

УДК 547:615.11

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В СЛОЕВИЩЕ *CETRARIA ISLANDICA*

¹Коберник А.А., ^{1,2}Кравченко И.А., ³Червоненко Е.Ф., ²Михайлова Т.В.,
¹Набих М.

¹Одесский национальный университет имени И.И. Мечникова;

²Физико-химический институт имени А. В. Богатского НАН Украины, Одесса

³ПАО «Киевмедпрепарат», koberni@mail.ru

В результате проведенных исследований определено содержание ряда биологически активных веществ в слоевище *Cetraria islandica*.

Ключевые слова: мхи, биологически активные вещества, усниновая кислота, лишайник.

Введение

В настоящее время продолжает расти интерес к лекарственным растениям и препаратам на их основе, которые обладают достаточно выраженным воздействием на биологические процессы организма при минимальных побочных токсических эффектах.

Значительный интерес к лекарственным растениям связан с наличием в них комплекса биологически активных веществ (БАВ). Препараты, получаемые из лекарственных растений, как правило, малотоксичны и высокоэффективны. Поэтому фармацевтический рынок в значительной степени насыщен фитопрепаратами, предназначенными для введения в организм различными путями. В настоящее время востребованы наружные лекарственные средства, содержащие в качестве действующих веществ извлечения из растительного сырья. Практический опыт показывает, что такие препараты оказываются более эффективными, им свойственно пролонгированное и разнонаправленное фармакологическое действие [1].

Фармацевтический рынок Украины располагает множеством фитопрепаратов, которые разнообразны как по своей видовой принадлежности, так и по направленности фармакотерапевтичес-

кого эффекта. Менее изучены на данный момент биофармацевтические и фармакологические свойства мхов, несмотря на то, что их целебные свойства в медицине известны с 17 века. Особый интерес представляет исландский мох или *Cetraria islandica*. Содержание в слоевище *Cetraria islandica* биологически активных веществ различных фармакологических групп, обуславливает довольно широкое ее использование в официальной и народной медицине для лечения болезней желудочно-кишечного тракта (гастритов, язв), дистрофий, общего истощения, заболеваний дыхательных путей и легких (бронхит, кашель различной интенсивности, бронхиальная астма, туберкулез), инфекционных заболеваний кожи, ожогов и опрелостей, нарушений деятельности щитовидной железы, анемии [2].

Противокашлевое и противорвотное действие этих препаратов обусловлено наличием полисахаридов. Слизистые вещества *Cetraria islandica* действуют на слизистую верхних дыхательных путей, поэтому применяются при бронхите с сильным кашлем, бронхиальной астме, коклюше, хроническом бронхиальном катаре. При желудочно-кишечных заболеваниях, слизь *Cetraria islandica* стабилизирует выделительную функцию желез желудка при гиперацид-

ном гастрите, язве желудка и двенадцатиперстной кишки, ослабляет рвотные позывы при раннем токсикозе беременных. Наличие дубильных веществ в *Cetraria islandica* позволяет применять ее как вяжущее и бактерицидное средство при воспалительных процессах слизистых оболочек, при ожогах, при нарушении деятельности желудочно-кишечного тракта, а также как вяжущее средство при отравлении тяжелыми металлами и растительными ядами [3].

Противовоспалительное действие основано на том, что, покрывая тонким слоем очаг поражения, они препятствуют дальнейшему раздражению и ускоряют регенерацию поврежденных тканей [4].

Наибольшую ценность среди БАВ *Cetraria islandica* представляют лишайниковые кислоты, малорастворимые в воде, но растворимы в щелочной среде. Среди лишайниковых кислот практическое применение нашла усниновая кислота, обладающая сильным антибактериальным действием в отношении стафилококков, стрептококков и микобактерий [5, 6].

Из-за высокого содержания полисахаридов в сочетании с микроэлементами *Cetraria islandica* является ценным иммуномодулирующим средством. Полисахариды *Cetraria islandica* обладают антигипотоксичными свойствами, они относятся к интерфероностимуляторам и адаптогенам [2].

Все это указывает на перспективность использования *Cetraria islandica* как объекта для дальнейшего изучения ее химического состава, а также для определения механизмов фармакотерапевтических эффектов.

Целью работы была идентификация и количественное определение БАВ *Cetraria islandica*, произрастающей в украинских Карпатах.

Материалы и методы исследования

Для анализа использовали слоевище *Cetraria islandica*, сырье было со-

брано в Ивано-Франковской области.

Выделение аскорбиновой и фолиевой кислот из исследуемого сырья проводили путем его 3^х кратной водной экстракции при нагревании ($t^\circ =$ не более 60 $^\circ\text{C}$) [7].

Идентификацию аскорбиновой кислоты в полученном экстракте проводили по реакции с нитратом серебра (образуется темный осадок металлического серебра – фармакопейная реакция) и с сульфатом железа (II) в присутствии гидрокарбоната натрия (образуется аскорбинат натрия – фиолетовая окраска раствора). Количественное содержание аскорбиновой кислоты определяли методом йодометрии. Фолиевую кислоту идентифицировали благодаря ее кислотным свойствам, так как она с солями тяжелых металлов образует нерастворимые характерно окрашенные комплексы: с сульфатом меди (II) – зеленый, с нитратом кобальта – темно-желтый, с хлоридом железа (III) – красно-желтый осадок [8].

Выделение и количественное определение полисахаридов проводили согласно стандартной методике (ст. 20 ДФ XI). Выделение основано на водной экстракции при нагревании, с последующим центрифугированием и фильтрацией (раствор А). Полученный раствор смешивали с этанолом (96 %) в соотношении 1 : 3 и нагревали на водяной бане для лучшей коагуляции осадка, потом отстаивали и фильтровали. В полученном осадке идентифицировали восстанавливающие моносахариды по образованию кирпично-красного осадка окиси меди (I) с реактивом Фелинга при нагревании (после предварительного добавления хлористоводородной кислоты). Строение и преобладающие конформации полученных полисахаридов определяли методом ядерного магнитного резонанса на ядрах ^{13}C на приборе Bruker AVANCE DRX 500 (500 МГц) для ~ 25 % растворов в D_2O при температуре 60 $^\circ\text{C}$, внутренний стандарт – MeOH [9].

Для количественного определения использовали прокоагулировавший со спиртом осадок, его нагревали при 30 °С в течении 5 мин, центрифугировали, полученный осадок переносили на фильтр и последовательно промывали 30 % этанолом, ацетоном и этилацетатом, после чего фильтр с осадком высушивали до постоянного веса (на каждом этапе проводили взвешивание). Содержание полисахаридов рассчитывали по формуле:

$$x = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - W)} \quad \text{где}$$

m_1 — масса фильтра, г; m_2 — масса фильтрата с осадком, г; m — масса сырья, г; W — потеря в массе при высушивании сырья, %.

Выделение усниновой кислоты проводили путем экстракции бензолом (при нагревании). Экстракт настаивали, после чего растворитель отгоняли, а полученный сухой остаток обрабатывали хлороформом и спиртом с последующей их отгонкой. В полученном сухом остатке определяли усниновую кислоту. Идентификация основана на характерных реакциях: в спиртовом растворе с хлорным железом – коричнево-красная окраска, а с реактивом Эрлиха – синяя окраска (реакция идет при нагревании до тех пор, пока раствор не станет красно-бурого цвета, а потом при добавлении этилового спирта он приобретает интенсивную синюю окраску [10]. Идентификация выделенной усниновой кислоты была проведена с помощью масс-спектрометрии.

Дубильные вещества экстрагировали из сырья горячей водой, с последующей обработкой органическими растворителями для очистки от возможных примесей. Наличие дубильных веществ определяли с помощью качественных реакций (с солями железа, нитритом натрия в кислой среде) по образованию соответствующей окраски растворов. Идентификацию танина проводили методом ТСХ [11]. Количествен-

ное определение дубильных веществ проводили по методу Левенталья, который основан на окислении танина марганцевокислым калием в присутствии индигокармина [6].

Обсуждение результатов

По результатам проведенных исследований установлено наличие в слоевище *Cetraria islandica* ряда БАВ, их содержание в 100 г сырья приведено в таблице 1.

Сравнивая полученные результаты с опубликованными данными других авторов, следует отметить, что *Cetraria islandica*, собранная в Ивано-Франковской области содержит 73 % полисахаридов, тогда как сырье, собранное в Финляндии и Магаданской области, – 50 % и 70 %, соответственно [12]. Выделенные полисахариды были идентифицированы с помощью ^{13}C ЯМР спектроскопии, преимущественное их большинство представлено изолихеноном.

Из литературы известно, что усниновая кислота обладает бактериостатическим действием. Механизм ее антибиотического действия обусловлен прекращением окислительного фосфорилирования у бактерий. Из 100 г *Cetraria islandica* было выделено 0,944 г усниновой кислоты, которую идентифицировали с помощью масс-спектрометрии. Наличие молекулярного пика 344 свидетельствует о наличии усниновой кислоты, вместе с тем, в спектре присутствует молекулярный пик 386, соответствующий гирофоровой кислоте. Таким образом, следует, что в экстракте усниновой кислоты присутствует примесь гирофоровой кислоты.

При исследовании лишайников рода *Usneaceae* выход усниновой кислоты составил 2,5 % [11,13], такую разницу (примерно 1,5 %,) в показателях объясняет видовая принадлежность мхов, поскольку исследованное нами сырье – *Cetraria islandica* относится к роду *Parmeliaceae*.

Методом ТСХ установлено наличие

Таблица 1 перспективы научных исследований в области создания лекарств из растительного сырья. М. – 1985. – С. 110-114.

Содержание некоторых БАВ в 100 г сырья исландского мха

БАВ	г/100 г сырья
Аскорбиновая кислота	0,176
Полисахариды	73
Усниновая кислота	0,944
Дубильные вещества	6,1

5. Vladimirova I. N. Extracted compounds from *Cetraria islandica* / I. N. Vladimirova, V. A. Georgiyants // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49, №. 2. – P. 347-348.

в исследуемом сырье танина. Его содержание составляет 6,1 г/100г сырья (количественное определение основано на окислении в присутствии индигокармина).

Выводы

Таким образом, нами был исследован химический состав слоевища *Cetraria islandica* (сырье было собрано в Ивано-Франковской области). С помощью качественного и количественного определения идентифицирован ряд БАВ, которые обуславливают широкий спектр фармакологической активности.

Основываясь на полученных результатах химического анализа, можно сделать вывод, об актуальности дальнейшего изучения фармакологического действия *Cetraria islandica*.

Литература

1. Попова О.И. Полисахариды омелы белой / О.И. Попова, Д. А. Муравьева // Фармация. – 1990. – №3. – С. 41-44.
2. Криштанова Н.А. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств / Н. А. Криштанова, М.Ю. Сафонова, В.Ц. Болотова, Е.Д. Павлова // Вестник ВГУ. – 2005. – №1. – С. 212-221
3. Исламбеков Ш.Ю. Растительные дубильные вещества / Ш.Ю. Исламбеков, А.К. Каримджанов, С.М. Мавлянов // Химия природных соединений. – 1990. – №3. – С. 293-307.
4. Оспищева Л.А. О противовоспалительных и гемостатических свойствах некоторых полифенолов и растительных полисахаридов / Л.А. Оспищева, Г.В. Оболенцева, А.Г. Сербин // Результаты и

6. Аньшакова В.В. Интенсификация процессов получения природных веществ антибиотического действия из лишайникового сырья с использованием механохимической технологии / В.В. Аньшакова, Б.М. Кершенгольц, В.И. Аньшаков // Химия растительного сырья. – 2011. – №2. – С. 133-136.
7. Ковальов В.М. Практикум по фармакогнозії/ Ковальов В.М., Попова Н.В., Кисличенко В.С., Ісакова Т.І., Журавель І.О. – Харків.: Видавництво НФаУ «Золоті сторінки», 2003. – 44 с.
8. Безуглий П.О. Фармацевтична хімія/ Безуглий П.О. – Вінниця.: «Нова книга», 2006. – 341 с.
9. Шемякин М. М. Химия антибиотических веществ/ Шемякин М. М., Хохлов А. С. – М.: «Высшая школа», 1953. – 48 с.
10. Nakomori S. On the structure of the capsular polysaccharide/ Nakomori S. J. Biochem. (Tokio), 1964. – V.55. – P.205 – 208.
11. Хворост О.П. Сравнительная количественная оценка содержания дубильных веществ у *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. / О.П. Хворост, В.В. Беликов, А.Г. Сербин, Н.Ф. Комиссаренко // Растительные ресурсы. – 1986. – Т.22. – 1986. – Вып. 2. – С. 258-262.
12. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals// Wichtl M. (BissetNGed.) Englished. BocaRaton, FL, CRCPress, 1994 – P. 48.
13. Горшкова Р.П. Структурное исследование полисахаридов лишайников *Cetraria siscilata* и *C.islandica* / Р.П. Горшкова, Е.Л. Назаренко, В.А. Зубков, Л.С. Степаненко, В.В. Исаков// Биоорганическая химия. – 1997. – т. 23 № 2. – С. 134-138.

References

1. Popov O.I. Polysaccharides mistletoe/ O.I. Popov, D.A. Muravyeva // Pharmacy. – 1990. – №3. – P. 41-44 [in Russian].
2. Krishtanova N.A. Prospects of using of plant polysaccharides as therapeutic and preventive agents / N.A. Krishtanova, M.Y. Safonov, V.C. Bolotov, E.D. Pavlov // Vestnik VSU. – 2005. – №1. – P. 212-221 [in Russian].
3. Islambek Sh.Yu. Plant tannins /Sh.Yu. Islambek, A.K Karimdzhanov, S.M Mavlyanov // Chemistry of Natural Compounds. – 1990. – №3. – P. 293-307 [in Russian].
4. Ospischeva L.A. About inflammatory and hemostatic properties of some polyphenols and plant polysaccharides / L.A. Ospischeva, G.V. Obolentseva, A.G. Serbin // Results and prospects of research in the field of herbal medicines. M. – 1985. – P. 110-114 [in Russian].
5. Vladimirova I. N. Extracted compounds from *Cetraria islandica* / I. N. Vladimirova, V. A. Georgiyants // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – Vol. 49, №. 2. – P. 347-348.
6. Anshakova V.V. Intensification of production of natural substances antibiotic activity of lichen raw materials using mechanochemical technology / V.V. Anshakova, B.M. Kershengolts, V.I. Anshakov // Chemistry of plant raw materials. — 2011. — №2. — P. 133-136 [in Russian].
7. Kovalev V.M. A workshop on the pharmacognosy / Kovalev VM, Popova NV, Kislichenko VS Isakova T.I., Juravel I.O. – Kharkiv.: “Zoloti storinki”. – 2003. – 44 p [in Ukrainian].
8. Bezuglyi P.A. Pharmaceutical Chemistry / Bezuglyi P.A. — Vinnytsya.: “New Book”, 2006. – 341 p [in Russian].
9. Shemyakin M.M. Chemistry antibiotic substances / M.M. Shemyakin, A. Khokhlov – M.: “High School”, 1953. – 48 p [in Russian].
10. Hakomori S. On the structure of the capsular polysaccharide/ HakomoriS. J. Biochem. (Tokio), 1964. – V.55. – P.205 – 208.
11. Khvorost O.P. Comparative Quantification of tannins in *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. / O.P. Khvorost, V.V. Belikov, A.G. Serbin, N.F. Komissarenko // Plant Resources. – 1986. – T.22. – 1986 – Vol. 2. – P. 258-262 [in Russian].
12. Wichtl M. Herbal drugs and phytopharmaceuticals// Wichtl M. (BissetNGed.) Englished. BocaRaton, FL, CRCPress, 1994 – P. 48.
13. Gorshkov R.P. Structural Study of polysaccharides and lichens *Cetraria cuculata* and *C.islandica* / R.P. Gorshkov, E.L. Nazarenko, V.A. Zubkov, L.S. Stepanenko, V. Isakov // Bioorganic Chemistry. – 1997 – Vol. 23 № 2. – P. 134-138.

Резюме

ІДЕНТИФІКАЦІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У СЛАНІ *CETRARIA ISLANDICA*

Кобернік А.О., Кравченко І.А., Червоненко О.Ф., Михайлова Т.В., Набих М.

В результаті проведених досліджень визначено вміст ряду біологічно активних речовин у слані *Cetraria islandica*.

Ключові слова: біологічно активні речовини, уснінова кислота, полісахариди.

Summary

THE IDENTIFICATION OF ACTIVE COMPOUND CONTENT IN THE THALLUS *CETRARIA ISLANDICA*

Kobernik A.O., Kravchenko I.A., Chervonenko O.F., Myhaylova T.V., Nabych M.

The study determined the content of a number of biologically active substances in the thallus *Cetraria islandica*.

Keywords: *biologically active substances, usnic acid, polysaccharide.*

Впервые поступила в редакцию 27.04.2015 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования