

РАЦИОНАЛИЗИРОВАННАЯ МЕТОДИКА КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И ЕЕ ВАЛИДАЦИЯ

Н. А. Дьякова¹, И. А. Самылина², А. И. Сливкин¹, С. П. Гапонов¹, А. А. Мындра¹

¹Воронежский государственный университет

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Поступила в редакцию 20.03.2015 г.

Аннотация. Модифицирована методика гравиметрического определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого с целью интенсификации процесса количественного определения и снижениярасходуемого на него времени с 4 до 2 часов.

Ключевые слова: подорожник большой, водорастворимые полисахариды, ультразвук

Abstract. The technique of gravimetric definition of water-soluble polysaccharides in leaves of a plantain of big process for the purpose of an intensifitsirovaniye of quantitative definition and decrease in time spent for it, is modified from 4 to 2 o'clock.

Keywords: plantain big, water-soluble polysaccharides, ultrasound

Существующая методика количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, представленная в ГФ XI, требует выполнения большого числа технологических операций. Опытным путем доказано, что одно количественное определение занимает не менее четырёх часов, что также указывает на необходимость модифицирования методики [1].

Подобные попытки уже были предприняты Сосниной С.А. с соавторами, которые предложили исключить из методики количественного определения стадии центрифугирования после настаивания, центрифугирование перед вакуум-фильтрацией, вакуум-фильтрацию, а также предложили увеличить время подогревания на водяной бане при осаждении водорастворимых полисахаридов спиртом с 5 до 30 минут [2]. Патентный обзор показал, что разработано большое количество способов извлечения водорастворимых полисахаридов из разных видов лекарственного растительного сырья. Извлечение полисахаридов из травы

мальвы низкой предложено проводить трехкратной экстракцией при температуре 95 °С в течение 30 минут, осаждают полисахариды – четырехкратным количеством 96% этиловым спиртом [3]. Указанная методика позволяет получать высокий выход готового продукта и отличается от методики извлечения водорастворимых полисахаридов из листьев подорожника большого отсутствием необходимости доведения температуры экстрагирования до 100 °С. Известен также способ получения водорастворимых полисахаридов из цветков липы сердцевидной. Экстракцию авторы предлагают проводить однократно при температуре 80°С с последующим осаждением полисахаридов двойным объемом спирта при температуре 5 °С, что также указывает на необходимость рассмотрения температурных режимов методики количественного определения в листьях подорожника и кратности экстрагирования сырья [4].

Одним из перспективных физических методов воздействия на вещества с целью интенсификации технологических процессов является метод, основанный на использовании механических ко-

лебаний ультразвукового диапазона. Ускорение процесса экстракции под влиянием ультразвука (с частотой колебаний выше 20 КГц) связано со следующими факторами: расширением границ поверхности фаз за счёт дисперсии частиц растительного материала, частичным разрушением клеток растительного материала, созданием максимальной разности концентраций вследствие интенсивного перемешивания и как следствие — конвективной диффузии, тепловым эффектом [5].

Установлено, что ультразвуком частотой 19-44 кГц из растений можно извлекать биологически активные вещества с сокращением процесса экстракции на 1-2 порядка. При этом имеет место не только значительное ускорение процесса извлечения, но и увеличение по сравнению с другими методами экстрагирования выхода основного продукта [5].

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для интенсификации процесса количественного определения полисахаридов в листьях подорожника большого использовали ультразвуковую ванну «Град 40-35» с частотой 35 КГц. Варьировали степень измельчения сырья, температурными режимами экстрагирования, кратностью экстрагирования. Количественные определения проводили на сырье подорожника большого, собранного в заповедной зоне. Предварительные испытания по стандартной фармакопейной методике показали, что содержание водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника составляет 24.25 ± 0.50 %.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты количественных определений водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого при варьировании степенью измельчения сырья и температурой ультразвуковой ванны при трехкратном экстрагировании сырья по 30 минут согласно методике нормативной документации приведены в табл. 1.

Оптимальные результаты экстрагирования получены при измельчении сырья до 1 мм и температуре 80°C, причем эти результаты сопоставимы с данными полученными по методике, где вели нагревание до 100 °C, что подчеркивает значительную роль ультразвука как интенсификатора процесса.

Дальнейшие исследования были направлены на определение оптимальной кратности и длительности экстракции (табл. 2).

Таблица 1
Результаты количественных определений водорастворимых полисахаридов (%) в листьях подорожника большого при варьировании степенью измельчения сырья и температурой ультразвуковой ванны

Степень измельчения сырья, мм	1	2	3
Температура ультразвуковой ванны, °C			
60	22.57 ± 0.78	20.02 ± 0.92	16.10 ± 0.52
70	23.39 ± 0.49	21.91 ± 0.53	17.12 ± 0.34
80	24.52 ± 0.24	23.50 ± 0.10	20.34 ± 0.58

Таблица 2
Результаты количественных определений водорастворимых полисахаридов (%) в листьях подорожника большого при варьировании кратность и длительность экстрагирования

Кратность экстракции	1	2	3
Длительность экстракции, мин.			
10	8.68 ± 0.38	15.02 ± 0.25	20.18 ± 0.49
20	12.13 ± 0.67	20.68 ± 0.41	24.05 ± 0.36
30	15.93 ± 0.39	22.30 ± 0.29	24.52 ± 0.24

Эксперименты проводили с использованием ультразвуковой ванны с сырьем, измельченным до 1 мм, при температуре 80 °C. Первое экстрагирование проводили с использованием 200 мл воды очищенной, нагретой до температуры кипения, второе – также, а третье – с использованием 100 мл. Анализ полученных данных (табл. 2) показывает, что максимальное извлечение водорастворимых полисахаридов из сырья подорожника большого происходит при трехкратной экстракции по 30 минут. Однако близкие значения получены при трехкратной экстракции по 20 минут (различия составляют не более 2%), а экономия времени на анализ – 30 минут. Это позволяет рекомендовать для количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого трехкратную экстракцию по 20 минут.

Комплекс проведенных экспериментальных работ дает возможность предложить следующую методику количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого. Аналитическую пробу сырья измельча-

ли до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром 1 мм. Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 500 мл, прибавляли 200 мл воды очищенной, нагретой до температуры кипения. Колбу помещали в ультразвуковую ванну с частотой 35 КГц, при температуре 80 °С, экстрагировали 20 мин. Экстракцию повторяли ещё 2 раза, прибавляя сначала 200 мл, а затем 100 мл воды. Водные извлечения объединяли и фильтровали в мерную колбу вместимостью 500 мл через 10 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 5 см и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывали водой и доводили объём раствора до метки (раствор А). 25 мл раствора А помещали в коническую колбу на 100 мл, прибавляли 75 мл 95% спирта этилового, перемешивали, подогревали на водяной бане до 30 °С в течение 5 мин. Через 30 минут содержимое колбы фильтровали через предварительно высушенный и взвешенный беззольный бумажный фильтр, проложенный в стеклянный фильтр ПОР 16 с диаметром 40 мм, под вакуумом при остаточном давлении 0.4-0.8 атм. Осадок на фильтре последовательно промывали 15 мл раствора 95% спирта этилового в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и 95% спирта этилового (1:1). Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°С до постоянной массы. Содержание водорастворимых полисахаридов в пересчёте на абсолютно сухое сырьё вычисляли по формуле (1):

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 200000}{m \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

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

Разница в результатах количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого по фармакопейной методике и по предложенной составляет 0.83%, что сопоставимо с ошибкой эксперимента. При этом общее время количественного анализа листьев подорожника большого на содержание водорастворимых полисахаридов не превышает 2 часов. Метрологические характеристики приведены в табл. 3. Относительная ошибка предлагаемой методики при доверительной вероятности 95 % составляет 1.49 % [6,7,8].

Валидация разработанной методики была проведена по прецизионности (повторяемости),

специфичности, правильности (точности) и линейности.

Повторяемость методики определяли в условиях, при которых шесть независимых результатов измерений были получены одним методом, в одной лаборатории, одним исследователем, в пределах короткого промежутка времени. Результаты определений приведены в табл. 4.

Вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) по формулам (2),(3) [9]:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(\bar{X} - X_i)^2}{(n-1)}}, \quad (2)$$

$$RSD = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%, \quad (3)$$

Статистическая обработка полученных результатов, показала, что они достоверны при доверительной вероятности 95%, вычисленное значение величины относительного стандартного отклонения — 0.45% не превышает критериев приемлемости — 3% [9], что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (табл. 5).

При исследовании по валидации методики на правильность (точность) подготавливали модели для анализа, разводя соответствующим инертным разбавителем и получая, таким образом, смеси с 3 уровнями концентрации. В качестве инертного разбавителя использовали тальк. Для каждой из проб провести 3 параллельных определения. При этом за опорное значение содержания водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого принимали среднее значение, полученное в предыдущем эксперименте – 24.04 %. Данный способ установления правильности считается наиболее оптимальным для лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов. Результаты оценки повторяемости методики приведены в табл. 6. Как следует из представленных результатов, на всех трёх уровнях концентраций анализируемых образцов получают сопоставимые результаты, а относительное стандартное отклонение не превышает 3%, что соответствует оптимальной величине RSD и позволяет считать методику правильной [9].

Исследования по специфичности методики гравиметрического определения должны сводиться к доказанию того, что растворитель (вода) не дает осадка с осадителем (спирта), что абсолют-

Таблица 3

Метрологические характеристики методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого

n	f	x	S ²	S	S _x	P, %	t _(P,f)	Δx	ε, %
10	9	24.05	0.253	0.503	0.159	95	2.262	0.36	1.49

Таблица 4

Результаты оценки повторяемости методики

Номер анализа	1	2	3	4	5	6
Содержание водорастворимых полисахаридов, %	24.13	24.04	24.08	23.92	24.15	23.89

Таблица 5

Метрологические характеристики методики при ее валидации по прецизионности

n	f	x	S	S _x	RSD, %	P, %	t _(P,f)	Δx	ε, %
6	5	24.04	0.108	0.0442	0.45	95	2.571	0.113	0.47

но очевидно, на основании чего можно говорить о специфичности методики [9].

Для проверки линейности методики проводили 9 определений в диапазоне от 50% до 130 % номинальной концентрации. Каждое определение проводили один раз. Расчеты вели с помощью «Excel 2007». Результаты приведены в табл. 7 и на рис. 1.

Квадрат коэффициента корреляции линейной регрессии составил 1.0, что не менее 0.99. Это позволяет утверждать о наличии достаточно жесткой линейной зависимости массы осадка от массы лекарственного растительного сырья при гравиметрическом определении водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого [9].

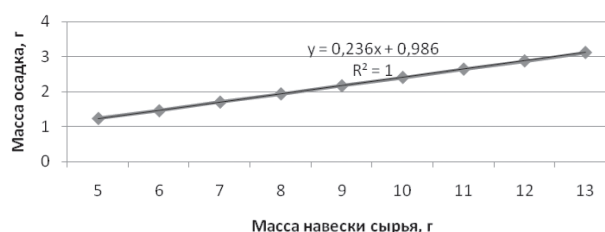


Рис. 1. Зависимость массы осадка от массы лекарственного растительного сырья при гравиметрическом определении водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого

Исследования выполнены при поддержке гранта президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-3733.2015.5).

Таблица 6

Результаты оценки повторяемости методики

Номер анализа	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Содержание листьев подорожника большого в пробе	1:1	1:1	1:1	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
Найденное содержание водорастворимых полисахаридов, %	24.15	24.00	23.89	24.22	24.40	24.48	24.32	24.64	24.96
Расчетное содержание водорастворимых полисахаридов, %	24.04								
Открываемость (R), %	100.46	99.83	99.38	100.75	101.50	101.82	101.16	102.50	103.83
Метрологические характеристики	R=101.25, SD=0.4564, RSD=0.45%								

Таблица 7

Результаты исследования по валидации методики на линейность

Масса навески сырья, г	5.0000	6.0000	7.0000	8.0000	9.0000	10.0000	11.0000	12.0000	13.0000
Масса осадка, г	1.2291	1.4507	1.6993	1.9359	2.1668	2.4074	2.6436	2.8801	3.1196

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Великанова Н.А. Усовершенствование методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого / Н.А. Великанова [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013», Воронеж, 16-18 апреля 2013 г. – Воронеж, 2013. - С. 216-220.
2. Соснина С.А. Количественное определение полисахаридов в листьях подорожника большого, подорожника среднего и подорожника ланцетного / С.А. Соснина [и др.] // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии –2007. – № 2. – С. 285 – 288
3. Пат. 2177793 РФ, МПК А 61 К 35/37, 31/715, А 61 Р 29/00, С 08 В 08 В 37/00 Способ получения суммы полисахаридов, обладающей противовоспалительной активностью / В.Н. Бубенчикова, И.Л. Дроздова, В.И. Кочкаров. - №200119967/14, заявл. 26.07.2000; опубл. 10.01.2002. – 5 с.
4. Пат. 1684287 СССР, С 08 В 37/00 Способ получения полисахарида / А.И. Яковлев, И.И. Митченко, А.А. Никулин, В.Б. Монахов. – № 4444145/05; заявл. 18.04.88; опубл. 15.10.91, Бюл. № 38. – 12 с.
5. Молчанов Г.И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации : учебное пособие / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. – М.: Альфа-М, 2011. – 336 с.
6. Пат. 2530501 РФ, МПК С 08 В 37/00 Способ получения водорастворимых полисахаридов из листьев подорожника большого / Н.А. Великанова, С.П. Гапонов, А.И. Сливкин. - № 2013110215/13, заявл. 06.03.2013; опубл. 10.10.2014, Бюл. №28. – 6 с.
7. Гапонов С.П. Изучение содержания водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, произрастающего в городе Воронеже и его окрестностях / С.П. Гапонов [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013», Воронеж, 16-18 апреля 2013г. – Воронеж, 2013. - С. 251-254.
8. Гапонов С.П. Изучение содержания водорастворимых полисахаридов в листьях подорожника большого, произрастающего в городе Воронеже и его окрестностях / С.П. Гапонов [и др.] // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: Материалы 5-й Международной научно-методической конференции «Фармобразование-2013», Воронеж, 16-18 апреля 2013г. – Воронеж, 2013. - С. 251-254.
9. Гаврилин М.В. Валидация аналитических методик (методические указания для аспирантов и студентов) / М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко. - ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава. - Пятигорск, 2008. - 37 с.

Дьякова Нина Алексеевна — к.б.н., асс.каф. фарм. химии и фа. технологии фарм. ф-та, ВГУ; тел.: (920) 4125352, e-mail: ninochka_v89@mail.ru

Самылина Ирина Александровна — д.фарм.н., проф., член-корреспондент РАН, зав. каф. фармакогнозии Первого МГМУ им. Сеченова; e-mail: lazndata@mail.ru

Сливкин Алексей Иванович — д.фарм.н., проф., зав. каф. Фарм. химии и фарм. технологии, ВГУ; тел.: 255-47-76, e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Dyakova Nina A. — the candidate of biological sciences, the assistant at the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, VSU; tel.: (920) 4125352, e-mail: ninochka_v89@mail.ru

Samylyna Irina A. — Full Professor, PhD, Dsci, the corresponding member of the Russian Academy of Science, Head of the farmakognosziya department I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, e-mail: lazndata@mail.ru

Slivkin Alexsey Y. — Full Professor, PhD, Dsci, Head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department, VSU; tel.: 255-47-76, e-mail: slivkin@pharm.vsu.ru

Гапонов Сергей Петрович — д.б.н., проф., зав. каф. зоологии и паразитологии, ВГУ; тел.: (4732) 208861, e-mail: gaponov2003@mail.ru

ГапонovSergeyP.—FullProfessor,PhD,DSci,Head of the Department of Zoology and Parasitology of VSU; tel.: (4732) 208861, e-mail: gaponov2003@mail.ru

Мындра Анна Андреевна — студентка 4 курса фармацевтическая факультета ВГУ; тел.: (929) 0077101, e-mail: ann6122@yandex.ru

Mundra Anna A. — 4th year student of pharmaceutical faculty, VSU; tel.: (929) 0077101, e-mail: ann6122@yandex.ru