

И. П. Каминский¹, Е. А. Краснов¹, Т. В. Кадырова¹, С. А. Ивасенко²,
Б. Б. Рахимова², С. М. Адекенов²

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЦИНАРОПИКРИНА В СУХОМ ЭКСТРАКТЕ ВАСИЛЬКА ШЕРОХОВАТОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ

¹ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

² АО "Международный научно-производственный холдинг "Фитохимия", Караганда, Казахстан

Разработана методика количественного определения содержания цинаропикрина в сухом экстракте василька шероховатого на 40 % этаноле и проведена оценка ее валидности. Методика является специфичной для анализа, обладает корректной точностью и воспроизводимостью результатов, а также линейной зависимостью в аналитической области $\pm 30\%$, и может использоваться для достоверной оценки качества сухого экстракта василька шероховатого.

Ключевые слова: василек шероховатый, цинаропикрин, ВЭЖХ, валидация.

Василек шероховатый (*Centaurea scabiosa* L.) сем. Asteraceae является широко распространенным представителем флоры Сибири. Его химический состав представлен разнообразными группами биологически активных веществ, в число которых входят сесквитерпеновые лактоны (СЛ) — цинаропикрин, гроссгемин, репин [1]. Из указанных лактонов основным является цинаропикрин.

В настоящее время для количественного определения СЛ находят применение химические (алкалометрия [2]) и физико-химические методы (УФ-спектрофотометрия [3], хроматография в тонком слое сорбента [4], хроматомасс-спектрометрия, ВЭЖХ и ГЖХ [5]). Наиболее универсальными являются хроматографические методы, отличающиеся высокой чувствительностью, достаточной точностью, воспроизводимостью и достоверностью.

Целью настоящей работы явилась разработка методики количественного определения цинаропикрина в сухом экстракте василька шероховатого (ВШ) методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Экспериментальная часть

Материалом для исследования служила надземная часть ВШ, собранная в конце июня — начале июля 2008 г. в окрестностях Томска, которую высушивали до воздушно-сухого состояния и измельчали до размера частиц 2–4 мм. Сухой экстракт получали методом бисмацерации обработкой измельченной надземной части ВШ 40 % этанолом при температуре 80 °С в течение 3 ч и соотношении сырье-экстрагент 1:30. Полученное извлечение концентрировали при 40–45 °С в ротационном испарителе при пониженном давлении, а гущенный остаток досушивали до сыпучего состояния методом конвективной сушки.

Выделение цинаропикрина из надземной части ВШ проводили по следующей схеме. Измельченное сырье трижды по 1 ч экстрагировали смесью хлороформа с этанолом, 4:1, при температуре 60 °С и соотношениях сырье — экстрагент 1:8, 1:7, 1:7. Хлороформно-этанольные извлечения объединяли и концентрировали

досушка. Сухой остаток растворяли в горячем этаноле в соотношении 1:2, после чего к полученному раствору прибавляли горячую воду в соотношении 1:1 и оставляли в темном месте на сутки. Образовавшийся осадок отфильтровывали и дважды обрабатывали этанолом и водой в указанных условиях. Для отделения парафиновой части объединенные фильтраты трижды экстрагировали в делительной воронке петролейным эфиром (фракция с т. кип. 40–70 °С) при соотношении 1:1, а затем аналогичным образом хлороформом для извлечения суммы сесквитерпеновых лактонов [6].

Цинаропикрин изолировали из суммы СЛ методом колоночной хроматографии на силикагеле. В качестве элюента использовали смесь петролейного эфира (фракция с т. кип. 40–70 °С) и этилацетата с постепенным увеличением градиента последнего. При промывании колонки смесью петролейного эфира и этилацетата в соотношении 80:20 получены фракции, содержащие, по данным ТСХ (рис. 1), сесквитерпеновый лактон гваянового типа цинаропикрин (рис. 2). Его УФ-спектр имеет один максимум поглощения при 204 нм. Чистоту выделенного соединения устанавливали методом ВЭЖХ. Условия проведения анализа представлены ниже. Содержание цинаропикрина, определенное методом сравнения с внешним стандартом, составило 93,4 %. Это позволило использовать его в качестве рабочего стандартного образца (РСО).

Идентификацию цинаропикрина в сухом экстракте ВШ проводили по совпадению времени удерживания анализируемого компонента и РСО цинаропикрина.

Внешним стандартом был выбран образец цинаропикрина, полученный в АО МНПХ "Фитохимия" (г. Караганда, Казахстан) и охарактеризованный данными ИК-, масс-, ¹H и ¹³C-ЯМР спектроскопии.

Приготовление образцов. Раствор № 1. Около 0,05 г (точная навеска) РСО цинаропикрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл подвижной фазы (метанол — вода 1:1), нагревают на водяной бане до полного растворения и охлажда-

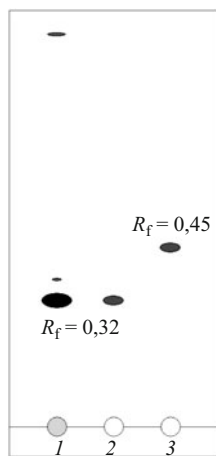


Рис. 1. Хроматограмма в тонком слое объединенной цинаропикринсодержащей фракции (1) василька шероховатого (Sorbfil ПТСХ-П-А-УФ (Россия), гексан — ацетон — уксусная кислота (20:10:0,1)); 2 — стандартный образец цинаропикрина; 3 — стандартный образец грассегмина.

дают. Объем раствора доводят до метки тем же растворителем и перемешивают.

Растворы № 2 – 8. Около 0,350; 0,400; 0,450; 0,500; 0,550; 0,600; 0,650 г (точная навеска) сухого экстракта ВШ помещают в круглодонные колбы с нормальным шлифом вместимостью 50 мл, заливают смесью хлороформ — этанол (4:1) в соотношении экстракт — растворитель 1:20, присоединяют к обратному холодильнику и экстрагируют на водяной бане при температуре 50 °С. Экстракцию проводят трижды в аналогичных условиях. Полученные извлечения объединяют, фильтруют и концентрируют досуха на ротационном испарителе. Сухой остаток растворяют при нагревании в 10 мл подвижной фазы, раствор охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. В хроматограф вводят по 0,02 мл полученных растворов.

Анализ осуществляли в изократическом режиме элюирования на жидкостном хроматографе Agilent 1100 Series (HEWLETT PACKARD, США) с УФ-детектором; аналитическая длина волны — 204 нм; использовали колонку Zorbax SB-C₁₈, 5 мкм; 150 × 4,6 мм. Подвижная фаза: смесь метанол — вода (1:1 об./об.). Скорость потока подвижной фазы — 0,5 мл/мин, температура колонки — комнатная, продолжительность анализа — 40 мин.

Содержание цинаропикрина в расчете на массу сухого экстракта в процентах (X) рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{S \cdot 25 \cdot m_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot 25 \cdot m \cdot 100},$$

где S_0 — площадь пика на хроматограмме раствора рабочего стандартного образца цинаропикрина; S — площадь пика цинаропикрина на хроматограмме испытуемого раствора; m_0 — навеска рабочего стандартного образца цинаропикрина, г; m — навеска сухого

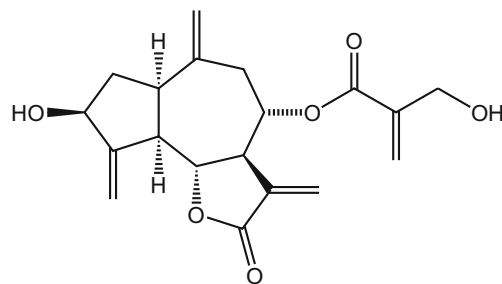


Рис. 2. Структурная формула цинаропикрина.

экстракта ВШ, г; P — процентное содержание цинаропикрина в рабочем стандартном образце цинаропикрина.

Метрологические характеристики методики количественного определения рассчитывали по данным, полученным при анализе 9 образцов сухого экстракта ВШ для уровня вероятности $P = 0,95$ [7].

Результаты и их обсуждение

Оптимальные условия анализа сухого экстракта ВШ были достигнуты при использовании обращено-фазового варианта ВЭЖХ.

Пригодность хроматографической системы оценивали по параметрам эффективности хроматографической колонки, степени разделения пиков, величины относительного стандартного отклонения площади пика, а также коэффициента асимметрии пика. Для проверки пригодности хроматографической системы использовали раствор № 1. Расчет параметров проводили для пика цинаропикрина на 5 хроматограммах, полученных в условиях анализа сухого экстракта ВШ.

Установлено, что хроматографическая система характеризуется высокой эффективностью (табл. 1). Эффективность хроматографической колонки составляет по пику цинаропикрина не менее 3800 теоретических тарелок. Методика характеризуется хорошей разрешающей способностью (степень разделения пика цинаропикрина и соседнего пика не ниже 1,4; коэффициент асимметрии пика близок к 1) и воспроизводимостью (относительное стандартное отклонение площади пика цинаропикрина менее 1,0 %).

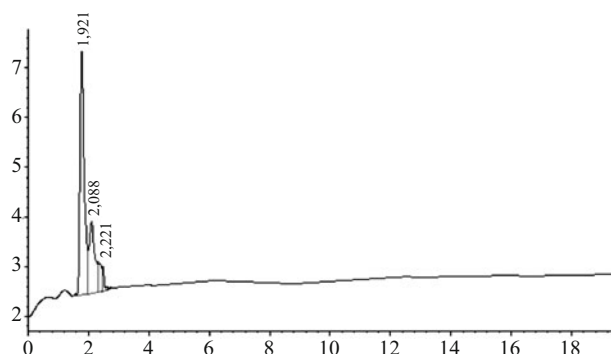


Рис. 3. ВЭЖ-хроматограмма растворителя сухого экстракта василька шероховатого. Здесь и на рис. 4 по оси абсцисс — время удерживания, мин; по оси ординат — высота пика, mAU.

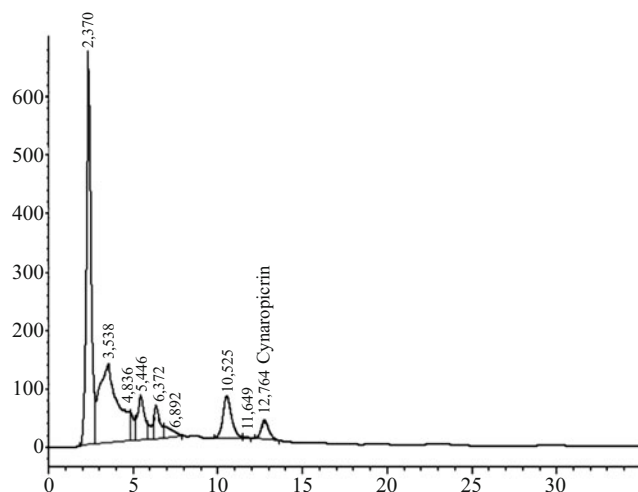


Рис. 4. ВЭЖ-хроматограмма сухого экстракта василька шероховатого.

За основу валидации методики взяты представленные в литературе рекомендации [8 – 11].

Специфичность (селективность) методики показывает возможность достоверно определять количественное содержание цинаропикрина сухого экстракта ВШ в присутствии сопутствующих и родственных соединений и достигается путем использования внешних стандартов. Процесс пробоподготовки и разделения оптимизирован таким образом, чтобы пики растворителя пробы сопутствующих и родственных соединений не мешали определению действующего вещества.

Идентификация цинаропикрина подтверждалась совпадением времени удерживания анализируемого компонента и цинаропикрина. На хроматограмме растворителя сухого экстракта ВШ (рис. 3) отсутствуют пики, мешающие определению цинаропикрина. Пики сопутствующих и родственных соединений, входящих в состав сухого экстракта ВШ, хорошо разделяются с пиком цинаропикрина, время удерживания которого 12,76 мин (рис. 4), и не влияют на аналитическое определение.

Линейность методики исследовалась на 7 модельных пробах (растворы № 2 – 8) в интервале 70 – 130 % от содержания цинаропикрина в сухом экстракте ВШ, принятого за 100 %, и представлена графически (рис. 5) в виде зависимости площади пика цинаропик-

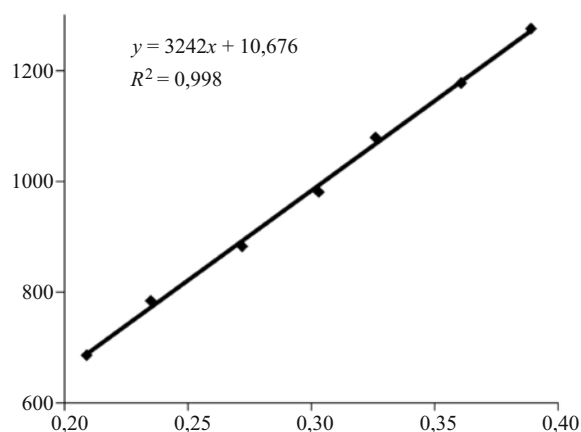


Рис. 5. Зависимость площади пика от содержания цинаропикрина. По оси абсцисс — содержание цинаропикрина в сухом экстракте ВШ, мг; по оси ординат — площадь пика, mAU; R^2 — коэффициент корреляции.

рина на хроматограмме испытуемого образца сухого экстракта ВШ от содержания цинаропикрина в модельных пробах.

Линейная зависимость для цинаропикрина характеризуется уравнением: $y = 3242x + 10,676$ и коэффициентом корреляции 0,998. Согласно полученным результатам соблюдается линейная зависимость между величинами площадей хроматографических пиков и содержанием цинаропикрина в испытуемых растворах в интервале 70 – 130 % от принятой за 100 % величины. Этот интервал можно определить как аналитическую область методики.

Правильность методики установлена по результатам анализа 3 повторных определений на 7 модельных пробах (растворы № 2 – 8). Согласно полученным данным средний процент регенерации составляет для цинаропикрина 99,8 %. Все полученные данные находятся в интервале 98 – 101 % (табл. 2).

Воспроизводимость аналитической методики подтверждена на основании полученных данных, представленных в табл. 3. Относительная ошибка среднего результата определения цинаропикрина составляет 0,52 %.

Таблица 1
Оценка пригодности хроматографической системы

№ опыта	Эффективность хроматографической колонки, т.т.	Относительное стандартное отклонение площади пика цинаропикрина, %	Коэффициент асимметрии пика цинаропикрина	Степень разделения пиков
1	3830	0,15	1,27	1,45
2	3844		1,20	1,48
3	3838		1,24	1,42
4	3841		1,18	1,46
5	3834		1,25	1,44

Таблица 2

Оценка правильности методики

Количество действующего вещества от заявленного в экстракте, %	Количество действующего вещества, мг	Найдено*, мг	Регенерация*, %
70	0,210	0,209	99,3
80	0,240	0,235	98,2
90	0,270	0,272	100,9
100	0,300	0,303	101,0
110	0,330	0,326	98,9
120	0,360	0,3607	100,2
130	0,390	0,389	99,8

* Среднее из 3 определений.

Оценка воспроизводимости методики

x_i , мг	n	f	S	$x_{cp} \pm \Delta x_{cp}$	$t(P, f)$	ε_{cp} , %
0,300, 0,298, 0,303, 0,299, 0,302, 0,297, 0,301, 0,299, 0,300	9	8	0,002	$0,2999 \pm 0,00157$	2,36	0,52

Таким образом, разработана методика количественного определения, которая по валидационным характеристикам является специфичной для анализа содержания цинаропикрина в сухом экстракте ВШ. Характеризуется корректной точностью и воспроизводимостью результатов, линейной зависимостью в аналитической области $\pm 30\%$ от содержания цинаропикрина в сухом экстракте ВШ, принятого за 100%. Это позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сухого экстракта ВШ.

QUANTITATIVE HPLC DETERMINATION OF CYNAROPICRIN IN *CENTAUREA SCABIOSA* DRY EXTRACT

I. P. Kaminskii¹, E. A. Krasnov¹, T. V. Kadyrova¹, S. A. Ivasenko²,
B. B. Rakhimova², and S. M. Adekenov²

¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia

² Phytochemistry Joint-Stock Company, Karaganda, Republic of Kazakhstan

An HPLC method for the quantitative determination of cynaropicrin in *Centaurea scabiosa* L. dry extract obtained using 40% aqueous ethanol has been developed and its performance has been validated. The proposed Method is specific, ensures high accuracy and reproducibility, and linearity in an analytical range of $\pm 30\%$, and can be used for reliable quality control of *Centaurea scabiosa* L. dry extract and related preparations.

Key words: *Centaurea scabiosa*, cynaropicrin, quantitative determination, HPLC, validation

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Каминский, Т. В. Кадырова, Е. А. Краснов и др., *Тез. докл. II междунар. науч. конф. "Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений"*, Алма-Ата, Казахстан (2007), с. 194.
2. К. А. Нурмухаметова, Е. А. Краснов, В. В. Дудко и др., *Омский науч. вестн.*, № 3, 150 – 153 (2006).
3. К. В. Беляков, *Фармация*, № 3, 10 – 12 (2003).
4. Л. А. Водорезова, Т. Д. Мезенова, Д. А. Коновалов, *Растит. рес.*, **43**(2), 106 – 110 (2007).
5. С. А. Ивасенко, Б. М. Танагузова, С. М. Адекенов, *Хим. ж. Казахстана*, **3**(8), 79 – 96 (2005).
6. А. И. Драб, К. А. Нурмухаметова, Р. Н. Пак и др., *Хим.-фарм. журн.*, **39**(8), 30 – 32 (2005).
7. *Государственная фармакопея СССР*, XI изд., Вып. 1., Медицина, Москва (1987), сс. 199 – 221.
8. *The United States Pharmacopeia* (US P27-NF 22), Validation of compendial methods (2004).
9. *British Pharmacopoeia*, Appendix III D, Liquid chromatography (2005).
10. А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов, *Вед. науч. центра эксперт. и гос. контроля лек. средств*, № 1, 28 – 29 (2001).
11. Руководство ICH "Валидация аналитических методик. Содержание и методология" Q2(R1), *Фармация*, № 4, 3 – 10 (2008).

Поступила 29.10.09