

УДК 615.322:615.246.2

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2023.77.92.004>

СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИСАХАРИДОВ ПИХТЫ СИБИРСКОЙ ШИШЕК

Д.К. Гуляев, доцент кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия», г. Пермь, dkg2014@mail.ru

В.Д. Белоногова, зав. кафедрой фармакогнозии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия», г. Пермь, belonogovavd@yandex.ru

Из пихты сибирской шишек получены полисахаридные фракции. Моносахаридный состав определяли восходящей хроматографией на бумаге. Содержание полисахаридов определяли модифицированным методом Дрейвуда. Сорбционную активность полисахаридов определяли по метиленовому синему и альбумину, в качестве препаратов сравнения использовали уголь активированный и полисорб. Водорастворимые полисахариды шишек пихты состоят из галактуроновой кислоты и ксилозы. В составе пектина же обнаружены галактуроновая кислота и рамноза. В шишках пихты в большом количестве содержатся пектиновые вещества. Водорастворимые полисахариды пихты сибирской шишек обладают выраженной сорбционной активностью. Наблюдается обратная зависимость молекулярной массы полисахарида и его сорбционной активности.

Ключевые слова: пихта сибирская, шишки, полисахариды, сорбционная активность, молекулярная масса

Пихта сибирская (*Abies sibirica*) – крупное вечнозеленое хвойное дерево семейства сосновых – *Pinaceae* – с пирамидально-конусовидной кроной. Пихта сибирская – одна из главных лесобразующих пород таежной

зоны европейской части России, а также Западной и Восточной Сибири.

Отходы лесозаготовок в виде шишек и древесной зелени, оставленные на вырубках, приводят к снижению эффективности использования лесных ресурсов, загрязнению окружающей среды, что вызывает необходимость проведения исследований данного сырья.

Растительные полисахариды, включая полисахариды шишек хвойных растений, являются перспективной группой биологически активных веществ, обуславливающей многие виды фармакологической активности, в том числе способность связывать токсические вещества [1–4].

Растительные полисахариды рассматриваются не только в качестве эффективных сорбентов, но и в качестве веществ, которые стимулируют рост полезной микрофлоры кишечника и ограничивают размножение патогенных бактерий [5].

Полисахариды, полученные из шишек других видов семейства сосновых, показывают высокую сорбционную активность по способности связывать метиленовый синий [6]. Это говорит об актуальности исследования полисахаридных фракций пихты сибирской шишек.

Цель работы – исследование состава, содержания и сорбционной активности полисахаридов пихты сибирской шишек.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образцы шишек пихты сибирской были собраны в сентябре 2021 года на территории Ильинского района Пермского края в темнохвойном лесу. Сбор шишек проводили с 15 деревьев, при дальнейшем исследовании проба усреднялась методом квартования. Сырье до исследования высушивали воздушно-теплым способом. После сушки семена отделяли и использовали для исследования шишки без семян.

Полисахаридные фракции пихты сибирской шишек получали по методике, основанной на известной схеме разделения углеводов по Бэйли с соавторами [7].

Для определения моносахаридного состава выделенных фракций проводили их кислотный гидролиз раствором серной кислоты 1% при нагревании в течение 8 часов. Моносахаридный состав гидролизатов определяли с помощью восходящей хроматографии на бумаге в системе растворителей «бутанол – пиридин – вода» (6:4:3). Хроматограммы обрабатывали анилинфталатным реактивом, проявляли в сушильном шкафу при температуре 100–105°C до появления окраски.

Определение содержания групп углеводов проводили спектрофотометрически – модифицированным антрон-серным методом Дрейвуда [8].

Определение содержания водорастворимых полисахаридов (ВРПК). Навеску около 10 г (точная навеска) воздушно-сухого сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, экстрагировали спиртом этиловым 90% в аппарате Сокслета в течение 1,5 часа для удаления низкомолекулярных сахаров. Остаток сырья после спиртовой экстракции обрабатывали водой очищенной дважды по 100 мл при нагревании около 100°C в течение 1 часа на водяной бане. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводили до метки тем же экстрагентом (раствор А1).

2 мл раствора А1 переносили в центрифужную пробирку, прибавляли 8 мл 95% спирта этилового, перемешивали и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. После охлаждения содержимое пробирки центрифугировали в течение 10 мин. со скоростью вращения 3000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость сливали, а осадок продували в пробирке горячим воздухом до удаления следов этанола. К осадку приливали 4 мл 0,2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной и нагревали на кипящей водяной бане в течение 10 мин. Содержимое пробирки после охлаждения переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл 95% спиртом этиловым и доводили до метки тем же растворителем (раствор Б1).

Определение содержания пектиновых веществ (ПВ). Остаток сырья после водной экстракции обрабатывали смесью 0,25% растворов кислоты щавелевой и аммония оксалата в соотношении 1:1 трижды по 80 мл в течение 1,5 часа. Далее анализ проводили по схеме для ВРПК (растворы А2 и Б2).

Оптическую плотность растворов Б измеряли на спектрофотометре при длинах волн 430 (раствор Б1) и 424 (раствор Б2) нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали 4 мл 0,2% раствора антрона в кислоте серной концентрированной, выдержанного в тех же условиях, что и опытная смесь. Содержание групп углеводов (X, %) в пересчете на доминирующий моносахарид и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A \times k^V \times 0,91}{m \times E} \times \frac{100}{100 - W},$$

где А – оптическая плотность исследуемого раствора; k^V – коэффициент разбавления (2500 – ВРПК, 5000 – ПВ); 0,91 – коэффициент гидролиза; E – коэффициент пересчета на моносахарид (Ara – 67, Frc – 423, Gal – 224,

GalUA – 214, Glu – 358, Xyl – 455); m – масса навески сырья, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Определение сорбционной активности по метиленовому синему проводили по методике Решетникова В.И. [9]. Около 0,2 г полисахаридов (точная навеска) помещали в коническую колбу вместимостью 250 мл, добавляли 50 мл 0,15% раствора метиленового синего и перемешивали на лабораторном шейкере с числом колебаний 140 в минуту в течение 1 часа. Отделение равновесного раствора после сорбции проводили путем центрифугирования при 8000 оборотов в минуту. Один миллилитр надосадочной жидкости переносили в мерную колбу объемом 500 мл и доводили до метки водой очищенной. Далее измеряли оптическую плотность на спектрофотометре СФ 2000 при 664 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Расчет показателя сорбционной активности проводили по общепринятой формуле:

$$X = \frac{(A_0 - A) \times a \times 50}{A_0 \times b \times (1 - 0,01 \times W)},$$

где A_0 – оптическая плотность раствора РСО метиленового синего; A – оптическая плотность испытуемого раствора; a – фактическая концентрация раствора РСО метиленового синего мг/мл; b – навеска вещества в граммах; 50 – объем раствора РСО метиленового синего, мл; W – влажность вещества в процентах.

Определение сорбционной активности по альбумину проводили по методике, изложенной в монографии Решетникова В.И. [3].

Определение молекулярной массы проводили вискозиметрическим методом [10]. Вязкость полимера определяли капиллярным вискозиметром Оствальда. Измеряли время истечения равных объемов растворителя и раствора от верхней до нижней метки

измерительного шарика капилляра вискозиметра при заданной постоянной температуре.

Для расчета молекулярной массы пользовались нелинейным уравнением Марка – Куна – Хувинка, выражающим зависимость характеристической вязкости от молекулярной массы:

$$[\eta] = KM^\alpha$$

где K и α – константы для данной системы «полимер – растворитель» при определенной температуре. Обычно в зависимости от природы растворителя величина α , определяющая степень свернутости макромолекулы, колеблется в пределах 0,5...0,8.

Статистическая обработка полученных результатов исследования проводилась с помощью программы Microsoft Excel. Для сравнения результатов анализа использовали критерий Стьюдента с оценкой достоверности отличий ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Моносахаридный состав полученных полисахаридов шишек пихты сибирской определяли после гидролиза серной кислотой 2%. Преимущества использования растворов серной кислоты заключаются в эффективном расщеплении гликозидных связей при сравнительно малых температурах – около 23°C [11]. Результаты представлены на рис. 1.

Согласно приведенной хроматограмме, установлено, что в водорастворимом полисахаридном комплексе идентифицированы галактуроновая кислота и ксилоза. В пектине же обнаружены галактуроновая кислота и рамноза. Такие сахара, как арабиноза и галактоза, в наших исследуемых образцах не обнаружены.

Следующим этапом исследования было определение содержания ВРПК и ПВ в образцах пихты сибирской шишек.

Таблица 1

**СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ
ПОЛИСАХАРИДОВ ШИШЕК ПИХТЫ
СИБИРСКОЙ ПО МЕТИЛЕНОВОМУ СИНЕМУ**

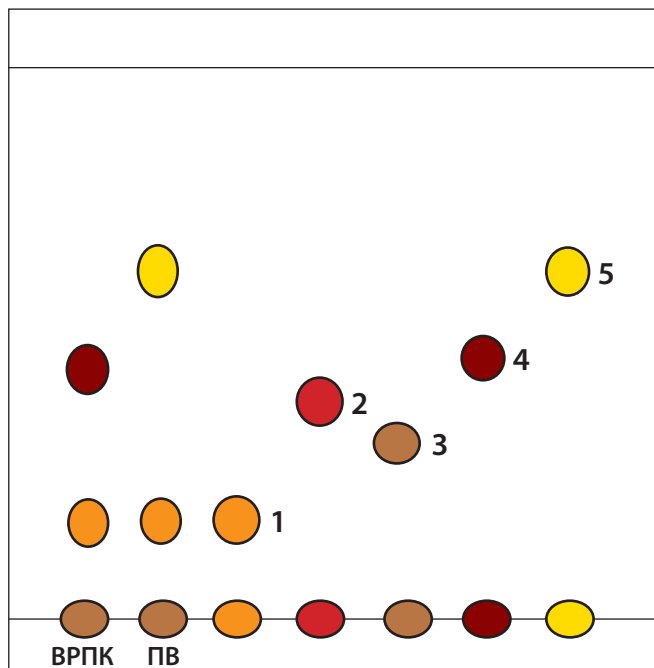


РИС. 1. Схема хроматограммы полисахаридов пихты сибирской шишек: 1 – галактуроновая кислота ($R_f=0,10$), 2 – арабиноза ($R_f=0,37$), 3 – галактоза ($R_f=0,30$), 4 – ксилоза ($R_f=0,48$), 5 – рамноза ($R_f=0,64$)

В результате определения содержания полисахаридных фракций в шишках пихты сибирской установлено большое количество пектиновых веществ: ВРПК – $1,62 \pm 0,19\%$, а ПВ – $2,84 \pm 0,18\%$.

По результатам исследования установлено, что полисахаридные фракции шишек пихты сибирской проявляют выраженную сорбционную активность (табл. 1). Водорастворимый полисахаридный комплекс шишек пихты сибирской проявляет наибольшую сорбционную активность, достоверно превышающую активность препаратов сравнения – угля активированного и полифепана. Пектиновые вещества шишек пихты сибирской работают на уровне препаратов сравнения.

Полисахаридные фракции пихты сибирской шишек показали высокую активность по связыванию токсинов со средней молекулярной массой. Представляло интерес определить способность исследуемых полисахаридов связывать токсины белковой природы.

Вещество	Сорбционная активность, мг/г
ВРПК пихты сибирской шишек	$303,89 \pm 8,89^{*1*2}$
ПВ пихты сибирской шишек	$239,22 \pm 15,16$
Уголь активированный	$230,9 \pm 2,34$
Полифепан	$250,48 \pm 5,78$

Примечания: ^{*1} По отношению к углю активированному (t-test) – t-критерий Стьюдента $p < 0,05$.
^{*2} По отношению к полифепану (t-test) – t-критерий Стьюдента $p < 0,05$

По результатам исследования установлено, что водорастворимый полисахаридный комплекс шишек пихты сибирской обладает выраженной сорбционной активностью (табл. 2) по способности связывать белки. Сорбционная активность ВРПК шишек пихты достоверно превышает активность препарата сравнения. Пектин шишек пихты сибирской не обладает способностью сорбировать вещества белковой природы.

Таблица 2

**СОРБЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ
ПОЛИСАХАРИДОВ ШИШЕК ПИХТЫ
СИБИРСКОЙ ПО АЛЬБУМИНУ**

Вещество	Сорбционная активность, мг/г
Пектин	$73,41 \pm 21,7$
ВРПК	$855,46 \pm 23,48^*$
Полисорб (препарат сравнения)	$328,14 \pm 32,74$

Примечание: * $p < 0,05$ по отношению к препарату сравнения

Таблица 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
МОЛЕКУЛЯРНОЙ МАССЫ**

Вещество	Характеристическая вязкость	Молекулярная масса
ПВ	0,75	10627,86
ВРПК	0,251	4270,20

Сорбционная активность ВРПК и ПВ пихты сибирской шишек различается, также различается и состав полисахаридов. Кроме моносахаридного состава, сорбционная активность может зависеть от молекулярной массы полисахаридов.

По результатам исследования (табл. 3) установлено, что пектиновые вещества шишек пихты сибирской имеют молекулярную массу выше, чем у водорастворимого полисахаридного комплекса.

ВЫВОДЫ

По результатам исследования установлено, что в водорастворимом полисахаридном комплексе обнаружены галактуроновая кислота и ксилоза. В пектине же обнаружены галактуроновая кислота и рамноза. Водорастворимый полисахаридный комплекс шишек пихты сибирской проявляет наибольшую сорбционную активность, достоверно превышающую активность препаратов сравнения, по метиленовому синему и альбумину. Наблюдается обратная зависимость молекулярной массы полисахарида и его сорбционной активности.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zhan Y., An X., Wang S., Sun M., Zhou H. *Basil polysaccharides: A review on extraction,*

bioactivities and pharmacological applications // Bioorg. Med. Chem. 2020; 28(1): 115179. DOI: 10.1016/j.bmc.2019.115179.

2. Xu R.B., Yang X., Wang J., Zhao H.T., Lu W.H., Cui J., Cheng C.L., Zou P., Huang W.W., Wang P., Li W.J., Hu X.L. *Chemical Composition and Antioxidant Activities of Three Polysaccharide Fractions from Pine Cones // Int.J. Mol. Sci.* 2012; (13): 14262–14277. DOI: 10.3390/ijms131114262.

3. Zou P., Yang X., Huang W.W., Zhao H.T., Wang J., Xu R.B., Hu X.L., Shen S.Y., Qin D. *Characterization and bioactivity of polysaccharides obtained from pine cones of Pinus koraiensis by graded ethanol precipitation // Molecules.* 2013; 18: 9933–9948. DOI: 10.3390/molecules18089933.

4. Zhao Q., Qin J., Wang H., Wang J., Zhang X. *Effects of different extraction methods on the properties of pine cone polysaccharides from Pinus koraiensis // BioRes.* 2019; 14(4): 9945–9956. DOI: 10.15376/biores.14.4.9945-9956.

5. Grimaldi R., Swann J.R., Vulevic J., Gibson G.R., Costabile A. *Fermentation properties and potential prebiotic activity of Bimuno galacto-oligosaccharide (65% galacto-oligosaccharide content) on in vitro gut microbiota parameters // British Journal of Nutrition.* 2016; (116): 480–486. DOI: 10.1017/S0007114516002269.

6. Гуляев Д.К., Суменкова А.М., Белоногова В.Д., Рудакова И.П., Курицын А.В. *Сорбционная активность полисахаридов древесной зелени и шишек сосны обыкновенной // Вестник Смоленской государственной медицинской академии.* 2020; 19(3): 208–213. DOI: 10.37903/vsgma.2020.3.29.

7. Bailey R.W., Haq S., Hassid W.Z. *Carbohydrate composition of particulate preparations from mung bean (Phaseolus aureus) shoots // Phytochemistry.* 1967; 6(2): 293–301.

8. Оленников Д.Н., Танхаева Л.М. *Методика количественного определения группового*

- состава углеводного комплекса растительных объектов // *Химия растительного сырья*. 2006; (4): 29–33.
9. Решетников В.И. Принципы разработки лекарственных форм сорбентов. – Пермь: ГОУ ВПО ПГФА Росздрава, 2008. – 196 с.
10. Карибова Т.Г., Аджиахметова С.Л., Мырко Л.П., Оганесян Э.Т. Некоторые физико-химические характеристики полисахаридов ягод крыжовника отклоненного *Grossularia reclinata* (L.) MILL. // *Фармация и фармакология*. 2015; 10(3): 49–52.
11. Nejat-zadeh-Barandozi F., Tahmasebi S. FT-IR study of the polysaccharides isolated from the skin juice, gel juice, and flower of Aloe vera tissues affected by fertilizer treatment // *Organic and Medicinal Chemistry Letters*. 2012; (2): 33–42. DOI: 10.1186/2191-2858-2-33.

SORPTION ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES OF SIBERIAN FIR CONES

D.K. Gulyaev, V.D. Belonogova

Perm State Pharmaceutical Academy, Perm, Russia

Polysaccharide fractions were obtained from Siberian fir cones. The monosaccharide composition was determined by ascending chromatography on paper. The content of polysaccharides was determined by the modified Draywood method. The sorption activity of polysaccharides was determined by methylene blue and albumin, activated carbon and polysorb were used as comparison preparations. Water-soluble polysaccharides of fir cones consist of galacturonic acid and xylose. Galacturonic acid and rhamnose were found in the composition of pectin. Fir cones contain pectin substances in large quantities. Water-soluble polysaccharides of Siberian fir cones have a pronounced sorption activity. The inverse dependence of the molecular weight of the polysaccharide and its sorption activity is observed.

Keywords: Siberian fir, cones, polysaccharides, sorption activity, molecular weight