±0,13	24,20±0,12

Результаты исследования дают возможность отнести изучаемый полисахарид к группе гетерогликанов. Исследуемый нами полисахарид содержит этерифицированные карбоксильные группы (табл. 2).

Полученные после гидролиза восстанавливающие моносахариды с пикриновой кислотой имеют максимум поглощения при 495 нм, окраска раствора устойчива в течение 30 минут. Спектры поглощения глюкозы и очищенного гидролизата полисахаридного комплекса листьев лопуха большо-

го после проведения реакции с пикриновой кислотой совпадают, в разных образцах полисахаридного комплекса найдено 26% восстанавливающих моносахаридов в пересчете на глюкозу.

Низкое содержание урновых кислот и свободных карбоксильных групп в составе полисахарида лопуха большого сильно отличает его от других пектиновых веществ лекарственных растений, в составе которых может содержаться до 65-85% урновых кислот [3].

Таблица 2

Содержание свободных карбоксильных групп в полисахаридном комплексе лопуха большого (в МиМ указано M±SD)

Полисахарид	Масса навески, г	Содержание свободных карбоксильных групп, %	Метрологическая характеристика
ПСЛ	0,1001	2,92	X _{ср} =2,68% S=0,1312 S _{ср} =0,0536 ε, %= 5,55% ε _α =2,53-2,82
	0,1004	2,60	
	0,1003	2,56	
	0,1029	2,71	
	0,1038	2,60	
	0,1051	2,70	

Нами впервые установлено, что добавление полисахарида лопуха большого к крови здорового донора в дозе $1:10^4$ приводит к активации фермента каталазы. Каталазное число здорового человека колеблется в пределах 10-15 [9]. Каталазное число в контрольных исследованиях составило 12 ± 1 , а каталазное число крови, под действием полисахаридного комплекса лопуха большого составляет 20,4-21,2, что превышает контрольные показатели на 52-63% ($p < 0,05$).

Добавление раствора ПСЛ к крови здорового донора снижает степень гемолиза эритроцитов, и, следовательно, повышает перекисную резистентность мембран этих клеток. Степень гемолиза в контрольных образцах составила $0,5438 \pm 0,0018$ ($p < 0,01$), а величина гемолиза под действием полисахарида уменьшается до $0,1640 \pm 0,0014$ ($p < 0,01$), что на 69,85% ниже контрольных показателей ($p < 0,01$). Повышение перекисной рези-

стентности при добавлении полисахарида, может быть связано с активацией каталазы, которая разрушает молекулы пероксида водорода, защищая мембраны эритроцитов. Возможно, полисахарид взаимодействует с белками или полисахаридами мембраны, образуя защитную пленку на ее поверхности, что также предотвращает разрушение мембран эритроцитов.

Полученные данные вполне согласуются с данными о влиянии растительных полисахаридов на активность фермента каталазы и на изменение перекисной резистентности мембран клеток [5].

Нами установлено, что у крыс, получавших раствор полисахарида лопуха большого, время плавания до состояния утомления достоверно увеличивалось по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы животных (рис. 1).

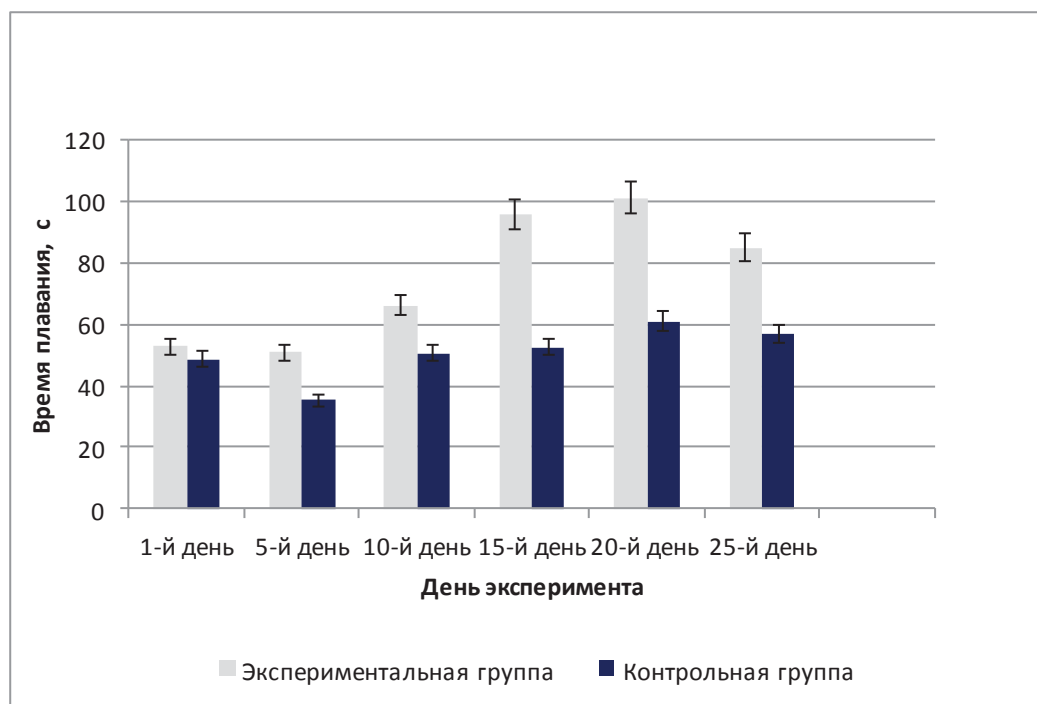


Рис. 1. Влияние полисахарида лопуха большого на время плавания лабораторных животных

У опытной группы животных на 5-й день опыта время плавания снижается, незначительно по сравнению с первыми сутками эксперимента ($p < 0,05$).

На 10-е сутки эксперимента время плавания подопытных крыс начинает воз-

растать, и статистически значимо превышает контрольные результаты на 23,6% ($p < 0,05$).

На 15-е и 20-е сутки опыта время плавания как у контрольных, так и у опытных крыс возрастает, что связано с некоторой

«тренированностью» животных. У крыс, принимающих полисахарид, время плавания возрастает на 46% и 52,5% соответственно по сравнению с контрольными показателями на 15-е и 20-е сутки эксперимента ($p < 0,001$).

На 25-й день опыта различия во времени плавания крыс опытной группы и контрольной снижаются (остаются статистически значимыми), но у животных, при-

нимающие полисахарид время плавания на 32,9% дольше, чем у контрольных крыс.

На 10-й день после отмены полисахарида, различия времени плавания животных снижаются и показатели возвращаются к исходным значениям, но время плавания подопытных крыс превышает результаты контрольных животных ($p < 0,05$). Данные приведены в таблице 3.

Таблица 3

Зависимость времени плавания крыс от дозы полисахарида лопуха большого (в МиМ указано $M \pm SD$)

День эксперимента	Время плавания, с		Достоверность
	Контроль	Эксперимент	
1	47,69±0,47	52,68±8,06	$p < 0,05$
5	38,88±5,29	50,17±7,19	$p < 0,005$
10	50,47±9,29	66,01±7,98	$p < 0,05$
15	51,72±9,81	95,4±15,70	$p < 0,001$
20	60,84±10,02	98,76±16,10	$p < 0,001$
25	56,84±7,29	84,92±12,40	$p < 0,005$
10-й день отмены полисахарида	50,72±7,21	56±6,89	$p < 0,05$

Установлено, что физическая работоспособность крыс под действием полисахарида лопуха большого, после 25-и дней приема превышает контрольное значение на 31% ($p < 0,05$).

Повышение уровня физической работоспособности подопытных животных под воздействием полисахаридов возможно связано с активацией ферментных систем клеток, приводящей к повышению уровня обмена веществ. Растительные полисахариды при введении в организм животных, могут активировать процесс эритропоэза, увеличивать количество эритроцитов и гемоглобина крови, что усиливает процесс обмена веществ в тканях и влияет на повышение физической работоспособности.

Выводы

1. Из листьев лопуха большого впервые получен полисахаридный комплекс, обладающий биологической активностью,

его состав характеризуется наличием арабинозы, глюкозы, галактозы и двух неидентифицированных моносахаридов.

2. Полисахарид листьев лопуха большого содержит следовые количества урсоловых кислот, что дает возможность отнести изучаемый полисахарид к группе гетерогликанов.

3. Добавление полисахарида лопуха большого к донорской крови человека в концентрации $1:10^{-4}$ повышает каталазную активность крови.

4. Полисахаридный комплекс лопуха большого в концентрации $1:10^{-4}$ увеличивает перекисную резистентность мембран эритроцитов крови человека *in vitro*.

5. Полисахаридный комплекс лопуха большого в дозе 0,2 г/кг массы тела, применяемый в течение 25 дней повышает работоспособность крыс на протяжении всего периода наблюдения.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература

1. Дроздова И.Л. Исследование фенольных соединений листьев лопуха большого // Фармация. 2003. №3. С. 12-14.

2. Дроздова И.Л. Аминокислотный и минеральный состав листьев лопуха // Фармация. 2004. №3. С. 12-14.

3. Чухно Т. Большая энциклопедия лекарственных растений. М.: Эксмо, 2007. 1024 с.

4. Енгальчева Е.Е., Якушева Е.Н., Сычев И.А., Щулькин А.В. Изучение гепатопротекторной активности полисахаридного комплекса цветков пижмы обыкновенной // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2015. №2. С. 50-55.

5. Лаксаева Е.А., Сычев И.А. Влияние полисахарида ирги обыкновенной на резистентность мембран эритроцитов // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2013. № 1. С. 65-68.

6. Величко В.В., Ханина М.А. Разработка характеристик доброкачественности лекарственного растительного сырья лопуха войлочного // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы III Всероссийской конференции: в 3-х кн. / под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2007. Кн. 2. 404 с.

7. Государственная фармакопея Российской Федерации. 12-е изд. М.: Изд-во «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», 2008. Ч. 1. 704 с.

8. Кост Е.А., ред. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. 2-е изд. испр. и доп. М.: Медицина, 1975. 384 с.

9. Кушманова О.Д., Ивченко Г.М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии. 3-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина. 1983. 272 с.

References

1. Drozdova I.L. Issledovanie fenol'nyh soedinenij list'ev lopuha bol'shogo [Study of phenolic compounds burdock leaves]. *Farmaciya [Pharmacy]*. 2003; 3: 12-14. (in Russian)

2. Drozdova I.L. Aminokislotnyj i mineral'nyj sostav list'ev lopuha [The amino acid and mineral composition of the leaves of burdock]. *Farmaciya [Pharmacy]*. 2004; 3: 12-14. (in Russian)

3. Chuhno T. *Bol'shaya ehnciklopediya lekarstvennyh rastenij [Great Encyclopedia of medicinal plants]*

Medicinal Plants]. Moscow: Ehksmo; 2007. 1024 p. (in Russian)

4. Engalycheva E.E., Jakusheva E.N., Sychev I.A., Shhul'kin A.V. Izuchenie gepatoprotektoornoj aktivnosti polisaharidnogo kompleksa cvetkov pizhmy obyknovennoj [The study of hepatoprotective activity of complex polysaccharide tansy flowers]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2015; 2: 50-55. (in Russian)

5. Laksaeva E.A., Sychev I.A. Vlijanie polisaharida irgi obyknovennoj na rezistentnost' membran jericitocitov [Effect of polysaccharides irgi ordinary on-resistance of erythrocyte membranes]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]* 2013; 1: 65-68. (in Russian)

6. Velichko VV, Hanina MA. Razrabotka harakteristik dobrokachestvennosti lekarstvennogo rastitel'nogo syr'ya lopuha vojlochnogo [Development characteristics of medicinal plants purity burdock]. V kn.: *Novye dostizheniya v himii i himicheskoj tekhnologii rastitel'nogo syr'ya: materialy III Vserossijskoj konferencii: v 3 kn [In: New advances in chemistry and chemical technology of vegetable raw materials: materials of III All-Russian Conference]*. Barnaul: Izd-vo Alt. un-ta; 2007. Kn. 2. 404 p. (in Russian)

7. *Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii [State Pharmacopoeia]*. 12-е изд. Moscow: Izd-vo «Nauchnyj centr ehksper-tizy sredstv medicinskogo primeneniya»; 2008. P. 1. 704 p. (in Russian)

8. Kost E.A., ed. *Spravochnik po klinicheskim laboratornym metodam issledovaniya [Handbook of Clinical Laboratory Methods]*. 2nd ed. Moscow: Medicina; 1975. 384 p. (in Russian)

9. Kushmanova OD, Ivchenko GM. *Rukovodstvo k laboratornym zanyatijam po biologicheskoj himii [Guide to laboratory work on biological chemistry]*. 3rd ed. Moscow: Medicina; 1983. 272 p. (in Russian)

Сычев И.А. – д.б.н., зав. кафедрой общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: obschhim@mail.ru

Кокина Д.Г. – ст. преподаватель кафедры общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: diana_kokina@rambler.ru