

© Коллектив авторов, 2015

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

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ ЭКСПРЕССНОЙ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ВОДОРАСТВОРИМЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ В КОРНЯХ ЛОПУХА ОБЫКНОВЕННОГО (*ARCTIUM LAPPA L.*)

¹ Воронежский государственный университет, 394006, Россия, Воронеж, Университетская площадь, 1, e-mail: office@main.vsu.ru

² Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 119991, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, e-mail: rektorat@mma.ru

Разработана экспрессная методика количественного определения водорастворимых полисахаридов в корнях лопуха обыкновенного (*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 обыкновенного. Методика может быть использована для экспрессного анализа качества корней лопуха большого, а также для промышленного получения инулина из данного вида сырья.

Ключевые слова: полисахариды водорастворимые; корни лопуха обыкновенного (*Arctium lappa L.*).

В настоящее время качество лекарственного растительного сырья 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 обыкновенного широко используются в медицине как мочегонное, желчегонное, жаропонижающее, противовоспалительное, антибактериальное, антифунгальное, десенсибилизирующее, иммуностимулирующее и антиоксидантное средство [1]. Используются корни лопуха обыкновенного 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 составляют водорастворимые полисахариды (ВРПС), представленные инулином (до 45 %) [2].

Целью работы являлись разработка и валидация экспрессной методики количественного определения ВРПС в корнях лопуха.

Предварительный анализ литературных данных выявил, что наиболее эффективным является способ извлечения инулина из измельченных корней лопуха большого с помощью исчерпывающей экстракции [3]. В качестве исходного сырья используют корни лопуха

большого, которые промывают, подсушивают и измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий, например, 2 мм, заливают водой и подвергают исчерпывающей экстракции в течение 3 – 5 сут. Полученный бесцветный раствор обрабатывают 96 % этиловым спиртом и осаждают инулин при температуре ниже минус 15 °С. Однако значительная длительность процесса делает его малоприменимым в фармацевтической практике и требует дальнейших исследований.

Одним из перспективных физических методов воздействия на вещества с целью интенсификации технологических процессов является метод, основанный на использовании механических колебаний ультразвукового диапазона. Установлено, например, что ультразвуком частотой 19 – 44 кГц из растений с сокращением процесса экстракции на 1 – 2 порядка можно извлекать флавоноиды, дубильные вещества, фенольные гликозиды, кумарины, антоцианы. 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 [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.

Таблица 1
Результаты количественного определения ВРПС (%) в корнях лопуха обыкновенного при варьировании степени измельчения сырья и температурой ультразвуковой бани

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

Количественное определение ВРПС в корнях лопуха обыкновенного проводили трехкратно, варьируя степень измельчения сырья и температурой ультразвуковой ванны. Экстрагирование сырья проводили в соотношении с растворителем 1:30 по 30 минут с последующим осаждением аликвоты извлечения трехкратным количеством 95 % спирта. Фильтрацию 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 представлены 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 значительную 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 обыкновенного 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

Таблица 2
Результаты количественного определения ВРПС (%) в корнях лопуха обыкновенного 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

Таблица 3
Результаты количественных определений ВРПС (%) в корнях лопуха обыкновенного 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

данный факт позволяет рекомендовать для количественного определения ВРПС в корнях лопуха обыкновенного 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 обыкновенного является соотношение сырья и экстрагента 1:30.

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

Экспериментальная часть

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц 0,2 – 0,5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 30 мл воды очищенной, нагретой до температуры кипения, помещали в ультразвуковую ванну с частотой 35 КГц при температуре 80 °С, экстрагировали 30 мин. Экстракцию повторяли ещё 2 раза, прибавляя по 30 мл воды. Водные извлечения объединяли и фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл через 10 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 5 см и предварительно промытой

Таблица 4
Метрологические характеристики методики количественного определения ВРПС в корнях лопуха большого

<i>n</i>	<i>f</i>	\bar{x}	S^2	<i>S</i>	S_x	<i>P</i> , %	$t_{(P, f)}$	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									
<i>n</i>	<i>f</i>	<i>x</i>	<i>S</i>	S_x	RSD, %	<i>P</i> , %	$t_{(P, f)}$	Δx	ε , %
6	5	39,20	0,1793	0,0732	0,4575	95	2,570	0,1881	0,48

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
Найденное содержание ВРПС, %	39,26	39,36	39,03	39,80	40,57	40,32	40,37	42,26	40,51
Расчетное содержание 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	$R_{cp} = 102,46; SD = 0,8399; RSD = 2,06 \%$								

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

водой очищенной. Фильтр промывали водой и довели объём раствора до метки (раствор А). 25 мл раствора А помещали в коническую колбу на 100 мл, прибавляли 75 мл 95 % спирта этилового, перемешивали, охлаждали в морозильной камере при температуре $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч. Затем 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 $^{\circ}\text{C}$ до постоянной массы. Содержание ВРПС в пересчёте на абсолютно сухое сырьё вычисляли по формуле:

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

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 ВРПС в корнях лопуха большого по ранее запатентованной методике (результат составил $39,03 \pm 0,67$) и по предложенной составляет 0,54 %, что сопоставимо с ошибкой эксперимента. При этом общее время количественного анализа корней лопуха обыкновенного 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 %.

Таблица 8

Критерии оценки линейности методики

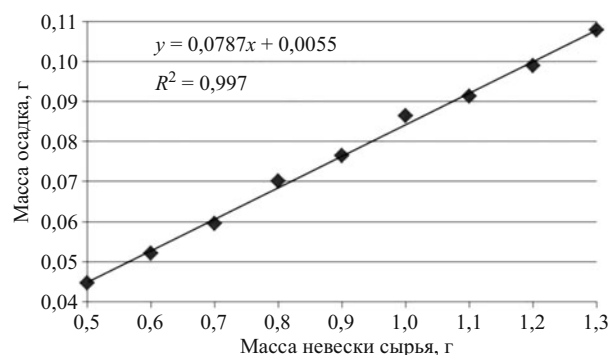
R^2	y-intercept	slope
0,997	0,0055	0,0787

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]. 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) [5].

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

При 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 [5]. Для каждой из проб провели 3 параллельных определения. При этом за опорное значение содержания



Зависимость массы осадка от массы лекарственного растительного сырья при гравиметрическом определении ВРПС в корнях лопуха обыкновенного

ВРПС в корнях лопуха обыкновенного принимали среднее значение, полученное в предыдущем эксперименте – 39,20 %. Этот способ установления правильности считается наиболее оптимальным для лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов. Результаты оценки повторяемости методики приведены в табл. 6.

При валидации методики на линейность проводили 9 определений в диапазоне от 50 до 130 % номинальной концентрации. Каждое определение проводили 1 раз. Расчеты вели с помощью “Excel 2007”. Результаты приведены в табл. 7, 8 и на рисунке.

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 обыкновенного [5].

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. В. Опрошанская, *Актуальные вопросы фармац. и мед. науки и практики*, № 3, 67–71 (2014)
2. В. А. Куркин, *Фармакогнозия*, СамГМУ, Самара (2004), сс. 687 – 690
3. Патент Российской Федерации 2360927; *Бюл. изобрет.*, № 19 (2009).
4. Г. И. Молчанов, А. А. Молчанов, Л. М. Кубалова, *Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации*, Альфа-М, Москва (2011), сс. 210 – 216.
5. М. В. Гаврилин, С. П. Сенченко, *Валидация аналитических методик (методические указания для аспирантов и студентов)*, ГОУ ВПО Пятигорская ГФА Росздрава, Пятигорск, (2008), сс 8 – 20.

Поступила 28.03.15

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD OF RAPID QUANTITATIVE DETERMINATION OF WATER-SOLUBLE POLYSACCHARIDES IN ROOTS OF COMMON BURDOCK (*ARCTIUM LAPPA* L.)

N. A. D'yakova^{1*}, I. A. Samylina², A. I. Slivkin¹, S. P. Gaponov¹, and A. A. Myndra¹

¹ Voronezh State University, Voronezh, 394006, Russia.

² I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, 119991 Russia.

* e-mail: office@main.vsu.ru

A rapid method for the quantitative definition of water-soluble polysaccharides in roots of common burdock (*Arctium lappa* L.) has been developed that allows one to carry out the analysis within 3 h. The proposed technique has been validated in terms of repeatability, correctness. The proposed method is precise under the conditions of repeatability, correct, and ensures rather linear dependence of the mass of a deposit on the mass of the analyzed raw materials during gravimetric determination of water-soluble polysaccharides in the roots of common burdock. This method can be used for rapid evaluation of the quality of burdock roots, in particular, for the commercial technology of inulin production from this type of raw material.

Keywords: water-soluble polysaccharides; ordinary burdock; *Arctium lappa* L.; root extract.