

С. П. Сенченко, Н. М. Насухова, Л. А. Азова, Д. А. Коновалов

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИЦЕЛЛЯРНОЙ ЭЛЕКТРОКИНЕТИЧЕСКОЙ ХРОМАТОГРАФИИ В АНАЛИЗЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ ЛАВРА БЛАГОРОДНОГО (*LAURUS NOBILIS* L.)

Пятигорский медико-фармацевтический институт — филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Россия, Пятигорск

Разработана методика количественного определения сесквитерпеновых лактонов (костунолида и дегидрокостуслактона) в листьях лавра благородного с использованием метода мицеллярной электрокинетической хроматографии. Показана необходимость добавления мочевины в ведущий электролит для повышения селективности анализа. С использованием разработанной методики установлено, что в различных образцах лавра содержание костунолида и дегидрокостуслактона достигает 0,5757 и 0,0399 % соответственно в пересчете на абсолютно сухое сырье. Также определены значения основных валидационных характеристик разработанной методики.

Ключевые слова: мицеллярная электрокинетическая хроматография; сесквитерпеновые лактоны; костунолид; дегидрокостуслактон; лавр благородный.

Laurus nobilis L. (лавр благородный, сем. *Lauraceae*) — вечнозеленый кустарник или дерево высотой 15–20 м, широко распространен в Средиземноморском регионе и Европе [1]. В качестве основных действующих веществ в растении описаны компоненты эфирного масла, сесквитерпеновые лактоны, алкалоиды и фенольные соединения (флавоноиды, фенольные кислоты и лигнаны) [2].

В растении обнаружено более 30 сесквитерпеновых лактонов, которые обладают разнообразными видами фармакологической активности: антибактериальной, противогрибковой [3], антидиабетической, противовоспалительной, гепатозащитной [4], нейрозащитной [5], ингибируют поглощение спирта, повышают активность печеночной глутатион-S-трансферазы, цитотоксичны и индуцируют апоптоз [6].

Важнейшими лактонами лавра благородного являются костунолид (I) и дегидрокостуслактон (II), обладающие биологической активностью и имеющие важное медицинское значение. Они проявили высокую активность при лечении рака, вирусных и микробных инфекций, язв и обладают антисептическими, противовоспалительными, ранозаживляющими, глистогонными свойствами [3, 7, 8, 9].

Проявление столь ценных фармакологических свойств, а также потребность в разработке нормативной документации на сырье лавра (проект ФС “Лавра

благородного листья”) обуславливают необходимость выявления и совершенствования различных методик анализа лактонов I и II.

Экспериментальная часть

В работе использовали высушенные листья лавра благородного различных производителей (табл. 1). В качестве стандартных образцов (СО) использовали лактон I и лактон II (рис. 1) производства компании Sigma с содержанием действующих веществ не менее 97 и 98 % соответственно.

Приготовление растворов СО. Для приготовления растворов СО около 5 мг (точная навеска) каждого из веществ помещали в мерные колбы вместимостью 10 мл, растворяли в 5 мл 20 % метанола и доводили до метки тем же растворителем. Из полученных растворов готовили градуировочные в диапазоне концентраций для I — от 12,5 до 150 мкг/мл, для II — от 1,5 до 25 мкг/мл.

По данным литературы для I и II растворителем, обеспечивающим наилучшую экстрактивность, является метанол. Это было показано при исследовании

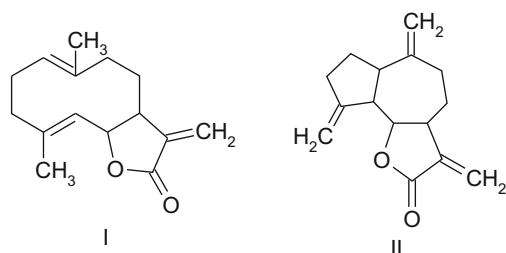


Рис. 1. Химическая структура костунолида (I) и дегидрокостуслактона (II).

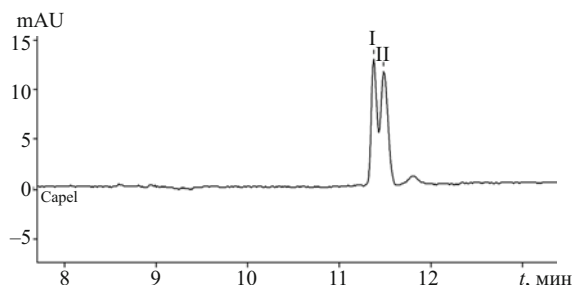


Рис. 2. Электрофореграмма раствора смеси СО I и II (содержание в растворе вещества I — 0,006 г/100 мл; II — 0,002 г/100 мл); состав электролита: декагидрат тетрабората натрия (концентрация 2 мг/мл) и додецилсульфат натрия (концентрация 10 мг/мл).

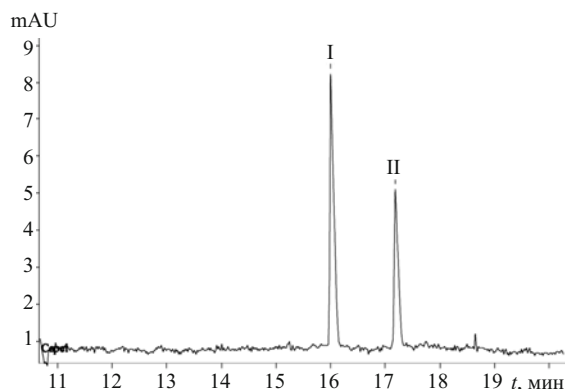


Рис. 3. Электрофореграмма раствора смеси СО I и II (содержание в растворе вещества I — 0,006 г/100 мл; II — 0,002 г/100 мл); состав электролита: декагидрат тетрабората натрия (концентрация 2 мг/мл), додецилсульфат натрия (концентрация 10 мг/мл) и мочевины (концентрация 400 мг/мл).

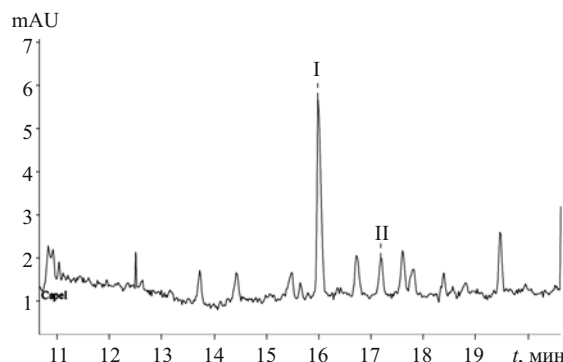


Рис. 4. Электрофореграмма извлечения из листьев лавра благородного, состав электролита: декагидрат тетрабората натрия (концентрация 2 мг/мл), додецилсульфат натрия (концентрация 10 мг/мл) и мочевины (концентрация 400 мг/мл).

корней *Saussurea lappa* C. V. Clarke, в которых также содержатся указанные компоненты [11, 12].

Для определения лактонов в сырье точную навеску (около 1 г) высушенных и измельченных до частиц размером не более 3 мм листьев лавра благородного (*Laurus nobilis* L.) помещали в коническую колбу вместимостью 50 мл, прибавляли 10 мл метанола и кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл. Сырье промывали дистиллированной водой, объединяя извлечения, и доводили также водой до метки. Далее 1 мл извлечения центрифугировали в пробирках типа Эппендорф при 8000 мин^{-1} в течение 10 мин, надосадочный раствор декантировали и подвергали анализу в описанных ниже условиях.

Для количественного определения I и II использовали метод капиллярного электрофореза. Работу проводили на системе капиллярного электрофореза Капель 105 (группа компаний “Льюмэкс”, Россия). В работе применяли термостатируемый кварцевый капилляр с рабочей длиной 65 см и диаметром 75 мкм. Ввод пробы осуществляли гидродинамически при $150 \text{ МБар} \cdot \text{с}$. Температура опыта составила $20 \text{ }^\circ\text{C}$ и напряжение $+20 \text{ кВ}$. Детектирование проводили спектрофотометрически при 210 нм. Для обработки элект-

трофореграмм использовали программу “Мультихром” (версия 1.52v).

Эксперимент проводили в условиях мицеллярной электрокинетической хроматографии (МЭКХ). Ведущий электролит содержал декагидрат тетрабората натрия (концентрация 2 мг/мл), додецилсульфат натрия (концентрация 10 мг/мл). Также к электролиту добавляли мочевины в диапазоне от 0 до 400 мг/мл с шагом 100 мг/мл.

Результаты и их обсуждение

При анализе растворов СО в электролите, не содержащем мочевины, было установлено, что анализируе-

Таблица 1
Результаты валидационной оценки методики

Показатель	Значения для лактонов	
	I	II
Линейность	$y = 7014x - 0,7753$ $r = 0,997$	$y = 6228x + 0,1790$ $r = 0,999$
Прецизионность RSD, %	6,30	6,14
Правильность R, %	98,14	97,35
Предел обнаружения DL, мкг/мл	0,20	0,21
Предел количественного определения QL, мкг/мл	0,57	0,64

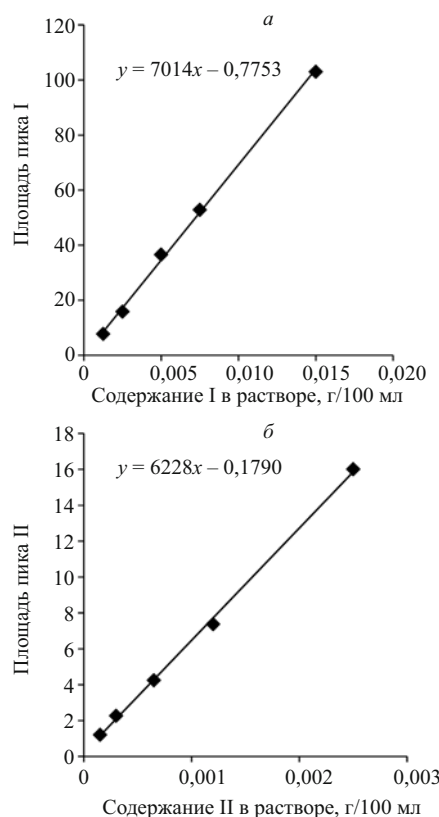


Рис. 5. Градуировочные графики зависимости площади пика от концентрации веществ в растворах: а) для вещества I; в) для вещества II.

Результаты количественного определения I и II в листьях лавра благородного различных производителей

Образец	Производитель	Содержание лактонов, %, \pm SD	
		I	II
1	ЗАО “Агроимпорт”, Москва	0,5757 \pm 0,0363	следы
2	ООО “Аллегро-Специи”, Саратов	0,2588 \pm 0,0163	0,0399 \pm 0,0025
3	ООО “Проммикс”, Москва	0,3395 \pm 0,0214	0,0187 \pm 0,0012
4	ООО “Волгоградская Бакалейная компания”, Волгоград	0,4499 \pm 0,0283	0,0083 \pm 0,0005
5	ИП Бондаренко Д. Н., Пятигорск	0,2312 \pm 0,0146	0,0380 \pm 0,0023

мые соединения в указанных условиях не способны разделяться с разрешением, необходимым для их количественного определения (рис. 2), что, возможно, связано с близкими параметрами их гидрофобности.

По данным [10], модификатором, способным улучшить степень разделения в МЭКХ, является мочевины. Использование добавки мочевины значительно улучшало разделение изучаемых веществ (рис. 3, 4). Связано это с тем, что за счет образования клатратов (соединений включения) удается повлиять на коэффициент распределения веществ между мицеллярной фазой и фазой раствора, что, в свою очередь, приводит к улучшению селективности анализа. При этом оптимальным для анализа сырья было содержание мочевины в буфере 400 мг/мл.

Результаты анализа растительного сырья свидетельствуют о том, что вещества I и II разделены со всеми сопутствующими компонентами сырья, что позволяет проводить их определение.

Разработанная методика количественного определения лактонов в листьях лавра благородного была валидирована по показателям линейность, прецизионность и правильность (табл. 1). Параметры линейности представлены на рис. 5 и в табл. 1.

Полученные значения валидационных параметров свидетельствуют о применимости разработанной методики для количественного определения I и II в листьях лавра благородного. Далее по уравнениям градуировочных графиков рассчитывали количественное содержание лактонов в образцах лавра в пересчете на абсолютно сухое сырье (табл. 2).

Таким образом, разработана методика количественного определения лактонов I и II в листьях лавра благородного с использованием мицеллярной электроки-

нетической хроматографии. Разработанная методика была валидирована по основным показателям, что подтверждает возможность ее использования для качественного и количественного определения этих лактонов в листьях лавра благородного. Показано, что в сырье различных производителей содержание указанных компонентов достаточно вариабельно, что свидетельствует о необходимости нормирования их содержания в случае дальнейшего внедрения указанного сырья в медицинскую и фармацевтическую практику.

ЛИТЕРАТУРА

1. E. Julianti, K. H. Jang, S. Lee, et al., *Phytochemistry*, **80**, 70 – 76 (2012).
2. Д. А. Коновалов, Н. М. Насухова, *Фармация и фармакол.*, № 2, 23 – 33 (2014).
3. N. Fukuyama, Ch. Ino, Y. Suzuki, et al., *Nat. Prod. Res.*, **25**(14), 1295 – 1303 (2011).
4. S. Lim, S.-J. Lee, K.-W. Nam, et al., *Arch. Pharm. Res.*, **36**(4), 485 – 494 (2013).
5. R. Patrakar, M. Mansuriya, and P. Patil, *Int. J. Pharm. Chem. Sci.*, **1**(2), 595 – 602 (2012).
6. F. Fang, Sh. Sang, K. Y. Chen, et al., *Food Chem.*, **93**, 497 – 501 (2005).
7. H. Hibasami, Y. Yamada, H. Moteki, et al., *In. J. Mol. Med.*, **12**, 147 – 151 (2003).
8. J. Luna-Herrera, M. C. Costa, H. G. Gonzalez, et al., *J. Antimicrob. Chemoth.*, **59**(3), 548 – 552 (2007).
9. B. Lohberger, B. Rinner, N. Stuedl, et al., *PLoS ONE*, **8**(6), 1 – 9 (2013).
10. L. Geiser, S. Cherkaoui, and J. Veuthey, *J. Chromat.*, **895**, 111 – 121 (2000).
11. Q. Zhanga, C. Defu, and L. Jianhua, *J. Chromat. B*, **879**(26), 2809 – 2814 (2011).
12. R. Nageswara, S. Satyanarayana, K. Suresh, et al., *IJRPC*, **3**(1), 99 – 107 (2013).

Поступила 01.09.14

USING MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY FOR THE ANALYSIS OF SESQUITERPENE LACTONES OF *LAURUS NOBILIS* L.

S. P. Senchenko, N. M. Nasukhova, L. A. Agova, and D. A. Konovalov

Pyatigorsk Medical Pharmaceutical Institute, Branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Stavropol Krai, 357532 Russia

A method for the quantitative determination of sesquiterpene lactones (costunolide and dehydrocostuslactone) in the leaves of noble laurel is developed based on micellar electrokinetic chromatography. Necessity of adding urea to the leading electrolyte in order to improve selectivity of the analysis is shown. Using the proposed method, it has been established that the content of costunolide and dehydrocostuslactone in various samples of laurel reaches 0.5757 and 0.0399%, respectively, in terms of dry initial material. Main validation characteristics of the proposed method are presented.

Keywords: micellar electrokinetic chromatography; sesquiterpene lactones; costunolide; dehydrocostuslactone; *Laurus nobilis* L.