Сведения об авторах:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии; тел.: (8652)352475, 89188664027; e-mail: bazikov@list.ru

Бейер Эдуард Владимирович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии; тел.: (8652)353429

Мальцев Александр Николаевич, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией биологически активных веществ; тел.: (8652)352475, 89054172205; e-mail: Maltsev7@rambler.ru

Малинина Наталья Ивановна, врач-офтальмолог; тел.: (8652)352475

Гоптарева Екатерина Алексеевна, аспирант; тел.: 89624444799

Боташева Валентина Салиховна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией патоморфологии центра персонализированной медицины; тел.: (8652)713467; e-mail: patanatomy@stgma.ru

© Коллектив авторов, 2016

УДК 581.192:582.677.2:543.544.5.068.7

DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11125>

ISSN 2073-8137

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ В ЛИСТЬЯХ *LAURUS NOBILIS* L. С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

С. П. Сенченко, Л. А. Агова, И. Н. Бобровский, Н. М. Насухова, Д. А. Коновалов

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Россия

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF SESQUITERPENE LACTONES IN THE LEAVES OF *LAURUS NOBILIS* L. USING HPLC

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

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute,
a Branch of Volgograd State Medical University, Russia

Разработана методика количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в листьях лавра благородного с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методика была валидирована по основным показателям, что подтверждает возможность ее использования для количественного определения сесквитерпеновых лактонов в этом сырье.

Ключевые слова: лавр благородный, *Laurus nobilis* L., сесквитерпеновые лактоны, костунолид, дегидрокостуслактон

Authors of the article developed a technique of quantitative determination of costunolid and dehydrocostuslactone in leaves of bay laurel with use of high performance liquid chromatography. The developed technique was validated on the basic indicators that confirms the possibility of its use for quantitative determination of sesquiterpene lactones in these raw materials.

Keywords: bay laurel, *Laurus nobilis* L., sesquiterpene lactones, costunolide, dehydrocostuslactone

Лавр благородный (*Laurus nobilis* L., сем. *Lauraceae*) – вечнозеленый кустарник или дерево высотой 15–20 м, произрастающий в Средиземноморском регионе и Европе [6]. Извлечения из листьев используются в народной медицине при болезнях сердца, астме, растяжении связок, нарушении пищеварения, диарее, мигрени, ревматических болях. Химический состав растения представлен компонентами эфирного

масла, алкалоидами, фенольными соединениями. Но в качестве основных действующих веществ в нем описаны сесквитерпеновые лактоны [2], важнейшими из которых являются костунолид и дегидрокостуслактон. Особый интерес к этим соединениям связан с их выраженным иммуномодулирующим и мощным цитотоксическим действием в отношении некоторых линий опухолевых клеток [6]. Кроме того, данные соединения пока-

зали высокую активность при лечении вирусных и микробных инфекций, вызванных как грамположительными, так и грамотрицательными микроорганизмами, и обладают антисептическими, противовоспалительными, ранозаживляющими, глистогонными свойствами [1, 3, 5, 7, 8, 9].

Наличие столь ценных фармакологических соединений в листьях лавра благородного предполагает рассматривать данное сырье как перспективное для внедрения в медицинскую практику. При создании нормативной документации на растительное сырье необходимо наличие достоверных методик анализа основных биологически активных веществ растения.

В связи с этим целью настоящего исследования являлась разработка и валидация методики количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в листьях лавра благородного.

Материал и методы. В работе использовали высушенные листья лавра благородного, собранные на территории Краснодарского края (Геленджик) и в Республике Абхазия (Сухум). В качестве стандартных образцов (СО) использовали костунолид и дегидрокостуслактон (рис. 1) производства компании Sigma, с содержанием действующих веществ не менее 97 и 98 % соответственно.

Рис. 1. Химическая структура костунолида (А) и дегидрокостуслактона (В)

Для количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона использовался метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Работу проводили на системе для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) «Стайер» (компания «Аквилон», Россия). В работе применялась колонка Luna C 8 «Phenomenex, USA». Размер колонки 250×4,6 мм. Ввод пробы осуществлялся с помощью петлевого дозатора. Объем пробы 20 мкл. Элюирование проводилось в изократическом режиме. Элюент А – ацетонитрил, элюент В – 0,05 М раствор кислоты фосфорной, в соотношении 60:40. Расход подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование проводилось спектрофотометрически при 210 нм.

Результаты и обсуждение. На первом этапе исследования осуществлялась оптимизация условий экстракции анализируемых соединений из сырья. По данным литературы [8], наилучшим растворителем для извлечения костунолида из корней *Saussurea lappa* (данное растение также содержит костунолид) является метанол. Поэтому выбор условий экстракции проводили с использованием данного растворителя.

Для оптимизации соотношения «сырье – растворитель» точные навески (0,025; 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 и 1,0 г) высушенных листьев лавра благородного, измельченные до размера частиц не более 3 мм, переносили в коническую колбу, прибавляли 25 мл метанола и кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Полученное метанольное извлечение филь-

тровали в мерную колбу вместимостью 50 мл и после охлаждения доводили объем фильтрата до метки тем же растворителем. Далее 1 мл полученного извлечения переносили в пробирки типа Эппендорф, центрифугировали при 8000 мин⁻¹ в течение 10 мин и использовали для хроматографирования.

По результатам эксперимента было показано, что соотношение «сырье – растворитель» 1:250 позволяет извлечь наибольшее суммарное содержание анализируемых веществ, в связи с чем данное соотношение можно считать оптимальным.

На следующем этапе исследования оптимизировали количество экстракций. Для этого точную навеску образца (около 0,1 г) переносили в коническую колбу, прибавляли 25 мл метанола и кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин. Извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 25 мл и после охлаждения доводили до метки тем же растворителем. Экстракцию той же навески повторяли еще 2 раза. Каждый раз извлечение переносили в отдельную мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили до метки. Каждое извлечение анализировалось в одинаковых условиях.

Таким образом, двойная экстракция метанолом позволяет извлечь более 99 % каждого из веществ, что является оптимальным в ходе пробоподготовки.

С использованием оптимизированных условий пробоподготовки провели анализ изучаемых образцов сырья. Типичная хроматограмма извлечения из листьев лавра представлена на рисунке 2.

Рис. 2. Хроматограмма метанольного извлечения листьев лавра благородного

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик: специфичность, линейность, прецизионность и правильность.

Специфичность методики определения костунолида и дегидрокостуслактона подтверждалась соответствием времен удерживания пиков анализируемых соединений на хроматограмме извлечения и хроматограмме раствора смеси СО. Также для определения специфичности использовалась добавка смеси СО, при этом асимметричность, эффективность и профиль пиков не изменялись, что свидетельствует о специфичности методики.

Линейность методики подтверждали анализом 5 серий раствора смеси стандартных растворов костунолида и дегидрокостуслактона в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,025 г/100 мл (костунолид) и от 0,0001 до 0,0025 г/100 мл (дегидрокостуслактон). Сравнение зависимости между содержанием костунолида и дегидрокостуслактона в испытуемых

растворах и величинами площадей хроматографических пиков показало, что она имеет линейный характер.

Полученные графики свидетельствовали о том, что линейная зависимость площади пика костунолида и дегидрокостуслактона от концентрации анализируемого раствора наблюдается в широком диапазоне концентраций и выражается уравнением $y=615738x+189,94$ с коэффициентом корреляции $r=0,9995$ (для костунолида) и $y=557574x-36,695$ с коэффициентом корреляции $r=0,9995$ (для дегидрокостуслактона).

Таким образом, результаты оценки линейности подтверждают пригодность данной методики для количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в широком диапазоне концентраций.

Установление прецизионности проводили на уровне сходимости. Для этого на примере сырья, собранного в Республике Абхазия (Сухум), проводили 6 параллельных определений согласно разработанной методике. Затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD).

Значения относительного стандартного отклонения на уровне 6 % для обоих веществ является вполне приемлемым для анализа веществ в сырье, поскольку помимо ошибки, связанной с непосредственным анализом, свой существенный вклад вносят этапы пробоподготовки (взвешивание, экстракция, фильтрация). Следует также сказать, что достаточно небольшая навеска сырья (около 0,1 г) также способствует повышению погрешности, однако, с учетом оптимизированных условий экстракции, использование большей навески сырья невольно будет приводить к увеличению расхода экстрагента, что является нецелесообразным.

Правильность методики определяли методом добаков, выполнив 9 испытаний на 3 уровнях концен-

траций. Оценку правильности методики проводили по открываемости.

Полученные результаты свидетельствуют, что значения открываемости для обоих веществ находятся в пределах 98–102 %, что согласно общепринятым рекомендациям [4, 10] является признаком валидности методики по данному показателю.

С использованием разработанной и валидированной методики были получены следующие результаты количественного содержания костунолида и дегидрокостуслактона в образцах листьев лавра различных мест сбора. Результаты представлены в таблице.

Таблица

Результаты количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в изучаемых образцах листьев лавра благородного

Место сбора	Содержание, % $\pm$ SD	
	Костунолид	Дегидрокостуслактон
Геленджик	0,99 $\pm$ 0,063	0,11 $\pm$ 0,016
Сухум	0,99 $\pm$ 0,063	0,26 $\pm$ 0,016

Полученные результаты свидетельствуют о значительном содержании сесквитерпеновых лактонов в изучаемых образцах, что позволяет рассматривать листья лавра благородного как потенциальное лекарственное растительное сырье.

Заключение. Разработана методика количественного определения костунолида и дегидрокостуслактона в листьях лавра благородного с использованием ВЭЖХ. Методика была валидирована по основным показателям, что подтверждает возможность ее использования для количественного определения сесквитерпеновых лактонов в данном сырье.

Литература

- Аджиенко, В. Л. Отношение врачей к практике клинических исследований / В. Л. Аджиенко // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2005. – № 4. – С. 32–34.
- Коновалов, Д. А. Сесквитерпеновые лактоны листьев и плодов *Laurus nobilis* L. (лавра благородного) / Д. А. Коновалов, Н. М. Насухова // Фармация и фармакология. – 2014. – № 2. – С. 23–33.
- Fukuyama, N. Antimicrobial sesquiterpenoids from *Laurus nobilis* L. / N. Fukuyama, C. Ino, Y. Suzuki [et al.] // Natural Product Research. – 2011. – Vol. 25, № 14. – P. 1295–1303. doi: 10.1080/14786419.2010.502532
- Guidelines for standard method performance requirements [Электронный ресурс]. – Режим доступа: http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf.
- Hibasami, H. Sesquiterpenes (costunolide and zaluza-nin D) isolated from laurel (*Laurus nobilis* L.) induce cell death and morphological change indicative of apoptotic chromatin condensation in leukemia HL-60 cells / H. Hibasami, Y. Yamada, H. Moteki [et al.] // International Journal of Molecular Medicine. – 2003. – Vol. 12. – P. 147–151. doi: 10.3892/ijmm.12.2.147

References

- Adzhiyenko V. L. Vest. Volg. gos. med. univ. – Vestnik of Volgograd State Medical University. 2005;4:32–34.
- Kononov D. A., Nasukhova N. M. Farmatsiya i farmakol. – Pharmacy and pharmacology. 2014;2:23–33.
- Fukuyama N., Ino C., Suzuki Y., Kobayashi N., Hamamoto H., Sekimizu K., Orihara Y. Natural Prod. Res. 2011;25(14): 1295–1303. doi: 10.1080/14786419.2010.502532
- Guidelines for standard method performance requirements. http://www.aoac.org/imis15_prod/

- Julianti, E. Sesquiterpenes from the leaves of *Laurus nobilis* L. / E. Julianti, K. H. Jang, S. Lee [et al.] // Phytochemistry. – 2012. – Vol. 80. – P. 70–76. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.05.013
- Lohberger, B. Sesquiterpene Lactones Downregulate G2/M Cell Cycle Regulator Proteins and Affect the Invasive Potential of Human Soft Tissue Sarcoma Cells / B. Lohberger, B. Rinner, N. Stundl [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8, № 6. – P. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0066300
- Luna-Herrera, J. Synergistic antimycobacterial activities of sesquiterpene lactones from *Laurus* spp. / J. Luna-Herrera, M. C. Costa, H. G. Gonzalez [et al.] // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 548–552. doi: 10.1093/jac/dkl523
- Petrov, V. I. Prediction of Rat Resistance to Emotional Stress / V. I. Petrov, I. A. Grigor'ev, V. L. Adzhienko, V. E. Verovskii // Zh. Vyssh. Nervn. Deyat. – 1996. – Vol. 46, № 6. – P. 1119–1121.
- Rao, R. N. HPLC determination of costunolide as a marker of *Saussurea lappa* and its herbal formulation / R. N. Rao, S. S. Raju, K. S. Babu, V. P. Rao // Int. J. Res. Pharm. Chem. – 2013. – Vol. 3, № 1. – P. 99–107.

AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf.

- Hibasami H., Yamada Y., Moteki H., Katsuzaki H., Imai K., Yoshioka K., Komiya T. Int. J. Mol. Med. 2003;12: 147–151. doi: 10.3892/ijmm.12.2.147
- Julianti E., Jang K. H., Lee S., Lee D., Mar W., Oh K. B., Shin J. Phytochemistry. 2012;80:70–76. doi: 10.1016/j.phytochem.2012.05.013
- Lohberger B., Rinner B., Stundl N., Kaltenecker H., Steinecker-Frohnwieser B., Bernhart E., Kretsch-

- mer N. *PLoS ONE*. 2013;8(6):1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0066300
8. Luna-Herrera J., Costa M. C., Gonzalez H. G., Rodrigues A. I., Castilho P. C. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007;59(3):548-552. doi: 10.1093/jac/dkl523
9. Petrov V. I., Grigor'ev I. A., Adzhienko V. L., Verovskii V. E. *Zh. Vyssh. Nervn. Deyat.* 1996;46(6):1119-1121.
10. Rao R. N., Raju S. S., Babu, K. S., Rao V. P. *Int. J. Res. Pharm. Chem.* 2013;3(1):99-107.

Сведения об авторах:

Сенченко Сергей Петрович, кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической и токсикологической химии; тел.: 89283432515; e-mail: asp_nauka@mail.ru

Агова Лариса Аслановна, студентка; тел.: 89674164513; e-mail: lara.agova@mail.ru

Бобровский Игорь Николаевич, кандидат фармацевтических наук, преподаватель кафедры морфологии; тел.: 89624455946; e-mail: inbobrovsky@mail.ru

Насухова Наида Махмудовна, аспирант кафедры фармакогнозии; тел.: 89898658086; e-mail: nasuhov.5@mail.ru

Коновалов Дмитрий Алексеевич, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии; тел.: (8793)322076; e-mail: d.a.konovarov@pmedpharm.ru

© Коллектив авторов, 2016

УДК 615.454.01:615.214.31

DOI – <http://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11126>

ISSN – 2073-8137

РАЗРАБОТКА ТРАНСДЕРМАЛЬНОГО ГЕЛЯ С МАСЛОМ ЛИМОННИКА КИТАЙСКОГО И ОЦЕНКА СТЕПЕНИ ЕГО ВЛИЯНИЯ НА РАБОТОСПОСОБНОСТЬ И НЕВРОЛОГИЧЕСКИЙ СТАТУС ЖИВОТНЫХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М. С. Макиева¹, Ю. А. Морозов¹, А. В. Воронков², Э. Ф. Степанова²,
И. П. Ремезова², Д. И. Поздняков²

¹ Северо-Осетинский государственный университет им. К. Л. Хетагурова,
Владикавказ, Россия

² Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал Волгоградского государственного медицинского университета, Россия

DEVELOPMENT OF TRANSDERMAL GEL WITH SCHIZANDRA AND THE ASSESSMENT OF THE EXTENT OF ITS EFFECT ON WORKING CAPACITY AND NEUROLOGIC STATUS OF ANIMALS IN EXPERIMENT

Makieva M. S.¹, Morozov Yu. A.¹, Voronkov A. V.², Stepanova E. F.²,
Remezova I. P.², Pozdnyakov D. I.²

¹ K. L. Khetagurov North Ossetian State University, Vladikavkaz, Russia

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute,
a Branch of Volgograd State Medical University, Russia

Разработан трансдермальный гель с маслом лимонника китайского. Проведено исследование в отношении воздействия геля лимонника китайского на работоспособность и неврологический статус животных в условиях однократных и ежедневных истощающих физических и психоэмоциональных нагрузок. В эксперименте использовались крысы – самцы линии Wistar. Разовые физические нагрузки воспроизводили на модели «челночное плавание» без дополнительного отягощения, при этом оценивали выносливость и скоростно-силовые характеристики животного. Ежедневные истощающие нагрузки моделировали в тесте «принудительное плавание» с 20 % нагрузкой от веса животного на протяжении 10 дней. Психоэмоциональный статус экспериментальных животных оценивали в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». В результате исследования установлено, что однократное нанесение геля лимонника не оказывает влияния на выносливость животных, но в то же время способствует кратковременному увеличению скорости плавания крыс. При ежедневных истощающих нагрузках применение геля лимонника способствовало сохранению работоспособности и психоэмоционального статуса экспериментальных животных практически на неизменном уровне.

Ключевые слова: лимонник китайский, мексидол, трансдермальные лекарственные формы, гель, физическое и умственное перенапряжение