

## АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД МЕТОДІВ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ ІНУЛІНУ

Національний фармацевтичний університет, Харків

**Вступ.** Актуальним лишається пошук оптимальних методів аналізу для оцінки інуліну, як в сировині, так і в готових лікарських препаратах і біологічно активних добавках, продуктах харчування.

**Мета.** Провести критичний аналіз існуючих методів контролю якості інуліну.

**Методи.** Проаналізовано наукові публікації присвячені визначенню якісного та кількісного складу інуліну в різних об'єктах.

**Результати.** Наводиться порівняльна характеристика сучасних методів аналізу, опираючись на джерело отримання досліджуваного інуліну, як для цільної його структури, так і з перерахунком на фруктозу та глюкозу після гідролізу основної речовини.

**Ключові слова:** інулін (Inu), поліфруктозан, поліфруктан, фруктоза (Frc), глюкоза (Glu), методи контролю якості.

**Вступ.** Інулін (Inu) являє собою резервний поліфруктан, що продукується рослинами родини Asteraceae, Liliaceae, Campanulaceae, Polemoniaceae і деякими видами бактерій (Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae, Streptococcaceae, Bacillaceae, Actinomycetaceae) і грибів (Aspergillus sydowi). Роботами багатьох дослідників доведена гіпоглікемічна, гіпохолестеринемічна [12], пребіотична [13, 21, 22], імуномодулююча активність цього полісахариду [21, 24], у зв'язку з чим, він широко використовується для виробництва ряду харчових і біологічно активних добавок (при вмісті основної речовини не менше 90% за Official Monographs «Inulin» [14, 32]). Однокомпонентні інуліни (з вмістом основної речовини не менше 99,9%) знаходять своє застосування в біохімічних і імунобіологічних реакціях при визначенні інулінового кліренсу [4, 9, 30].

При виділенні Inu з перерахованих джерел головне завдання полягає у його якісному і кількісному визначенні з метою подальшої стандартизації. Однак, труднощі, що виникають у процесі визначення якості субстанції, пов'язані зі складною структурою і значним варіюванням складу поліфруктану. Так, Inu являє собою суміш структурно подібних полімер-аналогів, і складається з 10-60 молекул фруктози (Frc), з'єднаних між собою  $\beta(2 \rightarrow 1)$  - глікозидними зв'язками, і однієї термінальної не відновлюючої молекули глюкози (Glc); може мати як циклічну, так і розгалужену молекулу [12, 17, 20, 22]. Крім того, в залежності від джерела одержання, варіюється і ступінь полімеризації (degree of polymerization, DP) його ланок. Так, цей показник для Inu, отриманого з рослинної сировини, становить від 2 до 200, а для бактеріального - від 10 000 до 100 000 і вище. Тобто, стандарти Inu, добути з різних джерел, мають і різну ступінь полімеризації. Інші складності аналізу зумовлені взаємною присутністю у екстракті з сировини вільної Frc і зв'язаної Glc, що також збільшує загальну похибку аналізу [15]. До того ж, враховуючи фізико-хімічні властивості Inu, а саме його розчинність у суміші етанол-вода (4:1) і лише часткове руйнування в процесі кислотного гідролізу, виключається використання класичної методики визначення, яка прийнята для харчових волокон [16, 25].

**Мета.** Порівняльний аналіз існуючих методів кількісного визначення Іну за критеріями точності, відтворюваності і простоти виконання.

**Матеріали та методи.** Проведено аналіз наукової літератури та нормативної документації.

**Результати та висновки.** На сьогоднішній день не один з методів аналізу не можна назвати «еталонним» для встановлення достовірної структури всіх компонентів поліфруктану. Найчастіше для кількісної оцінки застосовують сукупність таких аналітичних методів, як високоефективна рідинна хроматографія (HPLC) [19, 20], капілярна газова хроматографія (GH) [21, 22, 24], хромато-мас-спектрофотометрія [12], високоефективна аніонно-обмінна хроматографія з імпульсним амперометричним детектуванням (HPAC-PAD) [23, 28], високоефективна аніонно-обмінна хроматографія з імпульсним електрохімічним детектуванням (HPAC-PED) [23], високоефективна тонкошарова хроматографія (HPTLC) [21], спектрофотометричне [25, 30] і фотокolorиметричне визначення [2, 8, 26]. Але слід враховувати, що не всі з перерахованих методів аналізу доцільно застосовувати для цільної структури Іну. Найчастіше з цією метою використовуються методи HPAC-PAD і за показником заломлення [27]. Проте найбільшою популярністю користуються методи, засновані на ферментативному або кислотному гідролізі Іну з подальшим перерахуванням останнього на Frc. Вибір саме Frc обумовлений тим фактором, що хімічний склад Іну, а саме кількість Frc, варіюється в залежності від сировинної бази (95-98%), що може призвести до різних при інтерпретації результатів аналізу. Для усунення цієї похибки в якості стандартної речовини слід використовувати сполуки з фіксованим складом, якими і є Frc та Glc [33]. Ферментативне розщеплення Іну здійснюється за допомогою комерційно доступною суміші ензимів ендо- і екзоінулінази (ЄС 3.2.1.7  $\beta(2\rightarrow 1)$ -D-фруктан: фруктаногідролаза і ЄС 3.2.1.80 D-фруктан: фруктаногідролаза, відповідно). Час гідролізу підбирається в залежності від співвідношення кількості поліфруктану і ензиму в суміші і варіює від 4 до 48 годин. Ступінь гідролізу становить близько 95 %. Основними компонентами гідролізату є Frc і олігофруктозани зі ступенем полімеризації 2-4 [25].

Кислотний спосіб гідролізу Іну ґрунтується на його обробці сильними неорганічними (HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) і органічними (трихлороцетова, трифтороцетова) кислотами, взятими в концентраціях 0,05-0,2 М. Кислотний гідроліз вимагає менших витрат часу (1-5 год) і в якості основних продуктів також дає Frc [1, 28]. Так, згідно джерел літератури, у БАД розрахунок вмісту Іну проводять методом високоефективної рідинної хроматографії з рефрактометричним детектором після гідролізу 2% розчином оксалатної кислоти. Кількість Іну знаходять шляхом вирахування фруктози моно- і дисахаридів від загальної кількості фруктози, помилка методу  $\pm 2\%$  [10, 27]. Однак, слід враховувати, що за своєю структурою моно-, оліго- і полісахариди відносяться до сполук, що погано поглинають в УФ-спектрі (тільки в короткохвильовій області, менше 200nm), отже їх виявлення методами ВЕРХ дещо ускладнене. Найбільш часто застосовуваний для цієї мети детектор – рефрактометр – володіє не дуже високою чутливістю і до того ж виключає використання градієнта розчинника в процесі аналізу, що сильно звужує область застосування методу. Крім того, метод ВЕРХ дозволяє визначити вільні цукри в Іну (фруктозу, глюкозу і сахарозу) і низькомолекулярні складові зі ступенем полімеризації менше

5. Фракції з DP більше 5 не можуть бути розділені, що робить даний метод аналізу неефективним для повноцінної характеристики Іну [20].

Інший метод аналізу - хромато-мас-спектрометрія (ГРХ/МС) - дає можливість визначити нейтральні цукри і олігомери Іну з DP менше 17. У свою чергу, високоефективна аніонообмінна хроматографія з імпульсним амперометричним детектуванням (НРАЕС-PAD) дозволяє визначити високомолекулярні олігомери Іну, обчислити середню ступінь полімеризації (DPn) і середню молекулярну масу (DPw) поліфруктану. Згідно з даними літератури, НРАЕС-PAD лежить в основі таких методик аналізу інуліну, як АОАС 997.08 і АОАС 999.03. Суть першої з них полягає у кількісному визначенні вільної фруктози, сахарози і глюкози до гідролізу, після чого проводять ферментативний гідроліз, і, знову визначають вміст моносахаридів. За різницею цукрів до і після гідролізу роблять висновок про кількісний вміст поліфруктану, що визначається. Інший метод заснований на видаленні амілази і сахарази шляхом перетворення їх у альдитоли, що, на відміну від методу АОАС 997.08, дає можливість аналізу в зразках з високим вмістом моносахаридів.

Однак необхідно відзначити, що низькомолекулярні олігомери (DP<5), що містяться в Іну, не можуть бути виявлені методом НРАЕС-PAD [28].

Що ж стосується спектро- і фотокolorиметричного визначення Іну, то методика заснована на здатності цукрів (фруктози, сахарози) при нагріванні з кислотами утворювати продукти, що мають максимуми поглинання в області 200-380нм з подальшим детермінуванням. А оскільки вітчизняна нормативна документація відсутня, з метою кількісного визначення Іну найчастіше посилаються на закордонний стандарт Official Monographs «Inulin», згідно з яким вміст Frc в Іну повинен бути не менше 94% і не більше 102%, розрахованого на сухий препарат [33]. Згідно монографії, гідроліз проводять в суміші барбітурової і соляної кислоти на водяній бані з наступним спектрофотометричним визначенням методом стандарту при 435нм. При розрахунку відсоткового вмісту Іну також береться до уваги відсоток вільної Frc і відсоток сполучень Glu. Існує велика кількість модифікацій даного методу. Крім того, в залежності від аналізованого об'єкту (екстракт із сировини або ж продукт харчування, біологічно активна добавка) варіюються умови та методи визначення поліфруктозана [4]. Так, для коренів кульбаби і кореневищ з коренями оману описані методики аналізу Іну після кислотного гідролізу з наступним утворенням аналітичного компонента за реакцією Селіванова (в суміші з резорцином і спиртом), з подальшим спектрофото - або фотокolorиметричним визначенням [8]. Реакція специфічна для кетогексоз і не вимагає жорстких умов проведення. Однак недолік методики пов'язаний зі зниженням оптичної активності розчину з часом, що обумовлює необхідність варіювання складу реакційної суміші, застосування стабілізаторів (тіосечовина, аскорбінова кислота, FeCl<sub>3</sub>, FeNH<sub>4</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), зміни параметрів реєстрації оптичної густини, температури. Крім того, для чистоти експерименту показане проведення трьохкратної екстракції спиртом або ацетоном, яка спрямована на видалення з реакційної суміші вільних моно- і дисахаридів, присутність яких може впливати на точність вимірювання. Похибка аналізу близько 3% [6, 7].

Для коренів кульбаби і лопуха використовується ВЕРХ (HPLC) після

кислотного гідролізу при довжині хвилі 195нм на силікагелі з прищепленою амінофазой. Але оскільки водні розчини сухих екстрактів можуть містити певну кількість Frc до проведення гідролізу, в деяких випадках слід зберігати її концентрацію в розчині сухого екстракту до гідролізу. Крім того, суттєве значення при аналізі має визначення меж піку Frc, оскільки навіть малі відхилення дають значний діапазон результатів, внаслідок дуже малого питомого поглинання вуглеводів навіть при 195нм [3, 30]. Визначення вмісту Iru в бульбах жоржини також проводять методами ВЕРХ (НПЛС) (враховуючи коефіцієнт приєднання води при гідролізі), ГРХ/МС і спектрофотометрично за продуктом трансформації Frc у кислому середовищі - 5-гідроксиметилфурфуролом (5-ГМФ). Аналіз проводять шляхом нагрівання на водяній бані Iru в суміші з концентрованою соляною кислотою при температурі 80 °С. Утворений в ході реакції 5-ГМФ, визначають спектрофотометрично. Але труднощі виникають у процесі підбору оптимальної температури та часу гідролізу поліфруктана [11]. У продуктах харчування Iru визначають за адаптованим методом Бертрана, заснований на окисленні моносахаридів під дією реактиву Фелінга до одноосновних альдонових кислот, які відновлюють  $Cu^{2+}$  до  $Cu^{+}$ . З допомогою  $Cu^{+}$  переводять сульфат заліза (III)-амоній в сульфат заліза (II), що досягається одним з титриметричних методів окислення-відновлення - перманганатометричним. Отже, в результаті послідовно проведеної серії окисно-відновних реакцій знаходять об'єм титрованого розчину перманганату, за величиною якого визначають концентрацію загального цукру в перерахунку на інвертний цукор. Метод досить трудомісткий з похибкою близько 3% [5]. Слід також врахувати, що всі методики визначення, в основі яких лежить гідроліз Iru, передбачає розрахунок процентного вмісту основного компоненту як різницю загальної кількості полісахаридів і кількості зв'язаної Glc і вільної Frc.

Пов'язану Glc визначають йодометрично (за Вильштеттером, замісникове титрування), а вільну Frc - хроматографічно (НРТЛС) [2, 34]. Йодометричний метод аналізу Glc заснований на здатності альдогексози під дією лужних розчинів йоду окиснюватися з утворенням гексонових кислот. Надлишок йоду віддитровують розчином натрію тіосульфату в присутності крохмалю. Наявність вільної фруктози в Iru пов'язане з процесом деполімеризації та корелює з погіршенням якості цього полісахариду. Визначення проводять методом НРТЛС. Отже, порівнюючи наведені методи, ми прийшли до висновку, що на сьогоднішній день жоден з наведених методів аналізу повністю не задовольняє зазначеним раніше вимогам, а саме точності, відтворюваності, простоти виконання. Найбільш точні результати дають методи НПЛС, ГРХ/МС, НРАЕС-РАD, однак вони досить експенсивні, вимагають наявності спеціального обладнання, яке може собі дозволити не кожна лабораторія. Найбільш економічними є методи, засновані на спектрофотометричному фотоелектроколориметричному детермінуванні. Але, на жаль, відсутність поточної і точної методики залишає актуальним питання розробки та/або вдосконалення вже наявних методик кількісного визначення Iru.

#### **Література**

1. Бархатов В.Ю. Способ гидролиза инулина из топинамбура / В.Ю. Бархатов, Э.И. Мамедова, В.С. Рубан // Известия вузов. Пищевая технология. 1998. – № 2–3. – С. 48–49.

2. Исследование продуктов комплексной переработки топинамбура методом гельпроникающей и тонкослойной хроматографии / О.Б. Рудаков и др. // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2010. – Т.10, вып. 6. – С. 916-922.

3. Количественное определение инулина в сухих водных экстрактах из корней одуванчика и лопуха / Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Слизов Ю.Г. и др. // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы IV Всероссийской конференции. 21–23 апреля 2009 г.: в 2 кн. / под ред. Н.Г. Базарновой, В.И. Маркина. – Барнаул: Изд-во Алт. ун-та, 2009. – Кн. 2. – С. 76-78.

4. Манешин В.В. Пат. 2148588 РФ, МКИ 7 С 08 В 37/00, 37/18. Способ получения инулина из клубней топинамбура / В.В. Манешин, В.Д. Артемьев, Ю.П. Васильева. – №98115947/04; заявлено 20.08.1998; опубл. 10.05.2000. Бюл. № 13. – 4 с.

5. Межгосударственный стандарт ГОСТ 3628 – 78. Молочные продукты. Методы определения сахара.

6. Методика количественного определения суммарного содержания полифруктанов в корнях одуванчика лекарственного / Оленников Д.Н., Танхаева Л.М., Чехирова Г.В., Петров Е.В. // Химия растительного сырья. – 2010. - №2. – С. 85-89.

7. Оленников Д.Н. Методика количественного определения суммарного содержания полифруктанов в корневищах и корнях девясила высокого / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2008. - №1. – С. 95-99.

8. Оленников Д.Н. Исследование колориметрической реакции инулина с резорцином в зависимости от условий ее проведения / Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Химия раст. сырья. – 2008. – №1. – С.87-93.

9. Перковец М.В. Инулин и олигофруктоза – больше, чем просто пищевые волокна и пребиотики / М.В. Перковец // Молочная промышленность. – 2007. – № 9. – С. 55-56.

10. Руководство по методам контроля качества и безопасности БАД к пище. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.

11. Стандартизация инулина, получаемого из клубней георгины простой. Изучение некоторых физико-химических свойств инулина / Н.А. Ананьина, О.А. Андреева, Л.П. Мыкоц, Э.Т. Оганесян // Химико-фармацевтический журнал. – Т. 3. – № 3. – 2009. – С. 35-37.

12. Alistair M.S. Food Polysaccharides and Their Applications / M.S. Alistair, O.P. Glyn // CRC Press, 2014. – 752p.

13. Andersson H. Health effects of probiotics and prebiotics: a literature review on human studies / H. Andersson // Scand. J. Nutr. – 2001. – Vol. 45. – P. 58–75.

14. British Pharmacopoeia [Электронный ресурс]. The British Pharmacopoeia Secretariat. – London, 2009. – Vol. 1. – P. 10952. - Режим доступу: [http:// www.pharmacopoeia.co.uk](http://www.pharmacopoeia.co.uk).

15. De Leenheer L. Progress in the elucidation of the composition of chicory inulin / L. De Leenheer, H. Hoebregs // Starch. – 1994. – Vol. 46. – P. 193–196.

16. Determination of inulin and oligofructose in food products / P. Dysseleer, D. Hoffem, J. Fockedeey et al. // Eur. J. Clin. Nutr. –1995. – Vol. 49 (suppl. 3). – P. 145–152.

17. French A.D., Waterhuose A.L., Chemical structure and characteristics of fructans, in Science and Technology of Fructans / M. Suzuki, N.I. Chatterton, Eds., CRC Press, Boca Raton, FL. – 1993. - P. 41-81.

18. Hoebregs H. Fructans in foods and food products, ion-exchange chromatographic metod: collaborative stady. / H. Hoebregs // J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int. – 1997. – Vol.80.- P.1029-1037.

19. HPLC Determination of Inulin in Plant Materials / I. Simonova, J. Karovicova, V. Mastihuba, Z. Kohajdova // Acta Chim. Slovaca. – 2010. – Vol 3(2). – P. 122–129.

20. HPLC Analysis of mono- and disaccharides in food products / Tr.N. Petkova, A.P. Brabant, An. Masson, P. P. Denev // Scientific Works Vol. LX „Food Science, engineering and technology 2013“. - 18-19 October, 2013, Plovdiv.- P.761-765.

21. Identification of hydrolyzed inulin syrup and high-fructose corn syrup in apple juice by capillary gas chromatography / N.H. Low , M.A. McLaughlin , S.W. Page et al. // J. AOAC Int. – 2001. - Vol. 84(2). – P.486-92.

22. In Vitro Kinetics of Prebiotic Inulin-Type Fructan Fermentation by Butyrate-Producing Colon Bacteria: Implementation of Online Gas Chromatography for Quantitative Analysis of Carbon Dioxide and Hydrogen Gas Production / G. Falony, A. Verschaeren, F. De Bruycker et al. // Appl. Environ. Microbiol. – 2009. - Vol. 75, No.18. – P.5884-5892.

23. Isolation and structural analysis of new fructans produced by chicory / J.W. Timmermans, T. Slaghek, M. Iizuka et al. // J. Carbohydr Chem. - 2001. - Vol, 20, No5.- P.375–395.

24. Joye D. Determination of oligo-fructose, a soluble dietary fiber, by high-temperature capillary gas chromatography / D. Joye, H. Hoebregs // J. AOAC Int. – 2000. – Vol.83. – P. 1020-1031.

25. McCleary V.B. Measurement of Total Fructan in Foods by Enzymatic. Spectrophotometric Method / V.B. McCleary, A. Murpy // J. AOAC int. – 2000. – Vol. 83, No2. – P. 356–364.

26. Quemener B. Determination of inulin and oligofructose in food products and integration in the AOAC method for the measurement of total dietary fibre / B. Quemener, J. F. Thibault, P. Coussement // Lebensmitt. Wissench Technol. – 1994. – Vol. 27. – P. 125–132.

27. Retnanigtyas Y. Determination of inulin from multivitamin syrup product by High Performance Liquid Chromatography with RI detector / Yuni Retnanigtyas // Indo. J. Chem. – 2012. – 12 (2). – P. 201-205.

28. Ronkart S.N. Isolation and identification of Inulooligosaccharides resulting from Inulin hydrolysis / S.N. Ronkart, C.S. Blecker, H. Fourmanoir H., et al. // Analytica Chimica Acta. – 2007. – Vol. 604, Is.1. – P. 81–87.

29. Simonovska B. Determination of inulin in foods / B. Simonovska // J AOAC Int. – Vol. 83, No.3. – 2000. – P. 675–678.

30. Spectrophotometric method for the quantitative determination of lactulose in pharmaceutical preparations / M.A. Khan, Z. Iqbal, M.R. Jan et al. // Журнал аналитической химии. – 2006. – Т. 61, №1. – С. 37–41.

31. The bifidogenic effect of Taraxacum officinale root / I. Trojanová, V. Rada, L. Kokoška, E. Vlková // Fitoterapia. – 2004. – Vol. 75. – P. 760–763.

32. The United States Pharmacopoeia. – 23-nd ed. – Rockville: US

Pharmacopoeia Convention, Inc., 1995. – 2391 p.

33. The United State Pharmacopeia: 30 – NF25 [Електронний ресурс] // Rockville: The United State Pharmacopeia, Inc.– 2007. — Vol. 29(6). - P.1906 – Режим доступу: <http://pharmacyebooks.com/2009/03/united-states-pharmacopoeia-usp30-nf25.html>.

34. Use of HPTLC for quantitative evaluation of inulin in food products / M. Prosek, B. Simonovska, T. Golc-wondra et al. // J. Planar. Chromatogr. - Mod. TLC. – 2007. – Vol. 16 (1). – P. 58–62.

35. Vendrell-Pascuas, S. Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. / S. Vendrell-Pascuas, A. Castellote- Bargallo & M. Lopez- Sabater // J. Chromatogr. A. - 2000. – Vol. 881. – P.591-597.

*О.А. Евтифеева, К.В. Дынник, Н.М. Смелова*

## **Аналитический обзор методов контроля качества инсулина**

**Национальный фармацевтический университет, Харьков**

**Введение.** Актуальным остается поиск оптимальных методов анализа для оценки инулина, как в сырье, так и в готовых лекарственных препаратах и биологически активных добавках, продуктах питания.

**Цель.** Провести критический анализ существующих методов контроля качества инулина.

**Метод.** Проанализировано научные публикации, посвященные определению качественного и количественного состава инулина в разных объектах.

**Результаты.** Приводится сравнительная характеристика современных методов анализа, учитывая источник получения анализируемого инулина, как для цельной структуры, так и с перерасчетом на фруктозу после гидролиза основного вещества.

**Ключевые слова:** инулин (Inu), полифруктозан, полифруктан, фруктоза (Frc), глюкоза (Glu), методы контроля качества.

*O. Ievtifieieva, K. Dynnyk, N. Smielova*

## **Analytical review of methods for quality control of inulin**

**National University of Pharmacy, Kharkiv**

**Introduction.** Search for optimal methods of analysis of inulin in raw materials, finished medicines and dietary supplements food is relevant.

**Purpose.** To conduct a critical analysis of the existing quality control methods of inulin.

**Methods.** Scientific publications devoted to the definition of qualitative and quantitative composition of inulin in different objects have been analyzed.

**Results.** Comparative characteristics of modern methods of analysis is presented, taking into account the source of inulin analyzed as a whole for the structure and to the conversion of fructose after hydrolysis of the base material.

**Key words:** inulin (Inu), polyfructosan, polyfructan, fructose (Frc), glucose (Glu), quality control methods.

### **Відомості про авторів:**

**Євтифєєва Ольга Анатоліївна** – д. фарм. н., професор, завідувач каф. аналітичної хімії НФаУ. Адреса: Харків, вул. Блюхера, 4, тел.: (0572) 67-94-24.

**Дынник Катерина Віталіївна** – к. фарм. н., доцент кафедри аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету. Адреса: Харків, вул. Блюхера, 4, тел.: (0572) 67-94-24.

**Смелова Наталія Миколаївна** - магістрант кафедри аналітичної хімії Національного фармацевтичного університету. Адреса: Харків, вул. Блюхера, 4, тел.: (0572) 67-94-24.

Зб. наук. праць співробіт. НМАПО  
імені П.Л.Шупика 24 (5)/2015