

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО РАЗРАБОТКЕ И ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ ИЗВЛЕЧЕНИЯ ИНУЛИНА ИЗ КОРНЕЙ ЛОПУХА БОЛЬШОГО (*ARCTIUM LAPPA L.*)

Н. А. Дьякова¹, И. А. Самылина², А. И. Сливкин¹, С. П. Гапонов¹,
А. А. Мындра¹, Т. Г. Шушунова¹

¹Воронежский государственный университет

²Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Поступила в редакцию 23.03.2016 г.

Аннотация: Разработана экспрессная методика количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха большого (*Arctium lappa L.*), которая позволяет проводить анализ в течение 3 ч. Разработанная методика валидирована по показателям повторяемости, правильности и линейности, в результате чего доказано, что предлагаемая методика прецизионна в условиях повторяемости, правильна и обладает достаточно жёсткой линейной зависимостью массы осадка от массы анализируемого сырья при гравиметрическом определении водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха большого.

Ключевые слова: инулин; корни лопуха большого; *Arctium lappa L.*

Abstract. The express technique of quantitative definition of water-soluble polysaccharides in roots *Arctium lappa L.*, which allows to carry out the analysis within 3 hours. The developed technique of a validated on indicators of repeatability, correctness and linearity therefore it is proved that the proposed method have the precision in the conditions of repeatability, is correct and possesses rather rigid linear dependence of mass of a deposit on mass of the analyzed raw materials at gravimetric definition of water-soluble polysaccharides in roots of a burdock ordinary.

Keywords: inulin; roots of a burdock bic; *Arctium lappa L.*

В настоящее время качество корня лопуха регламентируется ФС 42-2878-97. согласно числовым показателям которой доброкачественным признается сырье с содержанием экстрактивных веществ, извлекаемых водой, не менее 35%. Последний показатель в условиях современного развития фитохимии не является объективным, а потому требует доработок.

Корни лопуха большого широко используются в медицине как мочегонное, желчегонное, жаропонижающее, противовоспалительное, антибактериальное, десенсибилизирующее, иммуностимулирующее и антиоксидантное средство. Используются корни лопуха большого внутрь - в виде отвара, и наружно - в виде орошения, промывания, влажных повязок. Таким образом, в

медицинских и фармацевтических целях используются водные извлечения из лекарственного растительного сырья, а фармакологический эффект обусловлен водорастворимыми соединениями, основу которых составляет инулин (до 45 %) [1].

Предварительный анализ литературных данных выявил, что наиболее эффективным является способ извлечения инулина из измельченных корней лопуха большого с помощью исчерпывающей экстракции. Сырье, измельченное до 2 мм, заливают водой и подвергают исчерпывающей экстракции в течение 3-5 сут. Полученный раствор обрабатывают 96 % этиловым спиртом и осаждают инулин при температуре -18 °С. Однако значительная длительность процесса делает его малоприменимым в фармацевтической практике и требует дальнейших исследований [2].

Одним из перспективных физических методов воздействия на вещества с целью интенсифика-

© Дьякова Н. А., Самылина И. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Мындра А. А., Шушунова Т. Г., 2016

ции технологических процессов является метод, основанный на использовании механических колебаний ультразвукового диапазона. При этом имеет место не только значительное ускорение процесса извлечения из растений полезных веществ, но и увеличение по сравнению с другими методами экстрагирования выхода основного продукта [3.4].

Для интенсификации процесса извлечения ВРПС нами решено было применять ультразвуковую ванну «Град 40-35» с частотой 35 КГц. При разработке методики варьировали степень измельчения сырья, температурными режимами экстрагирования, кратностью и длительностью экстрагирования, соотношением сырья и экстрагента.

Количественное определение ВРПС в корнях лопуха большого проводили трехкратно, варьируя степень измельчения сырья и температурой ультразвуковой ванны. Экстрагирование сырья проводили в соотношении с растворителем 1:30 по 30 мин с последующим осаждением аликвоты извлечения трехкратным количеством 95 % спирта. Фильтрование осадка проводили через 60 мин выдерживания в условиях морозильной камеры при температуре -18 °С 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, и высушиванием фильтра при температуре 105 °С до постоянной массы. Результаты определений приведены в табл. 1.

Оптимальные результаты экстрагирования получены при измельчении сырья до 0.2 - 0.5 мм и температуре 80 °С, причем эти результаты сопоставимы с данными, полученными по ранее предложенным методикам, где экстрагирование вели в течение не менее 3 сут, что подчеркивает значи-

тельную роль температурного и ультразвукового воздействий как интенсификаторов процесса.

Дальнейшие исследования проводились при температуре 80 °С с использованием сырья, измельченного до 0.2 - 0.5 мм, и были направлены на определение оптимальной кратности и длительности экстракции (табл. 2).

Анализ полученных данных (табл. 2) показывает, что максимальное извлечение ВРПС из сырья лопуха большого происходит при трехкратной экстракции по 40 мин. Однако близкие значения получены при трехкратной экстракции по 30 мин (различия составляют не более 2 %, что сопоставимо с ошибкой эксперимента), а экономия времени на анализ составляет 30 мин. В целях интенсификации процесса данный факт позволяет рекомендовать для количественного определения ВРПС в корнях лопуха большого трехкратную экстракцию по 30 мин.

Важным фактором, влияющим на процесс экстракции, является также соотношение сырья и экстрагента. Результаты исследований, проведенных при трехкратном экстрагировании сырья с размером частиц 0.2 - 0.5 мм при температуре 80 °С по 30 мин при варьировании соотношением сырья и экстрагента приведены в табл. 3. Из таблицы видно, что оптимальным при экстрагировании ВРПС из корней лопуха большого является соотношение сырья и экстрагента 1:30.

Комплекс проведенных экспериментальных работ дает возможность предложить следующую методику количественного определения ВРПС в корнях лопуха большого.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц 0.2 - 0.5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 30 мл воды

Таблица 1

Результаты количественного определения ВРПС (%) в корнях лопуха большого при варьировании степенью измельчения сырья и температурой

Температура ультразвуковой бани, °С	Степень измельчения сырья, мм		
	0.2 - 0.5	0.5 - 1.0	1.0 - 2.0
60	28.14 ± 0.54	16.91 ± 0.67	9.14 ± 0.79
70	32.48 ± 0.88	19.86 ± 0.62	13.09 ± 0.56
80	39.57 ± 0.57	22.04 ± 0.95	17.03 ± 0.79

Таблица 2

Результаты количественного определения ВРПС (%) в корнях лопуха большого при варьировании кратностью и длительностью экстрагирования

Длительность экстракции, мин.	Кратность экстракции		
	1	2	3
20	14.03 ± 0.78	21.49 ± 0.93	32.46 ± 0.85
30	20.91 ± 0.79	33.05 ± 0.52	39.57 ± 0.57
40	24.65 ± 0.72	36.45 ± 0.49	40.29 ± 0.67

очищенной, нагретой до температуры кипения, помещают в ультразвуковую ванну с частотой 35 КГц при температуре 80 °С, экстрагируют 30 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, прибавляя по 30 мл воды. Водные извлечения объединяют и фильтруют в мерную колбу вместимостью 100 мл через 10 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 5 см и предварительно промытой водой очищенной. Фильтр промывают водой и доводят объём раствора до метки (раствор А). 25 мл раствора А помещают в коническую колбу на 100 мл, прибавляют 75 мл 95 % спирта этилового, перемешивают, охлаждают в морозильной камере при температуре -18°С в течение 1 ч. Затем содержимое колбы фильтруют 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 промывают 15 мл раствора 95 % спирта этилового в воде очищенной (3:1), 10 мл смеси этилацетата и 95 % спирта этилового (1:1). Фильтр с осадком сушат сначала на воздухе, затем при температуре 100 - 105 °С до постоянной массы. Содержание ВРПС в пересчёте на абсолютно сухое сырьё вычисляют по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 40000}{m \cdot (100 - W)}, \quad (1)$$

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, %.

Таблица 3
Результаты количественных определений ВРПС (%) в корнях лопуха большого при варьировании соотношением сырья и экстрагента

Соотношение сырья и экстрагента	Содержание ВРПС, %
1:15	29.46 ± 0.75
1:20	35.05 ± 0.57
1:30	39.57 ± 0.57
1:50	40.06 ± 0.72

Разница в результатах количественного определения ВРПС в корнях лопуха большого по ранее запатентованной методике (результат составил 39.03 ± 0.67 %) и по предложенной составляет 0.54 %, что сопоставимо с ошибкой эксперимента. При этом общее время количественного анализа корней лопуха большого на содержание ВРПС не превышает 3 ч. Метрологические характеристики приведены в табл. 4.

Таким образом, относительная ошибка предлагаемой методики при доверительной вероятности 95 % составляет 0.86 %.

Однако для того, чтобы предлагаемая методика заняла заслуженное место в системе обеспечения качества лекарственных средств, гарантируя достоверные и точные результаты анализа, дополнительно необходимо провести процедуру ее валидации [5.6]. Валидация методики проведена по прецизионности (повторяемости), правильности (точности) и линейности.

Повторяемость методики определяли в условиях, при которых 6 независимых результатов измерений были получены одним методом, в одной лаборатории, одним исследователем, в пределах короткого промежутка времени (табл. 5) [6].

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 % [6], что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

При валидации методики на правильность (точность) подготавливались модели для анализа, разводя соответствующим инертным разбавителем и получая, таким образом, смеси с 3 уровнями концентрации. В качестве инертного разбавителя использовались тальк. Для каждой из проб провели 3 параллельных определения. При этом за опорное значение содержания ВРПС в корнях лопуха большого принимались среднее значение, полученное в предыдущем эксперименте – 39.20 % [6]. Результаты оценки повторяемости методики приведены в табл. 6.

При валидации методики на линейность проводились 9 определений в диапазоне от 50 до 130

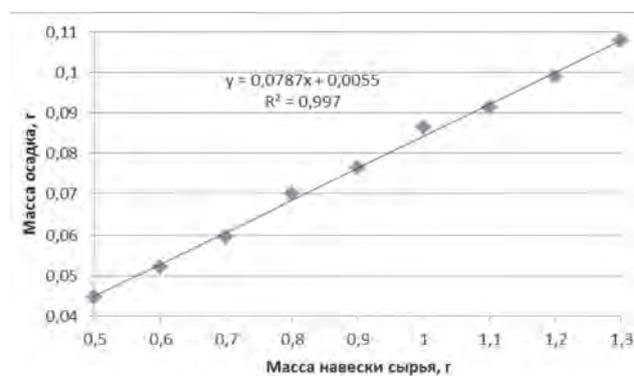


Рис. 1. Зависимость массы осадка от массы корней лопуха большого при гравиметрическом определении ВРПС

Таблица 4

Метрологические характеристики методики количественного определения ВРПС в корнях лопуха большого

n	f	x	S ²	S	S _x	P, %	t _(P,D)	Δx	ε, %
10	9	39.38	0.2263	0.4757	0.1504	95	2.2622	0.34	0.86

Таблица 5

Результаты оценки повторяемости методики

Номер анализа	1	2	3	4	5	6			
Содержание ВРПС, %	39.26	39.36	39.03	38.93	39.23	39.37			
Метрологические характеристики									
n	f	x	S	S _x	RSD, %	P, %	t _(P,D)	Δx	ε, %
6	5	39.20	0.1793	0.0732	0.4575	95	2.570	0.1881	0.48

Таблица 6

Результаты оценки повторяемости методики

Номер анализа	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Содержание сырья в пробе	1:1	1:1	1:1	1:2	1:2	1:2	1:4	1:4	1:4
Найдено ВРПС, %	39.26	39.36	39.03	39.80	40.57	40.32	40.37	42.26	40.51
Расчитано ВРПС, %	39.20								
Открываемость (R), %	100.15	100.41	99.57	101.53	103.49	102.86	102.98	107.81	103.34
Метрологические характеристики	R _{ср} =102.46; SD=0.8399; RSD=2.06 %								

Таблица 7

Результаты исследования по валидации методики на линейность

Масса сырья, г	0.5000	0.6000	0.7000	0.8000	0.9000	1.0000	1.1000	1.2000	1.3000
Масса осадка, г	0.0447	0.0522	0.0595	0.0702	0.0765	0.0864	0.0913	0.0989	0.1078

% номинальной концентрации. Каждое определение выполнялось 1 раз. Расчеты велись с помощью «Excel 2007». Результаты приведены на рис. 1 и в табл. 7. 8.

Таблица 8

Критерии оценки линейности методики

R ²	y-intercept	slope
0.997	0.0055	0.0787

Показатель y-intercept (0.0055) является отражением чувствительности методики, Slope (0.0787) – соответствует значению холостого опыта. Квадрат коэффициента корреляции линейной регрессии составил 0.997. что не менее 0.99. Это позволяет утверждать о наличии линейной зависимости массы осадка от массы сырья при гравиметрическом определении ВРПС в корнях лопуха большого [6].

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дьякова Н.А. Разработка и валидация экспрессной методики количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.) / Н.А. Дьякова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. — 2015. — Т. 49. №9. — С. 35-38.
2. Пат. 2360927 РФ, МПК С 08 В 37/00. С 08 В37/18 Способ получения инулина из растительного сырья / Е.А. Струпан, О.А. Струпан. — № 2007138870/13. заявл. 19.10.2007; опубл. 10.07.2009. Бюл. № 19. — 5 с.
3. 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 «Фармообразование-2013», Воронеж, 16-18 апреля 2013 г. – Воронеж, 2013. - С. 216-220.

Дьякова Н. А., Самылина И. А., Сливкин А. И., Гапонов С. П., Мындра А. А., Шушунова Т. Г.

4. 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.

5. Дьякова Н.А. Рационализированная методика количественного определения водораствори-

мых полисахаридов и ее валидация / Н.А. Дьякова [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. — 2015. — №. 2 — С. 106-111.

6. 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.

*Воронежский государственный университет
Дьякова Н. А., к.б.н., асс. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: Ninochka_V89@mail.ru
Тел.: (920) 4125352*

*Voronezh State University
Dyakova N. A., PhD, Assistantat Professor the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department
E-mail: Ninochka_V89@mail.ru
Тел.: (920) 4125352*

*Сливкин А. И., д.фарм.н., проф., зав. каф. фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru
Тел.: 255-47-76*

*Slivkin A. Y., PhD, DSci, Full Professor; Head of the pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology department
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru
Тел.: 255-47-76*

*Гапонов С. П., д.б.н., проф., зав. каф. зоологии и паразитологии
E-mail: gaponov2003@mail.ru
Тел.: (4732) 208861*

*Gaponov S. P., PhD, DSci, Full Professor; Head of the Department of Zoology and Parasitology
E-mail: gaponov2003@mail.ru
Тел.: (4732) 208861*

*Мындра А. А., студентка 4 курса фармацевтическая факультета
E-mail: ann6122@yandex.ru
Тел.: (929) 0077101*

*Mundra A. A., 4th year student of pharmaceutical faculty
E-mail: ann6122@yandex.ru
Тел.: (929) 0077101*

*Шушунова Т. Г., интерн кафедры фармации последипломного образования
E-mail: shushunova@pharm.vsu.ru
Тел. (951)8612599*

*Shushunova T. G., the intern of department of pharmacy of postdegree education
E-mail: shushunova@pharm.vsu.ru
Тел. (951)8612599*

*Первый МГМУ им. Сеченова
Самылина И. А., д.фарм.н., проф., член-корреспондент РАН, зав. каф. фармакогнозии;
E-mail: laznata@mail.ru*

*Samyлина I. A., Full Professor, PhD, Dsci, the corresponding member of the Russian Academy of Science, Head of the farmakognosiya department
E-mail: laznata@mail.ru*