

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2021.4.26

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ ПОДБОР ОПТИМАЛЬНЫХ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ УЛЬТРАЗВУКОВОЙ ЭКСТРАКЦИИ ИНУЛИНА**

© Дьякова Н.А.

*Воронежский государственный университет, Россия, 394006, Воронеж, Университетская площадь, 1**Резюме*

**Цель.** Разработать экспрессную методику выделения и количественного определения инулина из корней лопуха обыкновенного (*Arctium lappa* L.).

**Методика.** Для ускорения процесса извлечения биологически активных веществ из корней лопуха обыкновенного, а также увеличения выхода инулина, решено было использовать ультразвуковую ванну.

**Результаты.** Варьируя показателями процесса, удалось подобрать оптимальные условия экстрагирования инулина из корней лопуха обыкновенного в условиях обработки ультразвуком: измельченность сырья 0,2-0,5 мм, температура – 80°C, кратность извлечения – 3, длительность экстракций – 40 мин, частота ультразвука – 25 кГц, соотношение сырья и экстрагента 1 г на 20 мл. Дальнейшее увеличение времени экстракции в условиях ультразвуковой ванны приводит, очевидно, к деструкции водорастворимых полисахаридов. Также были подобраны оптимальные условия очистки полисахаридного комплекса корней лопуха обыкновенного с получением чистого инулина.

**Заключение.** Предлагаемый способ позволяет интенсифицировать процесс получения инулина из корней лопуха обыкновенного и снизить время, расходуемое на него до 7 ч., а также увеличить выход продукта до 23,07±0,32% в пересчете на абсолютно сухое сырье. Методика может быть использована для экспрессного анализа качества корней лопуха обыкновенного, а также при промышленном получении инулина из данного вида сырья.

*Ключевые слова:* водорастворимые полисахариды, инулин, ультразвук

**EXPERIMENTAL SELECTION OF OPTIMAL PROCESS PARAMETERS OF ULTRASONIC EXTRACTION OF INULIN**

Dyakova N.A.

*Voronezh State University, 1, University Square, 394006, Voronezh, Russia**Abstract*

**Objective.** The aim of the study was to develop an express method for isolating and quantifying inulin from the roots of the common burdock (*Arctium lappa* L.).

**Methods.** In order to accelerate the process of extracting biologically active substances from the roots of ordinary burdock, as well as increase the yield of inulin, it was decided to use an ultrasonic bath.

**Results.** Varying the process parameters, it was possible to select the optimal conditions for extracting inulin from the roots of ordinary burdock in ultrasound treatment conditions: crushing of raw materials 0.2-0.5 mm, temperature – 80°C, extraction rate – 3, extraction duration - 40 minutes, ultrasound frequency – 25 kHz, ratio of raw materials and extractant – 1 g per 20 ml. Further increase of extraction time under ultrasonic bath conditions obviously leads to destruction of water-soluble polysaccharides. Also, optimal conditions for purification of the polysaccharide complex of the roots of the common bladder were selected to obtain pure inulin.

**Conclusion.** The proposed method allows intensifying the process of production of inulin from the roots of common bladder and reducing the time spent on it to 7 hours, as well as increasing the yield of the product to 23.07 ± 0.32% in terms of absolutely dry raw materials. The procedure can be used for express analysis of the quality of the roots of ordinary burdock, as well as for industrial production of inulin from this kind of raw material.

*Keywords:* inulin, water-soluble polysaccharides, ultrasound

## Введение

Инулин - природный полифруктозан, который частично расщепляется в желудочно-кишечном тракте до фруктозы, значение которого в современной медицине и фармации, а также пищевой промышленности сложно переоценить. Нерасщепленная часть инулина, являясь активным сорбентом, выводит из организма массу токсинов – от тяжелых металлов, радионуклидов до излишков липопротеинов низкой плотности. Инулин, являясь пребиотиком, способствует развитию нормальному функционированию желудочно-кишечного тракта, что особенно актуально, так как по данным Росздравнадзора, до 90% россиян страдают той и иной степенью дисбактериоза. К тому же инулин проявляет прокинетическую активность, стимулируя сократительную способность кишечной стенки и обеспечивая нормальный стул. Инулин входит в ряд лекарственных препаратов, более 50 биологически активных добавок, сухие молочные смеси для детского питания. Инулин, благодаря своему увлажняющему и пребиотическому действию, используется в косметологии в производстве кремов, гелей для душа, шампуней и кондиционеров, антиперспирантов, масок и сывороток, косметических средств для детей. Инулин – востребованный сахарозаменитель для больных сахарным диабетом. Инулин играет роль жирозаменителя и используется для производства низкокалорийных кондитерских и молочных продуктов [6-9].

Производство инулина является одним из наиболее привлекательных направлений для инвестирования. Рынок обладает высокими перспективами развития – потенциальная емкость превышает текущий уровень потребления в несколько десятков раз. Главным сдерживающим фактором развития отрасли выступает отсутствие конкурентоспособного отечественного производства чистого инулина. В настоящее время на российском рынке присутствует лишь инулин зарубежных производителей, отличающийся достаточно высокой стоимостью. При этом, опираясь на оценки профессора И.П. Чепурного, которые являются минимальными, потенциальный объем потребления инулина в России можно оценить: для больных диабетом 1 - 2,3 тысяч тонн; для профилактики населения - 14,6 тысяч тонн. Выпуск продуктов, бадов и лекарственных препаратов, обогащенных веществами, имеющими пребиотическую активность, растет из года в год как на Западе, так и в России. Спрогнозировать темпы роста спроса на инулин со стороны производителей пребиотиков в России довольно сложно, поскольку это достаточно молодой рынок, для которого характерен непредсказуемый рост, вызванный запуском все новых и новых продуктов. Но, вполне вероятно, что в среднем в ближайшие года данный показатель не опустится ниже 30% [7, 8].

Разработка экспрессных способов получения отечественного инулина из этих объектов является важной технологической задачей. Особое значение разработка технологий получения таких отечественных субстанций имеет в свете концепции стратегического развития фармацевтической промышленности Российской Федерации, в соответствии с которой необходимо наладить собственное производство лекарственных препаратов, доведя их долю до 50% рынка.

Инулин получают исключительно из растительных объектов путем экстракции водой с последующей очисткой. Имеющие запатентованные технологии получения инулина отличаются малым выходом продукта и значительной длительностью, экстракция сырья занимает до 3-5 суток [3]. Основные промышленные источники инулина на сегодняшний день – специально выращиваемое сырье: клубни топинамбура (до 18% инулина), корни цикория (до 40% инулина). При этом, «цикорный» инулин имеет противопоказания для людей с варикозным расширением вен и хроническими заболеваниями органов дыхания. Широко известны и другие источники инулина, в частности, такие доступные растительные объекты, обладающие значительными сырьевыми запасами на территории Российской Федерации, как лопух обыкновенный [9, 10].

Повсеместно встречающимся видом, сырье которого заготавливается от дикорастущих особей, является лопух обыкновенный (*Arctium lappa* L.) – двулетнее, повсеместно встречающееся в европейской части России, в частности, в Воронежской области, травянистое растение высотой до 2,5-3 м с мощным стержневым корнем длиной до 1,5 м. Корни лопуха обыкновенного традиционно используются в народной медицине в качестве желчегонного, потогонного, диуретического, противовоспалительного, ранозаживляющего средства, улучшающего обмен веществ. Широкое применение обусловлено богатым химическим составом данного вида лекарственного растительного сырья, основу которого составляют полисахариды (до 35-45% инулина), слизи, сесквитерпеноиды, фитостерины, полиины (арктиналь и др.), жирные кислоты, лигнаны (арктиин), эфирное масло, фенольные кислоты, органические кислоты, витамины, макро- и микроэлементы. Корни лопуха обыкновенного применяются в виде отвара. Таким образом, в медицинской и фармацевтической практике используются водные извлечения из корней лопуха обыкновенного, а фармакологический эффект обусловлен водорастворимыми соединениями,

основу которых составляет полисахариды, что вызвало исследовательский интерес по выявлению особенностей накопления данной группы соединений [1, 2, 8].

Существует способ получения инулина из корней лопуха обыкновенного с помощью исчерпывающей экстракции. 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°C. Однако значительная длительность процесса делает его малоприменимым в фармацевтической практике и требует дальнейших исследований [3].

Перспективным методом воздействия на лекарственное растительное сырье с целью интенсификации выделения разных биологически активных веществ, в том числе, водорастворимых полисахаридов, является ультразвук частотой 15-35 кГц, что позволяет не только сократить процесс экстракции на 1-2 порядка, но и значительно увеличить выход основного продукта. Использование ультразвука с частотой более 35 кГц приводит к гидролизу биологически активных веществ и в технологии фитопрепаратов не применяется [9, 10].

Цель исследования – разработка экспрессной методики получения инулина из корней лопуха обыкновенного с использованием ультразвуковой ванны.

## Методика

Для интенсификации процесса извлечения инулина применяли ультразвуковую ванну «Град 40-35», взвешивание проводили на аналитических весах «A&D GH-202», высушивание до постоянной массы – в воздушном стерилизаторе «Витязь ГП-40». В качестве экстрагента использовали воду очищенную, остальные параметры процесса подбирались экспериментально.

При разработке методики использовали корни лопуха обыкновенного, заготовленные ранней осенью (сентябрь) в экологически чистом месте в Аннинском районе Воронежской области в 2016 году. Корни однолетних особей выкапывали, очищали от тонких корней, листьев, стеблей, отмывали от земли, резали на куски, сушили теневым способом до допустимой влажности сырья (не более 14%) [1].

## Результаты исследования и их обсуждение

Для подбора оптимальных параметров экстрагирования инулина из корней лопуха обыкновенного варьировали измельченностью сырья, температурным режимом экстрагирования, кратностью и длительностью экстрагирования, соотношением сырья и экстрагента, а также частотой ультразвука. Осаждение водорастворимых полисахаридов проводили 95% спиртом этиловым, который брали в трехкратном объеме по отношению к получаемому водному извлечению. Осадок отфильтровывали под вакуумом при остаточном давлении 0,03-0,07 МПа, высушивали до постоянной массы в воздушном стерилизаторе.

Получаемый после осаждения водорастворимых полисахаридов этанолом осадок содержит примеси пектина, некоторых пигментов, некоторые органические кислоты. Для удаления пектинов решено было после растворения полученного осадка в воде провести взаимодействие с солью кальция, а для очистки от пигментов – с мелкодисперсным алюминия оксидом. После фильтрования полученного осадка примесей под вакуумом, оставшиеся примеси решено было удалить путем пропускания раствора через колонки катионита и анионита, для чего были выбраны ионообменные колонки с анионитом в гидроксильной форме АВ-17-8 и катионитом в водородной форме КУ-2-8 [4, 6, 8].

Степень очистки готового продукта проводили методом тонкослойной хроматографией, сравнивая со стандартным образцом инулина (пластинки - Silufol, система - 55% этанол, проявитель – растворы резорцина и кислоты серной, разведенной с последующим нагреванием,  $R_f \sim 0,81$ ) [6].

Все определения проводили в трех повторностях и статистически обрабатывали в программе «Microsoft Excel». Результаты эксперимента приведены в табл. 1-3.

Таблица 1. Результаты количественного определения инулина (%) из корней лопуха большого при варьировании степенью измельчения сырья и температурой ультразвуковой бани (при трехкратной экстракции по 30 мин. при частоте ультразвука 35 кГц с соотношением сырья и экстрагента 1 г на 30 мл)

Измельченность сырья, мм	Температура, °С		
	0,2-0,5	0,5-1,0	1,0-2,0
60	12,21±0,38	10,22±0,43	8,07±0,42
70	16,27±0,26	15,31±0,35	11,38±0,40
80	21,45±0,37	19,28±0,32	15,86±0,35

Таблица 2. Результаты количественного определения инулина (%) из корней лопуха большого при варьировании частотой ультразвука и длительностью экстрагирования (при трехкратной экстракции при температуре 80°C сырья измельченностью 0,2-0,5 мм с соотношением сырья и экстрагента 1 г на 30 мл)

Длительность экстракций, мин.	Частота ультразвука, кГц		
	25	30	35
20	12,48±0,21	19,03±0,29	20,05±0,36
30	14,20±0,28	22,15±0,30	21,32±0,25
40	17,50±0,33	20,81±0,32	19,13±0,28

Таблица 3. Результаты количественного определения инулина (%) из корней лопуха большого при варьировании кратностью и соотношением сырья и экстрагента (при экстракции по 40 мин. при температуре 80°C, частоте ультразвука 25 кГц и измельченности сырья 0,2-0,5 мм)

Соотношение сырья и экстрагента (г/мл)	Кратность экстракции		
	1	2	3
1:10	9,21±0,30	15,26±0,31	18,21±0,27
1:20	12,21±0,27	18,78±0,42	23,07±0,32
1:30	13,17±0,32	18,31±0,34	21,38±0,35

Дальнейшее увеличение времени экстракции и частоты ультразвука в условиях ультразвуковой ванны приводит, очевидно, к деструкции водорастворимых полисахаридов [9, 10].

Комплекс проведенных экспериментальных работ дает возможность предложить следующую методику выделения и последующего количественного гравиметрического определения инулина в корнях лопуха обыкновенного. Для получения инулина аналитическую пробу сырья измельчают до частиц размера 0,2-0,5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл воды очищенной, нагретой до температуры кипения, помещают в ультразвуковую ванну с частотой 25 КГц при температуре 80°C, экстрагируют 40 мин. Экстракцию повторяют ещё 2 раза, прибавляя по 20 мл воды. Водные извлечения объединяют и фильтруют через 3 слоя марли с подложенным тампоном ваты, вложенных в стеклянную воронку диаметром 5 см. Осаждение проводят трехкратным по отношению к водному извлечению количеством 96%-ного этилового спирта, перемешивают, охлаждают в морозильной камере при температуре -18°C 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 0,3-0,7 атм. Полученный осадок растворяют в 12 мл нагретой до 90°C воде очищенной, добавляют 10 капель 50% раствора кальция хлорида и 0,7 г мелкодисперсного порошка алюминия оксида, выдерживают 40 мин., затем фильтруют под вакуумом при остаточном давлении 0,3-0,7 атм. Полученный фильтрат последовательно пропускают через ионообменные колонки объемом 50 мл с анионитом в гидроксильной форме АВ-17-8 и катионитом в водородной форме КУ-2-8 с учетом

емкости ионообменных смол до рН элюата 6,5-7,5 и степени чистоты инулина, равной 98,5%. Для осаждения инулина к элюату вновь добавляют трехкратное по отношению к водному раствору количество 96%-ного этанола при перемешивании, охлаждая в морозильной камере при температуре -18°C в течение 1 ч., фильтрование осадка проводят через предварительно высушенный беззольный бумажный фильтр под вакуумом при остаточном давлении 0,3-0,7 атм. Осадок на фильтре последовательно промывают 15 мл раствора 96%-ного этилового спирта в очищенной воде (объемное соотношение 3:1), 10 мл смеси этилацетата и 96%-ного этилового спирта (объемное соотношение 1:1). Фильтр с осадком высушивают сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы.

Содержание инулина в пересчете на абсолютно сухое сырьё вычисляют по стандартной формуле:

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

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, %.

Предлагаемый способ позволяет интенсифицировать процесс получения инулина из корней лопуха обыкновенного и снизить время, расходуемое на него до 7 ч., а также увеличить выход продукта до 23,07±0,32% в пересчете на абсолютно сухое сырьё.

Метрологические характеристики приведены в табл. 4 (где  $N$  – число повторностей,  $f$  – число степеней свободы,  $\bar{X}$  – среднее значение определяемой величины,  $S^2$  - дисперсия,  $S$  – стандартное отклонение,  $S_x$  – стандартное отклонение средней величины,  $P$  – доверительная вероятность,  $t(P,f)$  – критерий Стьюдента,  $\Delta x$  – полуширина доверительного интервала величины,  $\varepsilon$  – относительная ошибка среднего результата) [5]. Таким образом, относительная ошибка предлагаемой методики при доверительной вероятности 95 % составляет 1,75 %.

Таблица 4. Метрологические характеристики методики количественного определения инулина в корнях лопуха обыкновенного

$N$	$f$	$\bar{X}$	$S^2$	$S$	$S_x$	$P, \%$	$t_{(P,f)}$	$\Delta x$	$\varepsilon, \%$
10	9	23,07	0,0116	0,1079	0,0341	95	2,2622	0,24	1,06

## Заключение

Разработана экспрессная методика выделения и количественного определения инулина из корней, которая может быть использована при контроле качества данного вида сырья и промышленном получении инулина. Подобраны оптимальные условия экстрагирования инулина из корней лопуха обыкновенного: измельченность сырья 0,2-0,5 мм, температура – 80°C, кратность извлечения – 3, длительность экстракций – 40 мин, частота ультразвука – 25 кГц, соотношение сырья и экстрагента 1 г на 20 мл. Также были подобраны оптимальные условия очистки полисахаридного комплекса корней лопуха обыкновенного, которые сводятся к осаждению пектинов солями кальция, абсорбции пигментов алюминия оксидом, с последующим пропусканием экстракта через ионообменные колонки. Предлагаемая методика позволяет интенсифицировать процесс получения инулина из корней лопуха обыкновенного и снизить время, расходуемое на него до 7 ч., а также увеличить выход продукта до 23,07% в пересчете на абсолютно сухое сырьё.

Исследования выполнены при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (проект МК-1177.2021.3).

## Литература (references)

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. Издание XIV. Том 4. – М.: ФЭМБ, 2018. - 1883 с. [*Gosudarstvennaya farmakopeya Rossijskoj Federacii. Izdanie XIV, Tom 4. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Edition XIV. Volume 4. Moscow: FEMB, 2018. - 1883 p. (in Russian)*]
2. Куркин В.А. Фармакогнозия / А.В. Куркин. – Самара: Офорт, 2004. – 1179. [Kurkin V.A. Farmakognoziya. Pharmakognoziya. Samara: Ofort, 2004. – 1179 p. (in Russian)]

3. Струпан Е.А., Струпан О.А. Способ получения инулина из растительного сырья // Патент РФ на изобретение №2360927. Опубликовано 10.04.2009. Бюллетень №19. [Strupan E.A., Strupan O.A. Sposob polucheniya inulina iz rastitel'nogo syr'ya. Method of producing inulin from vegetable raw materials // Patent of Russian Federation N2360927. Publication 10.04.2009. Bulletin N19. (in Russian)]
4. Дьякова Н.А., Мындра А.А., Сливкин А.И. Способ получения очищенного инулина из растительного сырья // Патент РФ на изобретение №2712094. Опубликовано 24.01.2020. Бюллетень №3. [D'yakova N.A., Myndra A.A., Slivkin A.I. Sposob polucheniya ochishchennogo inulina iz rastitel'nogo syr'ya. Method of preparing purified inulin from vegetable raw materials // Patent of Russian Federation N2712094. Publication 24.01.2020. Bulletin N3. (in Russian)].
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. Москва: «МедиаСфера» – 2000. – 312 с. [Rebrova O.Y. *Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA*. Statistical analysis of medical data. Application of the STATISTICA application package. Moscow: MediaSphere, 2000. – 312 p. (in Russian)]
6. Рудаков О.Б., Яровой С.А., Соколенко Г.Г., Полянский К.К. Исследование продуктов комплексной переработки топинамбура методом гелепроникающей и тонкослойной хроматографии // Сорбционные и хроматографические системы. – 2010. – Т.10, №6. – С. 916-922. [Rudakov O.B., Yarovoj S.A., Sokolenko G.G., Polyanskiy K.K. *Sorbcionnye i hromatograficheskie sistemy*. Sorption and chromatographic systems. – 2010. – V.10. – N6. – P. 916-922. (in Russian)]
7. Титова Л.М., Алексанян И.Ю. Технология инулина: основные тенденции развития отрасли и спорные вопросы // Пищевая промышленность. – 2016. – №1. – С. 46-51. [Titova L.M., Aleksanyan I.Yu. *Pishchevaya promyshlennost'*. Food industry. – 2016. – N1. – P. 46-51. (in Russian)]
8. Шматков Д.А., Беляков К.В., Попов Д.М. Определение инулина в корнях лопуха большого // Фармация. – 1998. – №6. – С.17-20. [SHmatkov D.A., Belyakov K.V., Popov D.M. *Farmaciya*. Pharmacy. – 1998. – N6. – P. 17-20. (in Russian)].
9. Dyakova N.A., Slivkin A.I., Gaponov S.P. et al. Development and validation of an express method for assay of water-soluble polysaccharides in common burdock (*Arctium lappa* L.) roots // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2015. – V.49. – N9. – ponov S.P., Myndra A.A., Shushunova T.G., Samylina I.A. Development and validation of an express technique for isolation and quantitative determination of water-soluble polysaccharides from roots of *Taraxacum officinale* Wigg // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2018. – V.52. – N4. – P. 343-346.

### Информация об авторах

Дьякова Нина Алексеевна – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет». E-mail: Ninochka\_V89@mail.ru

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.