

УДК 615.322:582.998.14

**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИСАХАРИДОВ В ТРАВЕ КУЛЬБАБЫ ОСЕННЕЙ
(LEONTODON AUTUMNALIS L.)****Бубенчиков Р.А., Гончаров Н.Н.***ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет»,
Курск, e-mail: fg.ksmu@mail.ru*

В ходе проведения исследования была разработана методика гравиметрического определения водорастворимых полисахаридов в траве кульбабы осенней, основанная на их осаждении спиртом этиловым 96%. Подобраны оптимальные условия, экстрагирования и осаждения суммы полисахаридов. Установлено, что наиболее полное извлечение полисахаридом достигается при степени измельчения 1 мм, четырехкратной экстракцией водой очищенной в течение 30 минут и соотношением сырье–экстрагент 1:3. Валидацию методики количественного определения проводили по показателям: линейности, повторяемости и воспроизводимости. На основании полученных результатов установлено, что в пределах измеряемых концентраций зависимость содержания водорастворимых полисахаридов от массы навески сырья носит линейный характер. Полученные значения коэффициентов корреляции и относительного стандартного отклонения позволяют использовать разработанную методику для определения полисахаридов в указанном диапазоне концентраций. Установлено содержание водорастворимых полисахаридов в траве кульбабы осенней, собранной в различных годах и местах произрастания.

Ключевые слова: полисахариды, кульбаба осенняя, методика количественного определения, валидация**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS
OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF POLYSACCHARIDES
IN THE HERBS LEONTODON AUTUMNALIS L.****Bubenchikov R.A., Goncharov N.N.***Kursk State Medical University of the Ministry of Health of Russia,
Kursk, e-mail: fg.ksmu@mail.ru*

Methodology was developed gravimetric of polysaccharide complexes of herbs *Leontodon autumnalis* L. in the course of the study, based on their deposition 96% ethanol. Optimal conditions, the extraction and precipitation amounts of polysaccharides. It was established that the most complete extraction polysaccharide is achieved at fineness of 1 mm four times extraction with purified water for 30 minutes, and the ratio of extractant feed 1:3. Validation of methods of quantitative determination was performed on parameters: linearity repeatability and reproducibility. On the basis of the obtained results revealed that within the measured concentration dependence of the content of polysaccharides from the mass sample is linear. The obtained correlation coefficient values and the relative standard deviation allow use technique developed to determine the polysaccharide in the said concentration range. Installs the content of water-soluble polysaccharides in the herbs *Leontodon autumnalis* L., collected in different years and places of growth.

Keywords: polysaccharides, *Leontodon autumnalis* L., method for quantitative determination, validation

В последнее время значительно возросло значение полисахаридов для медицинской и фармацевтической практики. Фитопрепараты на основе полисахаридов применяют в качестве отхаркивающих и противовоспалительных средств [1, 5], известны их обволакивающие и смягчительные свойства [9], антигипоксическое, антиоксидантное, гепатопротекторное и радиопротекторное действие [8]. Некоторые полисахариды оказались эффективными антиульцерогенными агентами [4]. Многие исследователи связывают с полисахаридами иммуномодулирующие свойства растений и фитопрепаратов на их основе [6, 7]. В литературе есть данные о противовоспалительной активности полисахаридов [4], а также сведения об их способности восстанавливать работоспособность, что активно используется в спортивной медицине [4].

Широкий спектр фармакологической активности полисахаридов обуславливает необходимость разработки и совершенствования методов их анализа.

Цель настоящей работы – разработка методики количественного определения полисахаридов в траве кульбабы осенней и ее валидация.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования служила трава кульбабы осенней, заготовленная на территории Курской области в 2013–2014 г. в период массового цветения растений.

Наиболее доступным и распространенным методом для анализа растительного сырья, содержащего полисахариды, является гравиметрический метод, основанный на экстракции суммы полисахаридов из сырья с последующим осаждением их спиртом этиловым 96% [2, 3].

Поэтому нами для анализа травы кульбабы осенней разработана методика гравиметрического опре-

деления полисахаридов. При этом изучены такие стадии, как экстрагирование суммы полисахаридов и условия осаждения полисахаридов.

Статистическую обработку полученных данных вели по общепринятой методике с использованием t-критерия Стьюдента [3], а также с помощью программы Microsoft Excel 2010.

Результаты исследования и их обсуждение

При установлении количественного содержания полисахаридов в траве кульбабы осенней нами изучены и выявлены оптимальные условия анализа: степень измельченности сырья, время экстракции, температура экстракции, типа экстрагента, соотношение сырье-экстрагент (табл. 1).

Таблица 1
Влияние условий экстракции
на содержание полисахаридов
в траве кульбабы осенней

Условия экстракции	Содержание полисахаридов в %
1	2
Время экстракции, мин	
30	4,23
60 (2x30)	6,16
90 (3x30)	9,19
120 (4x30)	9,68
Степень измельчения, мм	
1,0	9,68
2,0	4,68
3,0	4,05
Соотношение извлечения и спирта 96 % этилового	
1:1	3,89
1:2	6,60
1:3	9,68
1:4	9,77

Было установлено, что наиболее полное извлечение полисахаридов из травы кульбабы осенней достигается при использовании четырехкратной экстракции по 30 минут со степенью измельчения сырья 1,0 мм и при соотношении извлечения и спирта этилового 96 % 3:1.

На основании проведенных исследований разработана методика количественного суммы полисахаридов в траве кульбабы осенней.

Количественное определение полисахаридов в траве кульбабы осенней. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Около 10,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл воды очищенной, колбу присоединяют к обратному холодильнику и кипятят при перемешивании на электриче-

ской плитке в течение 30 минут. Экстракцию повторяют трижды, прибавляя по 100 мл воды очищенной в течение 30 минут каждый раз. Водные извлечения объединяют, центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 минут и декантируют в мерную колбу вместимостью 500 мл через 5 слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 66 мм и предварительно смоченной водой. Фильтр промывают водой и доводят объем раствора водой до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещают в центрифужную пробирку, прибавляют 75 мл 96 % спирта этилового, перемешивают, подогревают на водяной бане при температуре 60 °С в течение 5 минут. Через 30 минут содержимое центрифугируют с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 минут.

Надосадочную жидкость фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 13–16 кПа через высушенный до постоянной массы при температуре 100–105 °С стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносят на тот же фильтр и промывают 15 мл смеси спирта этилового 96 % и воды (4:1). Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100–105 °С до постоянной массы.

Содержание полисахаридов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле

$$x = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 500 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot 25 \cdot (100 - w)},$$

где m_1 – масса фильтра, г;

m_2 – масса фильтра с осадком, г;

m – масса сырья, г;

w – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Валидацию методики количественного определения проводили по показателям: линейности, повторяемости и воспроизводимости [11].

Для установления диапазона использования методики получали извлечения различной концентрации. Для этого согласно разработанной методике получали извлечения из навесок массой 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 г (точные навески). Градуировочный график представлен на рисунке.

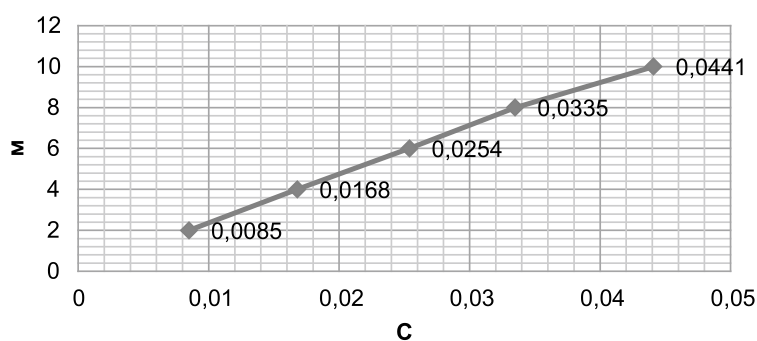
Критерием приемлемости линейности является коэффициент корреляции. Если его величина близка к единице, то совокупность данных можно описать прямой линией.

На основании полученных результатов установлено, что в пределах измеряемых концентраций зависимость содержания полисахаридов от массы навески носит линейный характер (рисунок и табл. 2).

Коэффициент корреляции составил 0,999964, что свидетельствует о том, что данную методику можно использовать для анализа полисахаридов в указанном диапазоне концентраций.

Повторяемость методики определяли на одном образце сырья в 6 повторностях. Критерий приемлемости выражался величиной относительного стандартного отклонения, который составил 4,03 % (табл. 3), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Воспроизводимость определяли 2 аналитика на 3 образцах в 3 повторностях. Относительное стандартное отклонение не превышало 6,95, что свидетельствует о прецизионности методики в условиях воспроизводимости (табл. 4).



Зависимость содержания суммы полисахаридов от массы навески сырья

Таблица 2

Результаты статистической обработки данных, полученных при изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$

F	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	R
3	0,0325	6,00032	181,0267	0,116953	0,999964

Таблица 3

Содержание полисахаридов в траве кульбабы осенней

№ п/п	Содержание полисахаридов, %	Метрологические характеристики
1	9,54	$\bar{X} = 9,69$ $Sx^2_{cp} = 0,02331$ $Sx_{cp} = 0,1527$ $\Delta\bar{X} = 0,39$ $E = 4,03$ $X_{cp} + \Delta x_{cp} = 9,69 + 0,39$
2	9,86	
3	9,66	
4	9,59	
5	9,57	
6	9,89	

Таблица 4

Определение воспроизводимости разработанной методики

Повторность	Аналитик	Содержание суммы полисахаридов в траве кульбабы осенней (%)		
		Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3
1	1	9,54	9,40	9,96
2	1	9,86	9,53	10,16
3	1	9,66	9,31	9,71
4	2	9,59	9,02	10,42
5	2	9,57	8,86	10,24
6	2	9,89	9,15	10,15
Среднее значение		9,69	9,21	10,11
Погрешность измерения (ΔX)		$\pm 0,39$	$\pm 0,64$	$\pm 0,63$
Относительное стандартное отклонение, (RSD)		4,03	6,95	6,23

По разработанной методике изучали содержание полисахаридов в траве кульбабы осенней, собранной в различных годах и местах произрастания (табл. 5).

Таблица 5

Содержание суммы водорастворимых полисахаридов в траве кульбабы осенней

Место и год сбора сырья	Содержание полисахаридов, %
Курская область, окрестности г. Курска, 2013 г.	9,69 ± 0,39
Курская область, окрестности г. Курска, 2014 г.	9,21 ± 0,64
Курская область, Курский район, 2014 г.	10,11 ± 0,63

Анализируя данные таблицы, можно отметить, что в траве кульбабы осенней содержание полисахаридов колеблется от 8,57% до 10,74%.

Выводы

1. Нами впервые разработана методика гравиметрического определения полисахаридов в траве кульбабы осенней (*Leontodon autumnalis* L.). Содержание суммы полисахаридов в сырье кульбабы осенней колеблется от 8,57% до 10,74%.

2. Проведена валидация разработанной методики по показателям линейности, повторяемости и воспроизводимости.

Список литературы

1. Бубенчикова В.Н. Состав и отхаркивающая активность водорастворимых полисахаридных комплексов девясилы иволистного / В.Н. Бубенчикова, А.В. Азарова // Научные ведомости БелГУ. Серия: Естественные науки. – 2011. – № 9 (104). – Вып. 15/2. – С. 188–190.
2. Бубенчикова В.Н. Фенольные соединения и полисахариды подмаренника цепкого (*Galium Aparine* L.) / В.Н. Бубенчикова, Ю.А. Старчук // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2008. – № 3. – С. 117–121.
3. Государственная фармакопея СССР. XI издание. Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – Вып. 1. – 336 с.
4. Криштанова Н.А. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств / Н.А. Криштанова, М.Ю. Сафонова, В.Ц. Болотова и др. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – №1. – С. 212–221.
5. Лесиовская Е.Е. Фармакотерапия с основами фитотерапии. 2-е изд. / Е.Е. Лесиовская, Л.В. Пастушенков. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2003. – 592 с.

6. Медведева Е.Н. Получение высокоочищенного арабиногалактана лиственницы и исследование его иммуномодулирующих свойств / Е.Н. Медведева, В.А. Бабкин, О.А. Макаренко // Химия растительного сырья. – 2004. – № 4. – С. 17–23.

7. Моисеева Г.Ф. Иммуностимулирующие полисахариды высших растений / Г.Ф. Моисеева, В.Г. Беликов // Фармация. – 1992. – № 3. – С. 79–84.

8. Муравьева Т.И. Фармакосанирующие эффекты полисахаридов растительного происхождения: автореф. дис. канд. мед. наук. – Владивосток, 1999. – 24 с.

9. Пилат Т.Л. Биологически активные добавки к пище (теория, производство, применение) / Т.Л. Пилат, А.А. Иванов. – М.: Аввалон, 2002. – 710 с.

References

1. Bubenichikova V.N. Sostav i otkarkivajushhaja aktivnost' vodorastvorimyh polisaharidnyh kompleksov devjasila ivolistnogo / V.N. Bubenichikova, A.V. Azarova // Nauchnye ведомosti BelGU. Serija: Estestvennye nauki. 2011. no. 9 (104). Vyp. 15/2. pp. 188–190.
2. Bubenichikova V.N. Fenol'nye soedinenija i polisaharidy podmarennika cepkogo (*Galium Aparine* L.) / V.N. Bubenichikova, Ju.A. Starchak // Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e». 2008. no. 3. pp. 117–121.
3. Gosudarstvennaja farmakopeja SSSR. XI izdanie. Obshhie metody analiza. M.: Medicina, 1987. Vyp. 1. 336 p.
4. Krishtanova N.A. Perspektivy ispol'zovanija rastitel'nyh polisaharidov v kachestve lechebnyh i lechebno-profilakticheskikh sredstv / N.A. Krishtanova, M.Ju. Safonova, V.C. Bolotova i dr. // Vestnik VGU. Serija: Himija. Biologija. Farmacija. 2005. no. 1. pp. 212–221.
5. Lesiovskaja E.E. Farmakoterapija s osnovami fitoterapii. 2-e izd. / E.E. Lesiovskaja, L.V. Pastushenkov. M.: GJeOTAR-MED, 2003. 592 p.
6. Medvedeva E.N. Poluchenie vysokochistogo arabingalaktana listvennicy i issledovanie ego immunomodulirujushhih svojstv / E.N. Medvedeva, V.A. Babkin, O.A. Makarenko // Himija rastitel'nogo syr'ja. 2004. no. 4. pp. 17–23.
7. Moiseeva G.F. Immunostimulirujushhie polisaharidy vysshih rastenij / G.F. Moiseeva, V.G. Belikov // Farmacija. 1992. no. 3. pp. 79–84.
8. Murav'eva T.I. Farmakosaniirujushhie jeffekty polisaharidov rastitel'nogo proishozhdenija: avtoref. dis. kand. med. nauk. Vladivostok, 1999. 24 p.
9. Pilat T.L. Biologicheski aktivnye dobavki k pishhe (teorija, proizvodstvo, primenenie) / T.L. Pilat, A.A. Ivanov. M.: Avvalon, 2002. 710 p.

Рецензенты:

Раздорская И.М., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой управления и экономики фармации ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск;

Сипливая Л.Е., д.б.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ГБОУ ВПО КГМУ Минздрава России, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 02.02.2015.