

УДК 582.998.1:547.913:543.544.943.3

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАПИЛЛИНА В ЭФИРНОМ МАСЛЕ ПОЛЫНИ МЕТЕЛЬЧАТОЙ

Э.Э. Айрапетян<sup>1</sup>, Т.Д. Мезенова<sup>1</sup>, О.М. Шевчук<sup>2</sup>, Л.А. Логвиненко<sup>2</sup>, Д.А. Коновалов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов;

<sup>2</sup>ФГБУН «Ордена трудового красного знамени Никитский ботанический сад – Национальный научный центр РАН», лаборатория ароматических и лекарственных растений

Разработана и валидирована методика идентификации и количественного определения содержания капиллина в эфирном масле из травы полыни метельчатой. Применен метод хроматографии в тонком слое сорбента с денситометрической регистрацией аналитического сигнала. Для эксперимента использовали эфирное масло полыни метельчатой, полученное методом гидродистилляции. Цифровой анализ хроматограмм проводили, используя программу «Видеоденситометр Sorbfil». Для хроматографирования использовали пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ, подвижная фаза – гексан-этилацетат (9 :1). При дневном освещении на хроматограмме появляются четыре пятна желтого цвета различной интенсивности. Идентифицированы: капиллол ( $R_f$  0,29), капиллин ( $R_f$  0,61), капиллен ( $R_f$  0,80). Их содержание в эфирном масле, определенное методом внутренней нормализации в условиях эксперимента, составляет: капиллол – 20,6 %, капиллин – 47,8 %, капиллен – 26,1 %. Проверку правильности методики проводили по ее *специфичности* ( $R_f$  капиллина соответствует  $R_f$  стандартного образца); *чувствительности* – предел обнаружения (ПО = 13,7 мкг), предел количественного определения (ПКО = 41,6 мкг); *линейности* (уравнение регрессии имеет вид:  $S = 1,1 \cdot 10^3$  м); *правильности* – методом «введено-найдено» ( $X_{cp} = 103,7$  %;  $X = 9,1$  %; RSD % = 9,9 %; E = 8,8 %); *прецизионности* на 6 образцах аналита ( $X_{cp} = 9,65$  %;  $X = 1,00$  %; RSD % = 9,9 %; E = 10,4 %). Методику планируется использовать для контроля качества лекарственного растения и для изучения изменчивости содержания капиллина в образцах эфирного масла из травы полыни метельчатой различного географического происхождения.

**Ключевые слова:** капиллин, эфирное масло, трава полыни метельчатой, тонкослойная хроматография, качественное, количественное определение, валидация.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-1(73)-173-176

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR DETERMINATION OF CAPILLIN IN ESSENTIAL OIL OF ARTEMISIA SCOPARIA

E.E. Airapetyan<sup>1</sup>, T.D. Mezenova<sup>1</sup>, O.M. Shevchuk<sup>2</sup>, L.A. Logvinenko<sup>2</sup>, D.A. Konovalov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – affiliate of the FSBEI HE «The Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation, Department of pharmacognosy, botany and technology phytopreparations;

<sup>2</sup>FSBIS «Order of the red banner of labor Nikitsky Botanical Garden – National scientific centre of RAS», Laboratory of aromatic and medicinal plants

The method of identification and quantitative determination of capillin content in essential oil from the herb of Artemisia scoparia has been developed and validated. The method of chromatography in a thin layer of a sorbent with densitometric registration of analytical signal is applied. For the experiment, the essential oil of Artemisia scoparia obtained by hydrodistillation was used. Digital analysis of chromatograms was performed using the program «Videodensitometr Sorbfil». For chromatography used plates of the brand «Sorbfil» PTSX-P-A-UV, mobile phase-hexane-ethyl acetate (9:1). In daylight, four different intensity yellow spots appear on the chromatogram. Identified: capillol ( $R_f$  0,29), capilline ( $R_f$  0,61), capillen ( $R_f$  0,80). Their content in the essential oil, as determined by the method of internal normalization in the experiment, is: capillol – 20,6 %, capilline – 47,8 %, capillen – 26,1 %. Validation of methodology was carried out according to its specificity ( $R_f$  capillina corresponds to  $R_f$  standard sample); sensitivity - limit of detection (PO = 13.7 mkg), the quantification limit (PKO = 41.6 mkg); linearity (the regression equation has the form:  $S = 1,1 \cdot 10^3$  m); the correctness of the method «introduced-found» ( $X_{cp} = 103,7$  %;  $X = 9,1$  %; RSD % = 9,9 %; E = 8,8 %); precisionist on 6 samples analyte ( $X_{cp} = 9,65$  %;  $X = 1,00$  %; RSD % = 9,9 %; E = 10,4 %). The method is planned to be used to control the quality of the medicinal plant and to study the variability of capillin content in the samples of essential oil from the herb of Artemisia scoparia of different geographical origin.

**Key words:** capillin, essential oil, herba of Artemisia scoparia, thin-layer chromatography, qualitative, quantitative determination, validation.

Полынь метельчатая *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., сем. *Asteraceae* – однолетнее, реже двулетнее, травянистое растение. В народной медицине полынь метельчатая используется при

заболеваниях дыхательных путей, нарушении менструального цикла, ревматизме, как мочегонное и противоглистное средство [9]. В настоящее время из этого вида полыни выделены химические

вещества, обладающие высокой биологической активностью [9, 2].

Главной группой действующих веществ надземной части этого растения являются полиацетиленовые соединения, проявляющие выраженные антибактериальные и противогрибковые свойства в отношении различных видов патогенной микрофлоры животных и человека. Наиболее сильным противогрибковым действием обладает капиллин [1, 5]. Широкий фармакологический скрининг ароматических полиацетиленов выявил возможность разработки на их основе препаратов с цитостатическим, противотуберкулезным и противовоспалительным действием [3, 6].

Объектом исследования явилась трава полыни метельчатой, собранная в фазу стеблевания на территории коллекционного питомника Никитского ботанического сада [7]. Предварительное изучение динамики накопления основной группы действующих веществ (полиацетиленов) надземной части полыни метельчатой показало, что максимальное содержание главного компонента из этой группы – капиллина – происходит в фазу стеблевания. Поэтому в настоящее время нами рассматривается вопрос о том, что заготовка надземной части этого растения может происходить именно в эту фазу.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка валидированной методики определения капиллина в эфирном масле из травы полыни метельчатой.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эфирное масло получали перегонкой из сухого сырья с водяным паром при использовании прибора Клевенджера в модификации Лошкарева [5]. Выход составляет  $(1,2 \pm 0,3) \%$  в пересчете на воздушно-сухое сырье.

Точную навеску сырья (около 400 г), измельченного до размера 7 мм, помещали в колбу вместимостью 4000 мл, приливали 3 л воды очищенной и доводили до кипения. Эфирное масло отгоняли при скорости стекания дистиллята 60–65 капель в минуту в течение 5 часов. Предварительное исследование динамики выхода эфирного масла из сырья полыни метельчатой показало, что его максимальное значение приходится на пятый час отгонки эфирного масла данным методом. Через 5 минут после окончания перегонки измеряли объем эфирного масла в приемнике. Выделенное эфирное масло пропускали через слой силикагеля (2–3 см) для удаления воды.

Идентификацию и количественное определение капиллина в полученном эфирном масле проводили методом планарной хроматографии. Условия хроматографирования: пластинки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ 10 × 15 см, система растворителей –

гексан-этилацетат (9:1). Точные объемы (1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 мкл) раствора СО капиллина с концентрацией 11,3 мг/мл точно наносили на линию старта хроматографической пластинки. Кроме того, на этой же пластинке обозначали две линии контрольных треков с нанесенными гексановыми растворами эфирного масла полыни метельчатой (1:2) объемом 1,0 мкл. Хроматографирование осуществляли в камере (объемом 2000 см<sup>3</sup>), предварительно насыщенной парами растворителей. После прохождения фронтом растворителя на хроматографической пластинке расстояния 8–9 см пластинку извлекали из камеры. В вытяжном шкафу пластинку высушивали до удаления паров растворителя при комнатной температуре. При дневном освещении на пластинке появляются пятна желтого цвета. Окраска усиливается в УФ-свете.

Сканирование пластинки с разрешением 100 dpi проводили на планшетном сканере «HPS canjet 3670». Цифровую обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар). По градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация) с использованием метода абсолютной калибровки (внешнего стандарта) определяли содержание капиллина в исследуемых образцах эфирного масла. При статистической обработке результатов определений руководствовались требованиями ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [9].

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На треках контрольного образца в условиях эксперимента обнаруживали четыре зоны сканирования желтого цвета, а на оцифрованной хроматограмме – четыре пика: с  $R_f$  0,6 (не идентифицирован);  $R_f$  0,29 (капиллол);  $R_f$  0,61 (капиллин);  $R_f$  0,8 (капиллен). Идентификацию проводили с помощью свидетелей (СО). Капиллину соответствует пик с  $R_f$  0,61 (рис. 1).

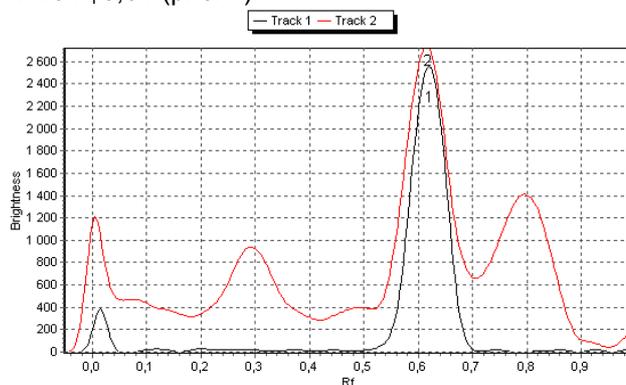


Рис. 1. Хроматограмма эфирного масла полыни метельчатой (2) и СО капиллина (1)

В соответствии с требованиями действующей Государственной фармакопеи и международных стандартов для любой разрабатываемой аналитической методики должна экспериментально подтверждаться ее пригодность к практическому использованию и получению достоверной информации об объекте анализа. В качестве основных характеристик, оценивающих валидность методики, определяли ее чувствительность, специфичность, линейность, предел количественного определения, правильность и прецизионность.

**Чувствительность**, то есть предел обнаружения (ПО), рассчитывали по формуле:

$$ПО = 3,3 \times S/b,$$

где: S – стандартное отклонение сигнала;  
b – угловой коэффициент градуировочного графика.

$$ПО = 13,7 \text{ мкг.}$$

**Специфичность** характеризовали значением  $R_f$  пятен зоны сканирования контрольного трека и его соответствием  $R_f$  зон сканирования стандартного образца ( $0,61 \pm 0,02$ ).

**Эффективность пластинки (N)** составила около 600 теоретических тарелок.

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывали по формуле:

$$ПКО = 10 \times S/b,$$

$$ПКО = 41,6 \text{ мкг.}$$

Измерение аналитических сигналов для 5 проб с разными концентрациями СО капиллина позволили установить *линейность* методики. Уравнение регрессии и коэффициент корреляции рассчитывали с использованием электронных таблиц Microsoft Excel. Значимость свободного члена линейной зависимости (*a*) и углового коэффициента (*b*) определяли методом наименьших квадратов. Зависимость площадей пиков от содержания капиллина в аналитической области методики (от 10 до 60 мкг в пробе) оказалась линейной.

Уравнение регрессии имеет вид:  $S = 1,21 \times 10^3 m$  (рис. 2). Свободный член «*a*» значимо не отличается от нуля. Коэффициент корреляции  $r = 0,993$ .

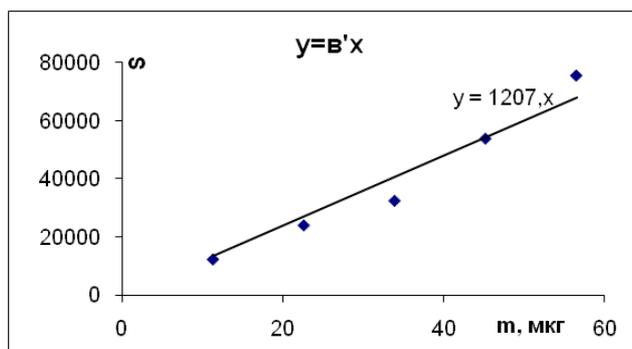


Рис. 2. Градуировочный график СО капиллина

Линейная зависимость также установлена между различными объемами эфирного масла (0,5–2,0 мкл), наносимого на пластинку (аналита), и величиной аналитического сигнала.

Уравнение регрессии имеет вид:  $S = 1,03 \times 10^4 V$ . Коэффициент корреляции  $r = 0,997$ .

**Правильность** методики определяли методом «введено-найдено». Содержание капиллина на 5 уровнях концентраций СО рассчитывали по уравнению градуировочного графика и определяли метрологические характеристики ( $X_{ср} = 103,7 \%$ ;  $\Delta X = 9,1 \%$ ;  $RSD \% = 9,9 \%$ ;  $E = 8,8 \%$ ).

С использованием данной методики определили количественное содержание капиллина в эфирном масле из травы полыни метельчатой. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты количественного определения капиллина в эфирном масле из травы полыни метельчатой

Содержание, г/100 г эфирного масла	Метрологические характеристики
9,5	$X_{ср} = 9,65$ $RSD \% = 9,93 \%$ $\Delta X = 1,00$ $E = 10,43 \%$
9,5	
9,3	
10,1	
8,3	
11,2	

**Определение содержания компонентов эфирного масла.** Методом внутренней нормализации определена массовая доля основных компонентов эфирного масла полыни метельчатой, выявленных в условиях эксперимента (см. рис. 1). Наибольшую долю составляет капиллин (табл. 2).

Таблица 2

Содержание компонентов эфирного масла полыни метельчатой

Пик	$R_f$	Вещество	S	% S
1	0,06	Не идентиф.	10637	5,5
2	0,29	капиллол	39424	20,6
3	0,61	капиллин	91644	47,8
4	0,80	капиллен	50058	26,1
Сумма	–	–	191763	–

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена эффективная, высокочувствительная методика идентификации и количественного определения полиацетиленового вещества капиллина в эфирном масле полыни метельчатой. Разработанная методика валидна по показателям линейность, правильность и сходимость.

Не требует использования сложного дорогостоящего оборудования.

Содержание капиллина в эфирном масле составляет  $(9,65 \pm 1,00) \%$ .

Определена массовая доля основных компонентов эфирного масла. На долю капиллина приходится 47,8 %.

Разработанную методику планируется использовать для изучения изменчивости содержания капиллина в образцах эфирного масла из травы полыни метельчатой различного географического происхождения и оценки качества этого сырья.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Коновалов Д.А. Природные полиацетиленовые соединения // Фармация и фармакология. – 2014. – № 4 (5). – С. 23–48.
2. Коновалов Д.А. Фитохимическое изучение полыни метельчатой и тысячелистника обыкновенного и использование их при создании противогрибкового препарата: Автореф. дис. ... канд. фарм. наук. – Пятигорск, 1991. – 19 с.
3. Коновалов Д.А. Цитотоксические свойства полиацетиленовых соединений растений // Растительные ресурсы. – 2014. – Т. 50, № 2. – С. 279–296.
4. Коновалов Д.А., Коновалова О.А., Челомбитко В.А. Спектрофотометрический метод количественного определения капиллина в эфирном масле *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. // Химико-фармацевтический журнал. – 1992. – Т. 26, № 3. – С. 73–75.
5. Коновалов Д.А., Челомбитко В.А. Состав эфирного масла *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. в процессе вегетации // Растительные ресурсы. – 1991. – Т. 27, № 1. – С. 135–139.
6. Насухова А.М., Коновалов Д.А. Природные полиацетиленовые соединения. Обзор начального этапа исследований // Фармация и фармакология. – 2014. – № 1 (2). – С. 12–17.
7. Руководство ICN «Валидация аналитических методик». Содержание и методология // Фармация. – 2008. – № 4. – С. 3–10.
8. Хлыпенко Л.А., Работягов В.Д., Логвиненко Л.А., Шевчук О.М. Сорты эфиромасличных и лекарственных растений, перспективные для возделывания на юге России // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 55. – С. 272–277.
9. Singh, D., Rawat, M., Garg, G., Saraf, S., Saraf, S. *Artemisia scoparia*: A review // Pharmacognosy Magazine. – 2006. – Vol. 2, № 5. – P. 27.

## REFERENCES

1. Konovalov D.A. Prirodnye poliacetilenovye soedinenija [Natural polyacetylene compounds]. *Farmacija i farmakologija* [Pharmacy and Pharmacology], 2014, no. 4 (5), pp. 23–48. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Konovalov D.A. Fitohimicheskoe izuchenie polyni metel'chatoj i tjasjachelistnika obyknovennogo i ispol'zovanie ih pri sozdanii protivogribkovogo preparata. Avtoref. dis. kand. farm. nauk [Phytochemical study of paniculata and yarrow ordinary and their use in the creation of an antifungal drug. Ph. D. (Pharmacy) Thesis]. Pjatigorsk, 1991. 19 p.
3. Konovalov D.A. Citotoksicheskie svojstva poliacetilenovyh soedinenij rastenij [Cytotoxic properties of plant polyacetylene compounds]. *Rastitel'nye resursy* [Plant Resources], 2014, Vol. 50, no. 2, pp. 279–296. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Konovalov D.A., Konovalova O.A., Chelombit'ko V.A. Spektrofotometricheskij metod kolichestvennogo opredelenija kapillina v jefirnom masle *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. [Spectrophotometric method for the quantitative determination of capillin in essential oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit.]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* [Chemical and pharmaceutical journal], 1992, Vol. 26, no. 3, pp. 73–75. (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Konovalov D.A., Chelombit'ko V.A. Sostav jefirnogo masla *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. v processe vegetacii [Composition of essential oil of *Artemisia scoparia* Waldst. et Kit. during the growing season]. *Rastitel'nye resursy* [Plant Resources], 1991, Vol. 27, no. 1, pp. 135–139. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Nasuhova A.M., Konovalov D.A. Prirodnye poliacetilenovye soedinenija. Obzor nachal'nogo jetapa issledovanij [Natural polyacetylene compounds. Overview of the initial stage of research]. *Farmacija i farmakologija* [Pharmacy and Pharmacology], 2014, no. 1 (2), pp. 12–17. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. Rukovodstvo ICN «Validacija analiticheskikh metodik». Soderzhanie i metodologija [ICN Guidelines «Validation of Analytical Techniques». Content and methodology]. *Farmacija* [Pharmacy], 2008, no. 4, pp. 3–10. (In Russ.; abstr. in Engl.).
8. Hlypenko L.A., Rabotjagov V.D., Logvinenko L.A., Shevchuk O.M. Sorta jefiromaslichnyh i lekarstvennyh rastenij, perspektivnye dlja vzdelyvanija na juge Rossii [Varieties of essential oil and medicinal plants, promising for cultivation in the south of Russia]. *Trudy Kubanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Proceedings of the Kuban State Agrarian University], 2015, no. 55, pp. 272–277. (In Russ.; abstr. in Engl.).
9. Singh, D., Rawat, M., Garg, G., Saraf, S., Saraf, S. *Artemisia scoparia*: A review. *Pharmacognosy Magazine*, 2006, Vol. 2, no. 5, p. 27.

## Контактная информация

**Коновалов Дмитрий Алексеевич** – д. фарм. н., профессор кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, e-mail: konovalov\_da@pochta.ru