

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КУМАРИНОВ В КОРНЕВИЩАХ И КОРНЯХ ЛЮБИСТКА ЛЕКАРСТВЕННОГО

Овчинникова С.Я.¹, Губанова Л.Б.¹, Орловская Т.В.²

¹Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (353532, Ставропольский край, Пятигорск, Калинина, 11), e-mail: ovchinnikova@yandex.ru

²Северо-кавказский федеральный университет, Пятигорск, Россия, e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

Разработана и валидирована методика количественного определения суммы кумаринов в пересчете на ангелицин в корневищах и корнях любистка лекарственного (*Levisticum officinale* Koch.) методом спектрофотометрии. Спектры поглощения спиртовых извлечений из сырья, полученных с помощью 96% спирта этилового, имеют полосы поглощения от 250 до 300 нм, а максимум поглощения при 270±2 нм, что соответствует максимуму поглощения СО ангелицина. Изучены валидационные характеристики новой методики определения кумаринов, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья по параметрам специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность, прецизионность. Содержание кумаринов в пересчете на ангелицин в корнях и корневищах любистка лекарственного, определенное данной методикой, составило 6,67% в пересчёте на воздушно-сухое сырьё.

Ключевые слова: ангелицин, кумарины, любисток лекарственный, корневища и корни, спектрофотометрия, идентификация, количественное определение, валидация.

QUANTITATIVE DETERMINATION COUMARIN IN RHIZOMES AND ROOTS OF LOVAGE DRUG

Ovchinnikova S.Y.¹, Gubanov L.B.¹, Orlovskaya T.V.²

¹Pyatigorsk branch GBOU VPO «Volgograd State Medical University», Ministry of Health of Russia, Pyatigorsk, Russia (353532, Stavropol, Pyatigorsk, Kalinina, 11), e-mail: ovchinnikova@yandex.ru

²The North Caucasus Federal University, Pyatigorsk, Russia, e-mail: tvorlovskaya@mail.ru

Developed and validated method for the quantitative determination of the amount based on coumarin angelicin in the rhizomes and roots of Lovage drug (*Levisticum officinale* Koch.) By spectrophotometry. The absorption spectra of alcoholic extracts from raw materials, obtained by using 96% ethyl alcohol, have absorption bands from 250 to 300 nm and an absorption maximum at 270 ± 2 nm, which corresponds to the maximum absorption of CO angelicin. Studied validation methodology for determining the characteristics of the new coumarin, which allows its use for a reliable assessment of the quality of raw materials in the parameters specificity, linearity, limit of quantification, accuracy, precision. Coumarin content based on angelicin in roots and rhizomes lovage medicament determined by this technique, was 6.67 %, based on air- dry feed.

Keywords: angelicin, coumarins, *Levisticum officinale*, rhizomes and roots, spectrophotometry, identification, quantification, validation.

Введение. Любисток лекарственный (*Levisticum officinale* Koch.) – многолетнее травянистое растение с толстым корневищем с длинными ветвистыми корнями семейства сельдерейных (Ariaceae). Подземные органы любистка лекарственного содержат комплекс биологически активных соединений, среди которых основные – кумарины, фталиды, ароматические соединения. В научной медицине нашей страны любисток не применяется, но включен в Европейскую и Британскую травяную фармакопеи (БТФ), а также в фармакопею России I издания [3]. Несмотря на широкую популярность за рубежом, в нашей стране это растение известно лишь в народной медицине. Особо актуальным представляется поиск лекарственных средств с направленным фармакологическим действием, например, спазмолитической, диуретической и антимикробной активностями в сочетании с

антиоксидантным эффектом, которые связаны с содержанием полифенольного комплекса [1, 4, 5].

Ограниченность производимой из данного сырья отечественной продукции объясняется не только недостаточностью химических исследований, но и отсутствием современной нормативной документации, для разработки которой необходимо установить показатели подлинности и качества сырья [2].

Цель работы: разработка методики количественного определения суммы кумаринов в сырье любистка лекарственного, в пересчете на ангелицин.

Материал и методы исследования. Объект исследования – воздушно-сухие измельченные корневища и корни культивируемых растений (Россия).

Спектрофотометрическое количественное определение суммы кумаринов проводили по следующей методике. Около 0,5 г сырья (точная масса) помещали в колбу емкостью 100 мл и прибавляли 50 мл спирта этилового 96%, содержащего 1% концентрированной кислоты хлористоводородной. Содержимое колбы кипятили однократно с обратным холодильником в течение 30 минут, затем полученное извлечение фильтровали и упаривали. Остаток растворяли в спирте этиловом и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, после чего доводили тем же растворителем до метки. Затем 2,5 мл полученного извлечения переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки спиртом, после чего тщательно перемешивали. Спектры поглощения извлечений из сырья и раствора СО ангелицина регистрировали на спектрофотометре СФ-2000 относительно спирта этилового. Остаток количественно переносили и растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл в 20 мл спирта этилового 96%, объем раствора в колбе доводили до метки тем же растворителем. Аликвоту в количестве 1 мл переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и объем раствора в колбе доводили до метки спиртом этиловым 96%. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – спирт этиловый 96%.

В качестве стандартного образца использовали СО ангелицина. Для этого 0,1 г СО ангелицина (точная навеска) помещали в мерную колбу вместимостью 50 мл и растворяли в 40 мл спирта этилового 96%, после чего содержимое колбы доводили до метки тем же растворителем (раствор А). 1мл раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки тем же растворителем. Оптическую плотность полученного раствора измеряли при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – спирт этиловый 96% Содержание кумаринов (X,%) в пересчете на ангелицин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

Содержание кумаринов (X,%) в пересчете на ангелицин и абсолютно сухое сырье рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times W_{x1} \times W_{x2} \times V_{a0} \times 100\% \times 100}{A_0 \times a_x \times V_{ax} \times W_{01} \times W_{02} \times (100 - B)}, \text{ где}$$

A_0 и A_x – значения оптических плотностей растворов СО ангелицина и анализируемого образца соответственно;

a_0 и a_x – массы навесок СО ангелицина и извлечения любистка лекарственного соответственно, г;

W_0 и W_x – мерные колбы, использованные для разведения навесок СО ангелицина и анализируемого образца соответственно, мл;

V_{a0} и V_{ax} – аликвоты растворов СО и анализируемого образца соответственно, мл.

B – влажность сырья, 9,70%.

Определение *линейности методики* проводили с помощью оценки градуировочного графика, отражающего зависимость величины оптической плотности от количества кумаринов в 1 мл извлечения из экстракта любистка лекарственного. Для этого были приготовлены 5 извлечений по вышеописанной методике, но из разных навесок сырья: 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 и 0,7 г.

Количественное содержание кумаринов в 1 мл извлечения рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times a_0 \times W_{x2} \times V_{a0} \times 100}{A_0 \times V_{ax} \times W_{01} \times W_{02} \times (100 - B)}, \text{ где}$$

A_0 и A_x – значения оптических плотностей растворов СО ангелицина и анализируемого образца соответственно;

a_0 – масса навески СО ангелицина, г;

W_0 и W_x – мерные колбы, использованные для разведения навесок СО ангелицина и анализируемой аликвоты соответственно, мл;

V_{a0} и V_{ax} – аликвоты растворов СО и анализируемого образца соответственно, мл.

B – влажность сырья, 9,70%.

Результаты исследования и их обсуждение. Разработке оптимальной методике количественного анализа и выбору аналитического вещества предшествовала работа по изучению поглощений в УФ-области спектра спиртовых извлечений, полученных из сырья любистка лекарственного.

Полученные данные свидетельствуют о том, что спектры поглощения спиртовых извлечений из сырья с помощью 96% спирта этилового, имеют полосы поглощения от 250 до 300 нм, а максимум поглощения при 270 ± 2 нм соответствует максимуму поглощения СО ангелицина.

По результатам эксперимента построен градуировочный график зависимости значений оптической плотности от содержания кумаринов в исследуемом растворе (Рис. 1).

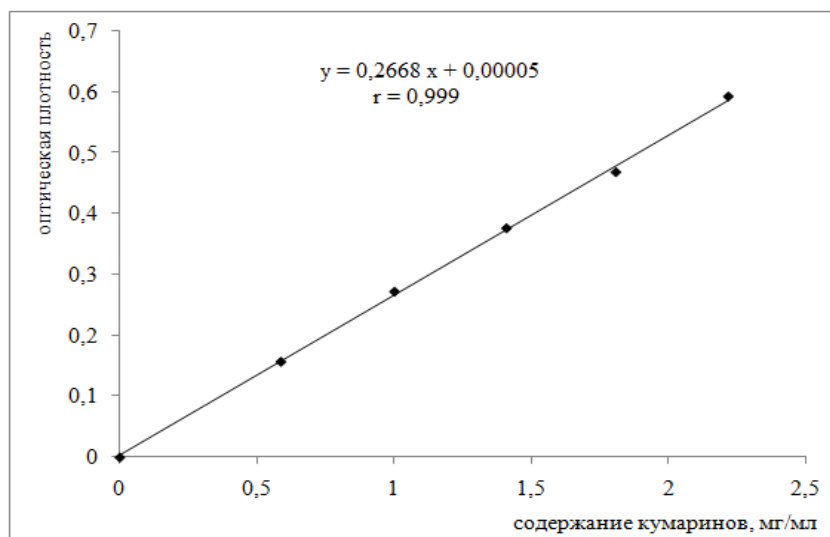


Рисунок 1 – Градуировочный график зависимости оптической плотности от содержания кумаринов в исследуемом извлечении, уравнение регрессии, коэффициент корреляции

Наличие линейной зависимости между x и y подтверждали расчетным путем. Коэффициенты a и b и метрологические характеристики зависимости рассчитывали с использованием регрессионного анализа методом наименьших квадратов по экспериментально измеренным значениям переменной y для заданных значений аргумента x (Табл. 1).

Рассчитанное значение коэффициента корреляции составило 0,999.

Коэффициенты a и b 0,2668 и 0,00005 соответственно. Таким образом, уравнение линейной зависимости имеет вид: $y = 0,2668 \times x + 0,00005$.

Значение коэффициента корреляции максимально приближено к 1, поэтому можно утверждать о наличии линейной зависимости значений оптической плотности от содержания кумаринов в исследуемом извлечении.

Таблица 1 – Промежуточные данные для вычисления коэффициента корреляции

x_i	y_i	$x_i \times y_i$	x_i^2	y_i^2
0,5884	0,157	0,09238	0,3462	0,0246
1,0194	0,272	0,2773	1,0392	0,0740

1,4091	0,376	0,5298	1,9856	0,1414
1,7539	0,468	0,8208	3,0762	0,2190
2,2186	0,592	1,3134	4,9222	0,3505
$\sum x =$ 6,9894	$\sum y =$ 1,865	$\sum z =$ 3,0337	$\sum w =$ 11,3693	$\sum v =$ 0,8095

Для определения *внутрилабораторной воспроизводимости (прецизионности)* методики содержание кумаринов определяли в шести разных навесках сырья по разработанной методике. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Таблица 2 – *Результаты количественного определения кумаринов в экстракте любистка лекарственного* (в пересчете на ангелицин и абсолютно сухое сырье) ($A_0 = 0,591$; $B=9,70\%$)

Масса навески, г	Значение оптической плотности, А ($\lambda = 270$ нм)	Найдено кумаринов, %	Метрологические характеристики
0,5048	0,376	6,9785	$\bar{x} = 6,6696\%$ $SD = 0,2024$ $RSD=3,04\%$
0,5116	0,368	6,7393	
0,4997	0,347	6,5060	
0,5005	0,342	6,4020	
0,4990	0,354	6,6466	
0,5028	0,362	6,7454	

Как следует из представленных данных, содержание кумаринов в извлечении любистка лекарственного, найденное спектрофотометрическим методом, составило 6,67%, а относительная погрешность определения – 3,04%.

Для оценки *правильности* методики готовили модельный препарат с содержанием кумаринов в исследуемом извлечении 2,155 мг/мл, полученном из навески 0,7 г сырья, так как это содержание находится на верхнем пределе линейности методики.

Чтобы получить смеси с тремя уровнями концентраций – 1:0,5; 1:1 и 1:2, полученное извлечение разводили спиртом этиловым 96%.

На каждом уровне концентраций проводили определение содержания кумаринов, рассчитывали открываемость и оценивали правильность методики (Табл. 3).

Таблица 3 – *Результаты оценки правильности методики количественного определения кумаринов в экстракте любистка лекарственного* (исходное содержание 2,155 мг/мл)

Разведение модельного препарата	Расчетное содержание суммы кумаринов, мг/мл	Найденное содержание суммы кумаринов, мг/мл	Открываемость, R,%	Метрологические характеристики

1: 0,5	1,4370	1,4771	102,79	$\bar{x} = 100,79\%$ $SD = 2,3365$ $RSD=2,32\%$
1: 0,5	1,4370	1,5027	104,57	
1: 0,5	1,4370	1,4101	98,13	
1: 1	1,0775	1,0536	97,78	
1: 1	1,0775	1,0917	101,32	
1: 1	1,0775	1,0773	99,98	
1: 2	0,7183	0,7409	103,15	
1: 2	0,7183	0,7129	99,25	
1: 2	0,7183	0,7196	100,18	

Из представленных результатов следует, что на всех трех уровнях концентраций анализируемого объекта получаются сопоставимые результаты, а относительная погрешность определения правильности методики равна 2,32%.

Вывод. В результате проведенных исследований разработана методика количественного определения кумаринов в пересчете на ангелицин в растительном сырье методом спектрофотометрии. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям линейность, прецизионность и правильность.

Содержание кумаринов в пересчете на ангелицин в корнях и корневищах любистка лекарственного, определенное данной методикой, составило 6,67% в пересчёте на воздушно-сухое сырьё.

Список литературы

1. Овчинникова С.Я., Орловская Т.В. Изучение спазмолитической активности экстракта корневищ и корней любистка лекарственного // Научные ведомости Белгородского гос. университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012 . № 4 (123). С. 275-277.
2. Овчинникова С.Я., Орловская Т.В. Морфолого-анатомическое изучение корневищ и корней любистка лекарственного // Фармация. 2013. № 2. С. 14-17.
3. Овчинникова С.Я., Орловская Т.В., Маликова М.Х. Изучение углеводов *Levisticum officinale* // Химия природных соединений. 2013. № 5. С. 788-789.
4. Овчинникова С.Я., Орловская Т.В., Оганова М.А. Изучение диуретической активности экстракта корневищ и корней любистка лекарственного // Научные ведомости Белгородского гос. университета. Серия: Медицина. Фармация. 2012. № 10 (129). С. 158-159.
5. Орловская Т.В., Овчинникова С.Я. Определение антибактериальной активности субстанций, полученных из корневищ с корнями любистка лекарственного // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. №10. 2013. С. 474-475.

Рецензенты:

Компанцев В.А., д.ф.н., профессор кафедры неорганической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г.Пятигорск.

Кодониди И.П., д.ф.н., доцент кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г.Пятигорск.