

ИССЛЕДОВАНИЕ УГЛЕВОДОВ ПОДЗЕМНЫХ ОРГАНОВ ЛИЛЕЙНИКА БУРО-ЖЕЛТОГО (*HEMEROCALLIS FULVA* L.) И ЛИЛЕЙНИКА ГИБРИДНОГО (*HEMEROCALLIS HYBRIDA* VAR. «*STELLA DE ORO*»)

[С. М. Марчишин¹](#), [Е. В. Заричанская²](#), [М. С. Гарнык²](#), [Т. И. Ющенко²](#)

¹ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени
И. Я. Горбачевского МЗ Украины» (г. Тернополь, Украина)

²Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова (г. Винница,
Украина)

Гравиметрическим методом в корнеклубнях двух видов рода Лилейник (*Heimerocallis* L.) определено общее содержание водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ. Качественный состав сахаров в сырье и их количественное соотношение исследованы методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Установлено, что корнеклубни лилейников характеризуются высоким содержанием полисахаридов, в структуре которых преобладают сахароза и фруктоза.

Ключевые слова: лилейник буро-желтый (*Heimerocallis fulva* L.), лилейник гибридный (*Heimerocallis hybrida* var. «*Stella De Oro*»), водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, моносахариды, гравиметрия, газо-жидкостная хромато-масс-спектрометрия

Марчишин Светлана Михайловна — доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с медицинской ботаникой ГВУЗ «Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского МЗ Украины», рабочий телефон: 8-10-380-352-520518, e-mail: svitlanafarm@ukr.net

Заричанская Елена Васильевна — ассистент кафедры фармацевтической химии Винницкого национального медицинского университета имени Н. И. Пирогова, рабочий телефон: 8-10-380-432-524699, e-mail: lena.zarichanska@yandex.ua

Гарнык Мирослава Сергеевна — кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии Винницкого национального медицинского университета имени Н. И. Пирогова, рабочий телефон: 8-10-380-432-524699, e-mail: garna-mura@yandex.ru

Ющенко Татьяна Ивановна — кандидат химических наук, доцент, заведующий

Введение. Нерациональное использование природных ресурсов и истощение запасов дикорастущих лекарственных растений побуждают к поиску перспективных видов среди культивируемой флоры. Род Лилейник (*Hemerocallis* L.) относится к подсемейству *Hemerocallidaceae* семейства *Xanthorrhoeaceae* и объединяет 18 видов, в дикорастущем виде распространенных в Юго-Восточной Азии, Сибири, Европе, Северной Америке и широко культивируемых повсеместно как цветочно-декоративные. Карл Линней дал лилейникам родовое название *Hemerocallis*, подчеркивая кратковременность жизни цветка (от греч. *heme* — день и *callos* — красота). Усилиями селекционеров в настоящее время получены гибридные формы лилейников, объединенные видовым названием — *Hemerocallis hybrida*, насчитывающие сотни высокодекоративных сортов-культураров. В странах Европы, Северной Америки, в России и Украине лилейники распространены в качестве высокодекоративных цветочных растений, однако в странах Дальнего Востока, а именно — в Китае и Японии, различные виды сырья лилейников издревле использовались с целью лечения многих заболеваний человека. Отвар корнеклубней лилейника рекомендован традиционной китайской медициной для лечения заболеваний печени и поджелудочной железы, гинекологической сферы; настой цветков используется в народной медицине в качестве ранозаживляющего, обезболивающего и тонизирующего средств, при сердечно-сосудистых заболеваниях; настой листьев лилейника известен в Китае и Японии как антидепрессивное, успокоительное и противовоспалительное средство [5].

Потенциал биологически активных веществ и природный ресурс сырья лилейников в настоящее время используется недостаточно. Поэтому фармакогностическое исследование корнеклубней, цветков и листьев растений рода Лилейник (*Hemerocallis* L.) представляется перспективным направлением современной фитохимии, фармации и фармакологии.

Известно, что корни растений, особенно утолщенные, накапливают вещества первичного синтеза — углеводы. Исследование количественного содержания и качественного состава углеводов корнеклубней лилейника буро-желтого и лилейника гибридного является целесообразным в связи с тем, что углеводы, кроме важного функционального значения и специфической фармакологической активности, также оказывают влияние на развитие суммарного фармакологического эффекта препаратов, полученных из растительного сырья.

Цель исследования — определение, выделение и изучение полисахаридов подземных органов двух видов лилейников, а также анализ их моносахаридного состава. Сырье (корнеклубни лилейника буро-желтого (*Hemerocallis fulva* L.) и лилейника гибридного (*Hemerocallis hybrida* var. «*Stella De Oro*»)) заготовлено в сентябре 2014 года на исследовательских участках отдела декоративно-цветочных растений Национального ботанического сада имени Н. Н. Гришка НАН Украины (г. Киев, Украина).

Материалы и методы исследования. Определение количественного содержания полисахаридов в двух образцах сырья проводили гравиметрическим методом. Качественный состав и количественное соотношение сахаров были установлены методом

газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии после кислотного гидролиза полисахаридного комплекса [2, 4].

Перед проведением физико-химических исследований в сырье с помощью качественной гистохимической реакции был выявлен инулин, который принадлежит к классу гомополисахаридов; мономером является фруктоза. Именно наличием этого вещества можно обосновать использование подземных органов лилейников в традиционной медицине Китая при заболеваниях поджелудочной железы, печени и сахарном диабете. Сначала гистохимической реакцией с раствором Люголя в подземных органах лилейника буро-желтого и лилейника гибридного было исключено наличие крахмала (реакция отрицательная). Затем с помощью реакции Моллиша (α -нафтол и концентрированная серная кислота) было доказано наличие инулина (реакция положительная — появление бурого кольца в тканях корнеклубней двух образцов в результате воздействия соответствующих реактивов).

Гравиметрический метод определения количественного содержания полисахаридов в растительном сырье является фармакопейным. Перед выделением полисахаридного комплекса отделяли липофильные вещества [1].

Точную навеску сырья помещали в колбу со шлифом объемом 250 мл, добавляли 200 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при помешивании 30 мин. Экстракцию повторяли еще дважды, используя в первый раз 200 мл, во второй — 100 мл воды очищенной. Водные экстракты объединяли, центрифугировали и надосадочную жидкость декантировали в мерную колбу объемом 500 мл сквозь 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 55 мм и предварительно промытую водой очищенной. Фильтры промывали водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещали в пробирку для центрифугирования, добавляли 75 мл 95 % спирта этилового, перемешивали, подогревали на водной бане до 30 °С на протяжении 5 мин. Через 60 мин содержимое пробирки центрифугировали с частотой 5000 об/мин 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали под вакуумом при остаточном давлении 13–16 кПа сквозь высушенный до постоянной массы при температуре 100–105 °С стеклянный фильтр ПОР-16 диаметром 40 мм. Осадок количественно переносили на фильтр, постепенно промывая 15 мл раствора 95 % спирта этилового в воде очищенной (3 : 1), 10 мл ацетона и 10 мл этилацетата. Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, а затем при температуре 100–105 °С до постоянной массы.

Для отделения спирторастворимых веществ шрот, полученный после выделения липофильной фракции, экстрагировали 82 % спиртом этиловым в соотношении 1 : 10 и настаивали при комнатной температуре 2 ч. Полученный экстракт отфильтровывали, а шрот опять заливали таким же объемом спирта этилового на 2 ч. После удаления спирторастворимых соединений, выделяли фракцию водорастворимых полисахаридов (ВРПС). Сухой шрот экстрагировали горячей водой в соотношении 1 : 10 при нагревании до температуры 95 % на протяжении 60 мин при постоянном перемешивании. Повторное извлечение проводили в соотношении шрот-экстрагент 1 : 10. Полученные вытяжки отделяли от сырья, объединяли и выпаривали до 1/5 от начального объема. ВРПС осаждали троекратным объемом 96 % этанола при комнатной температуре. Осадки, которые образовывались, выделяли, промывали 96 % этанолом, ацетоном, высушивали и взвешивали.

Количественное содержание ВРПС рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times 100},$$

где m_1 — масса фильтра, г;
 m_2 — масса фильтра с осадком, г;
 m — масса сырья, г.

Шрот, оставшийся после извлечения ВРПС, использовали для получения пектиновых веществ (ПВ). Для этого шрот экстрагировали дважды смесью 0,5 % растворами кислоты оксалатной и аммония оксалата (1 : 1) в соотношении шрот-экстрагент 1:20 при температуре 80-85 °С 2 ч. Объединённые экстракты концентрировали и осаждали пятикратным объемом 96 % этанола. Полученные осадки отфильтровывали, промывали этанолом, высушивали и взвешивали [2].

Результаты и обсуждения. В результате проведенных исследований из подземных органов лилейника буро-желтого и лилейника гибридного выделены ВРПС и ПВ. Выход ВРПС в корнеклубнях лилейника буро-желтого составил 20,23 %, в корнеклубнях лилейника гибридного — 22,78 %; выход ПВ — 3,88 и 3,38 % соответственно. Результаты определения количественного содержания ВРПС и ПВ в корнеклубнях лилейника буро-желтого и лилейника гибридного представлены в табл. 1.

Таблица 1

Количественное содержание водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ в корнеклубнях лилейника буро-желтого и лилейника гибридного

Сырье	ПС	Масса сырья, г	Содержание ПС, г	Выход ПС, %
Корнеклубни лилейника буро-желтого	ВРПС	9,8675	1,9962	20,23
	ПВ	7,2113	0,2798	3,88
Корнеклубни лилейника гибридного	ВРПС	17,6754	4,0274	22,78
	ПВ	11,0255	0,3731	3,38

Примечание: ПС — полисахариды; ВРПС — водорастворимые полисахариды; ПВ — пектиновые вещества

Использование газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии позволяет со значительной точностью определить качественный состав и количественное содержание моносахаридов и сахарозы в растительном сырье. Метод основан на экстракции свободных сахаров после гидролиза полисахаридного комплекса и получении ацетатов их альдонитрильных производных с последующим анализом. Хроматографическое разделение проводили на газовой хромато-масс-спектрометрической системе Agilent 6890N/5973inert (Agilent technologies, USA). Колонка капиллярная HP-5ms (30 m × 0,25 mm × 0,25 mkm, Agilent technologies, USA). Температура выпаривателя — 250 °С, температура интерфейса — 280 °С. Разделение проводили в режиме программирования температуры — начальную температуру 160 °С выдерживали на протяжении 8 мин, поднимали с градиентом 5 °С/мин до 240 °С. Конечную температуру выдерживали на протяжении 6 мин. Пробу объемом 1 мкл вводили в режиме разделения потока 1 : 50. Детектирование проводили в режиме SCAN в диапазоне (38-400 m/z). Скорость потока газа-носителя 1,2 мл/мин. Идентификацию проводили по времени удержания стандартов моносахаридов с использованием библиотеки масс-спектров NIST 02; ацетиллированные спирты и сахара

распознавались МАСС-детектором. Количественный анализ проводили путем добавления раствора внутреннего стандарта в исследуемые пробы. В качестве внутреннего стандарта использовался раствор сорбитола. При обычных условиях дериватизации кетоглевод фруктоза переходит в альдоуглевод глюкозу. Однако разработанная методика позволяет при дериватизации получить два пика фруктозы, которые суммируются при подсчете результатов [3].

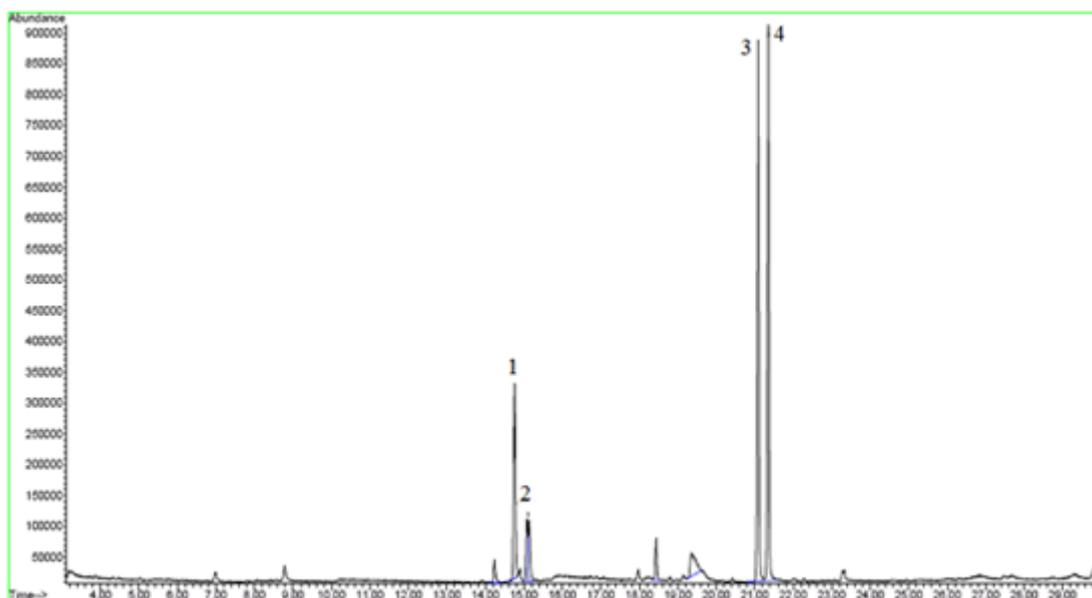


Рис. 1. Хроматограмма моносахаридов корнеклубней лилейника буро-желтого: 1 — глюкоза, 2 — манноза, 3, 4 — фруктоза

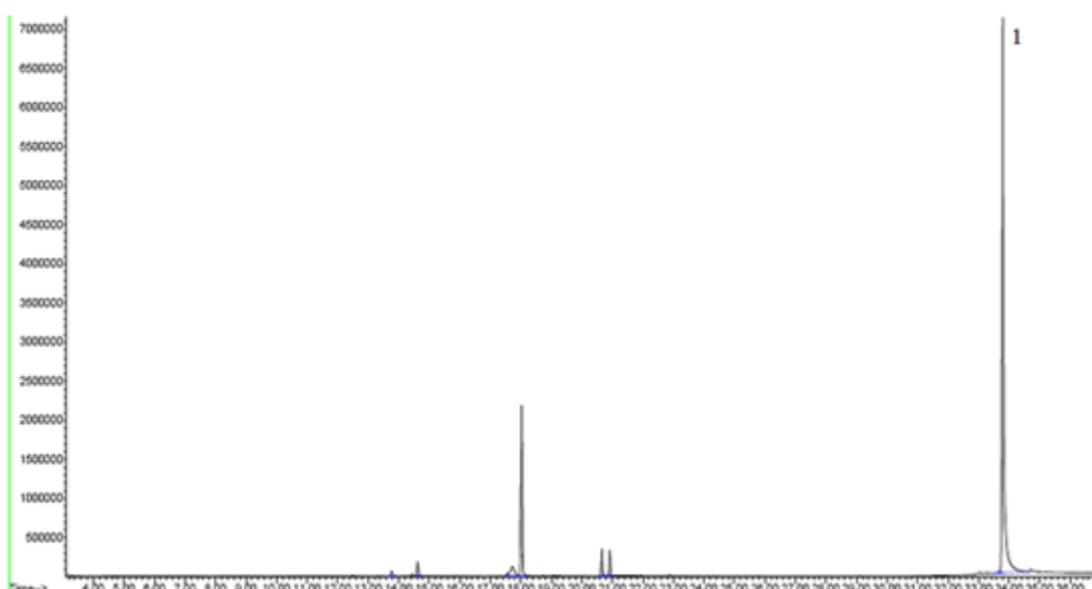


Рис. 2. Хроматограмма сахарозы корнеклубней лилейника буро-желтого: 1 — сахароза

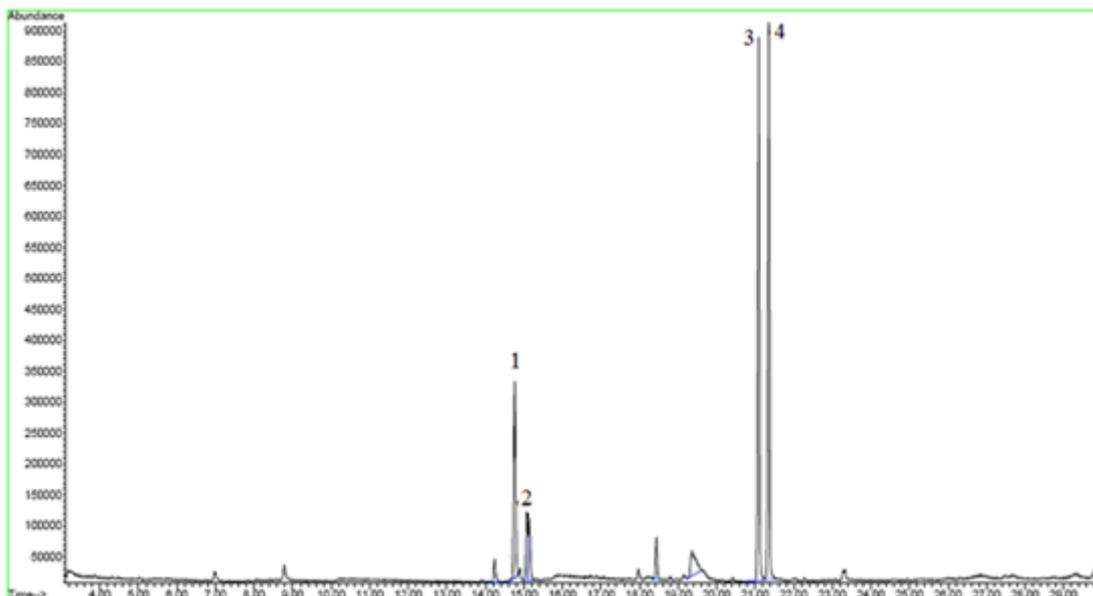


Рис. 3. Хроматограмма моносахаридов корнеклубней лилейника гибридного: 1 — глюкоза, 2 — манноза, 3, 4 — фруктоза

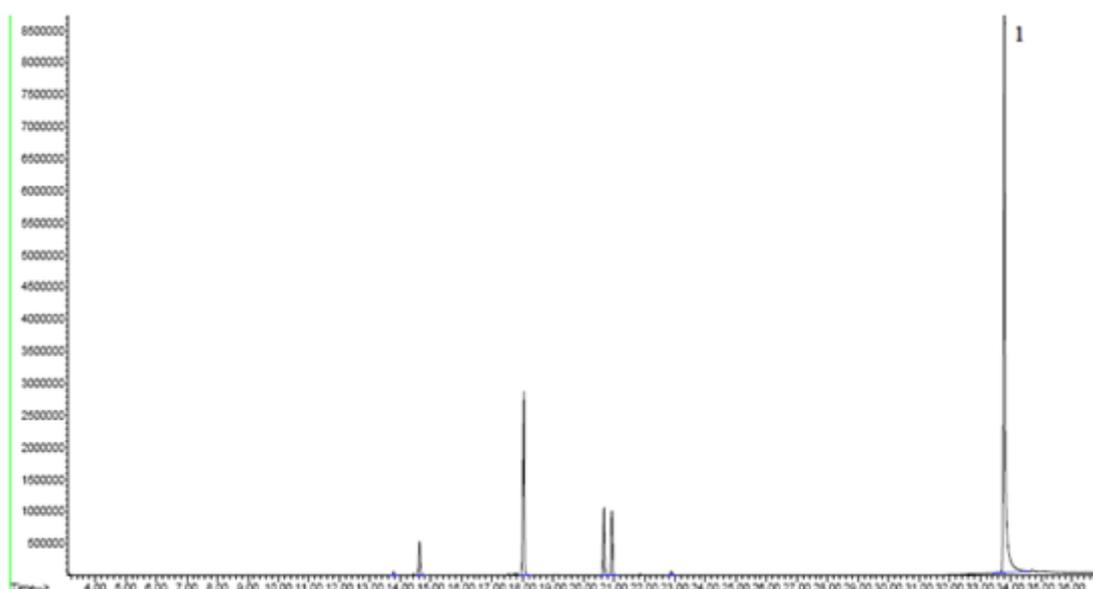


Рис. 4. Хроматограмма сахарозы корнеклубней лилейника гибридного: 1 — сахароза

Результаты исследования количественного содержания сахаров в корнеклубнях лилейника буро-желтого и лилейника гибридного представлены в табл. 2.

Таблица 2

Количественное содержание сахаров в корнеклубнях лилейника буро-желтого и лилейника гибридного

Моносахарид	Содержание в корнеклубнях лилейника буро-желтого, мг/кг	Содержание в корнеклубнях лилейника гибридного, мг/кг
Сахароза	110,59	95,27
Глюкоза	1,60	1,97
Фруктоза + х-компонент	24,42	19,89
Манноза	4,73	0,37

Выводы. Анализ результатов проведенных исследований свидетельствует о высоком содержании ВРПС и ПВ в образцах корнеклубней двух исследуемых видов лилейников. Состав сахаров корнеклубней лилейника буро-желтого и лилейника гибридного характеризуется преобладанием в количественном соотношении дисахарида сахарозы. Также обнаружено высокое содержание фруктозы, количество которой в исследуемых образцах корнеклубней значительно преобладает над количеством глюкозы. Исследуемые виды рода Лилейник (*Heimerocallis L.*) являются перспективными для использования в медицине и требуют расширенного фитохимического и фармакологического анализов.

Список литературы

1. Кацуба І. К. Дослідження полісахаридів мати-й-мачухи / І. К. Кацуба, О. М. Новосел, В. С. Кисличенко // Український медичний альманах. — 2013. — Т. 16, № 4. — С. 25-27.
2. Кисличенко В. С. Полисахариды *Brassica oleracea* var. *Italica* plenck / В. С. Кисличенко, И. Н. Владимирова // Химия природных соединений. — 2008. — № 1. — С. 61-62.
3. Оленников Д. Н. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов / Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева // Химия растительного происхождения. — 2006. — № 4. — С. 29-33.
4. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography / Y. Chen [et al.] // *Phytochem. Anal.* — 2009 — Vol. 20 (6). — P. 503-510.
5. The Antidepressant-like Effect of Ethanol Extract of Daylily Flowers in Rats / Shih-Hang Lin [et al.] // *Journal of Traditional and Complementary Medicine.* — 2013. — Vol. 3. — P. 53-61.

RESEARCH OF CARBOHYDRATES OF UNDERGROUND ORGANS OF DAY LILY BROWN-YELLOW (*HEMEROCALLIS FULVA* L.) AND DAY LILY HYBRID (*HEMEROCALLIS HYBRIDA* VAR. «*STELLA DE ORO*»)

[S. M. Marchishin¹](#), [E. V. Zarichanskaya²](#), [M. S. Garnyk²](#), [T. I. Yushchenko²](#)

¹SHPE «Ternopol state medical university n. a. I. Y. Gorbachevsky» of Ministry of Health of the Ukraine (Ternopol, the Ukraine)

²Vinnytsia national medical university n. a. N. I. Pirogov (Vinnytsia, Ukraine)

The general maintenance of water-soluble polysaccharides and pectinaceous substances is defined by gravimetric method in the pips of two types of the sort Day lily (*Hemerocallis* L.). Qualitative composition of Saccharums in raw materials and their quantitative ratio are investigated by method of liquid-gas chromato-mass spectrometry. It is established that pipes of day lilies are characterized by the high maintenance of polysaccharides in which structure sucrose and fructose prevail.

Keywords: day lily brown-yellow (*Hemerocallis fulva* L.), day lily hybrid (*Hemerocallis hybrida* var. «Stella De Oro»), water-soluble polysaccharides, pectinaceous substances, monosaccharides, gravitation measurements, liquid-gas chromato-mass spectrometry

About authors:

Marchishin Svetlana Mikhaelovna — doctor of pharmaceutical science, professor, head of chair of pharmacognosy with medical botany at SHPE «Ternopil state medical university n. a. I. Y. Gorbachevsky», office phone: 8-10-380-352-520518, e-mail: svitlanafarm@ukr.net

Zarichanskaya Elena Vasilyevna — assistant of pharmaceutical chemistry chair at Vinnytsia national medical university n. a. N. I. Pirogov, office phone: 8-10-380-432-524699, e-mail: [lena.zarichanska@yandex.ua](mailto:lana.zarichanska@yandex.ua)

Garnyk Miroslava Sergejevna — candidate of pharmaceutical science, assistant professor of pharmaceutical chemistry chair at Vinnytsia national medical university n. a. N. I. Pirogov, office phone: 8-10-380-432-524699, e-mail: garna-mura@yandex.ru

Yushchenko Tatyana Ivanovna — candidate of chemical science, assistant professor, head of pharmaceutical chemistry chair at Vinnytsia national medical university n. a. N. I. Pirogov, office number: 8-10-380-432-524699, e-mail: farm60@mail.ru

List of the Literature:

1. Katsuba I. K. Achievment of polysaccharides of foalfoot / K. Katsuba, O. M. Novosel, V. S.

- Kislichenko // Ukraine medical almanac. — 2013. — Vol. 16, N 4. — P. 25-27.
2. Kislichenko V. S. Polysaccharides of *Brassica oleacea* var. *Italica* plenck / V. S. Kislichenko, I. N. Vladimirova // Chemistry of natural compound. — 2008. — N 1. — P. 61-62.
 3. Olennikov D. N. Methodicc of quantitative definition of group structure of a carbohydrate complex of vegetable objects / D. N. Olennikov, L. M. Tankhayeva // Phytogenesis Chemistry. — 2006. — N 4. — P. 29-33.
 4. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography / Y. Chen [et al.] // Phytochem. Anal. — 2009 — Vol. 20 (6). — P. 503-510.
 5. The Antidepressant-like Effect of Ethanol Extract of Daylily Flowers in Rats / Shih-Hang Lin [et al.] // Journal of Traditional and Complementary Medicine. — 2013. — Vol. 3. — P. 53-61.