

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ В ТРАВЕ ПОЛЫНИ ОДНОЛЕТНЕЙ

**Д.Д. ВИНЮКОВ**  
**Д.А. КОНОВАЛОВ**

*Пятигорская государственная  
фармацевтическая академия*

*e-mail: konovalov\_da@pochta.ru*

Цель исследования – разработка методики количественного определения суммы сесквитерпеновых лактонов в траве полыни однолетней в пересчёте на артемизинин. Для достижения данной цели использовали сочетание метода тонкослойной хроматографии и прямой спектрофотометрии. В разработанной методике средний процент открываемости составляет 99,85%, а относительное стандартное отклонение не превышает 10-15%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа биологического объекта.

На основании полученных результатов можно сделать вывод о пригодности разработанной методики для контроля качества сырья полыни однолетней.

Ключевые слова: полынь однолетняя, *Artemisia annua*, артемизинин, сесквитерпеновые лактоны, тонкослойная хроматография, спектрофотометрия.

**Введение.** Согласно литературным данным сесквитерпеновые лактоны полыни однолетней (*Artemisia annua* L.) обладают антиульцерогенной, цитотоксической, антиоксидантной, гепатопротекторной и антимикробной активностями [1]. Кроме этого, полынь однолетняя в народной медицине применяется при лечении туберкулёза. Данные разных исследовательских групп показывают, что основным сесквитерпеновым лактоном полыни однолетней является артемизинин [2]. Актуальной задачей является разработка методики, позволяющей оценивать качество сырья этого растения по основной группе действующих соединений – сесквитерпеновым лактонам.

**Цель данного исследования** – разработать методику количественного определения суммы сесквитерпеновых лактонов в траве полыни однолетней в пересчёте на артемизинин.

**Методы исследования.** Для достижения данной цели использовали сочетание методов тонкослойной хроматографии и прямой спектрофотометрии.

Аналитическую пробу сырья надземной части полыни однолетней измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Точную навеску (около 25,0 г) экстрагируют спиртом метиловым в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане порциями по 20 мл 2 раза и по 15 мл 2 раза, в течение 1 часа в каждом случае. Полученные извлечения фильтруют в круглодонную колбу, фильтрат упаривают при пониженном давлении до сухого остатка, остаток растворяют в хлороформе и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят до метки хлороформом (раствор А). Хроматографирование проводят восходящим способом на пластинках «Sorbfil» ПТСХ-П-А (Россия) 10×10 см, в системе растворителей петролейный эфир – этилацетат 9:1. 0,02 мл раствора А наносят микропипеткой в виде полосы длиной 4 см на линию старта. В качестве свидетеля наносят 0,001% раствор артемизинина. После прохождения фронта растворителя с боковой стороны пластинки на которой был свидетель отрезают ленту и проводят её детектирование раствором: спирт этиловый 96% - кислота серная концентрированная – кислота уксусная - анисовый альдегид в соотношении (170:10:20:1), с последующим нагреванием в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С. Через 5 минут обнаруживается зона темно-красного цвета с  $R_f = 0,47 \pm 0,03$ . Отмечают зону, соответствующую артемизинину, и соотносят её с остальной пластинкой. Снимают скальпелем слой сорбента с непроявленной части хроматографической пластинки в зоне сорбции артемизинина. Элюирование сорбента проводят 10 мл хлороформа в трёхкратной повторности. Элюат фильтруют через стеклянный фильтр №4 в круглодонную колбу вместимостью 50 мл и отгоняют растворитель при пониженном давлении на водяной бане до сухого остатка. Сухой остаток растворяют в спирте метиловом и количественно переносят в мерную колбу на 10 мл которую доводят до метки тем же растворителем раствор (Б).

10 мл раствора Б помещают в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки раствором натрия гидроксида 0,05 моль/л и выдерживают на водяной бане при 45-50 °С 30 минут, охлаждают и определяют оптическую плотность раствора на спектрофо-

тометре марки СФ-46 при длине волны 292 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор 1 мл спирта метилового, доведенного в мерной колбе объемом 50 мл, до метки раствором натрия гидроксида 0,05 моль/л.

Параллельно измеряют оптическую плотность модельного раствора комплекса артемизинина с натрия гидроксидом.

Содержание суммы лактонов в абсолютно сухом сырье в пересчете на артемизинин в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_x \times a_0 \times 10 \times 10 \times 10 \times 25}{a_x \times D_0 \times 100 \times 50 \times 0,02 \times (100 - W)} \times 100\%$$

где X – содержание артемизинина, %;

$D_x$  – оптическая плотность исследуемого раствора,

$D_0$  – оптическая плотность модельного раствора,

$a_0$  – масса артемизинина, г;

$a_x$  – масса сырья, г;

W – влажность сырья.

Для разработки оптимальной методики была установлена область линейной зависимости оптической плотности от концентрации анализируемого вещества. Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций от теоретического содержания суммы лактонов в пересчете на артемизинин в траве полыни однолетней, растворы готовили путем разбавления аликвоты и увеличения аликвоты, растворы имели следующие концентрации 50%, 75%, 100%, 125% и 150% соответственно.

Определение повторяемости методики проводили на одном образце сырья полыни однолетней, на шести параллельных измерениях.

Для оценки точности метода были подготовлены пробы с различными навесками сырья.

Правильность методики устанавливали путем измерения количественного содержания суммы сесквитерпеновых лактонов в траве полыни однолетней в пересчете на артемизинин в растворах, полученных путем добавления артемизинина к навеске сырья.

**Результаты.** На рис. 1, видно, что почти все экспериментальные точки лежат на линии тренда. Следовательно, область линейной зависимости наблюдается при концентрациях суммы лактонов в пересчете на артемизинин от 0,008 до 0,024 г/10 мл, табл. 1.

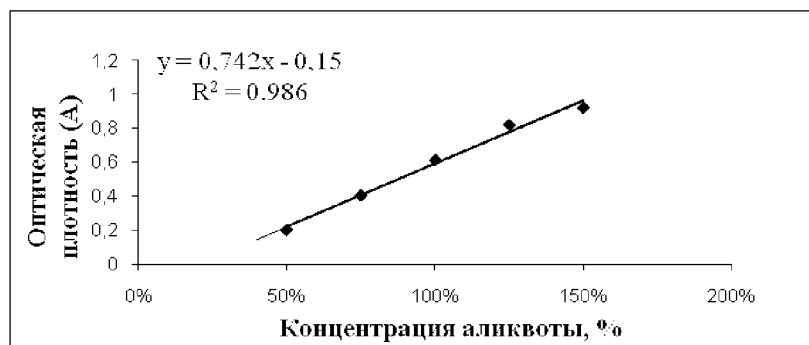


Рис. 1. Зависимость оптической плотности от концентрации аликвоты

Таблица 1

**Концентрации суммы лактонов в пересчете на артемизинин**

№ измерения	Содержание, % от нормируемого значения (около)	Аналитический отклик (оптическая плотность)	Содержание суммы лактонов, г\10 мл.
1	50	0,201	0,0083
2	75	0,405	0,0121
3	100	0,614	0,0161
4	125	0,821	0,0202
5	150	0,921	0,0241

Величина коэффициента корреляции составила 0,98, что считается удовлетворительной корреляцией.

Результаты по исследованию повторяемости разработанной методики представлены в табл. 2.



Таблица 2

**Результаты установления повторяемости методики**

Повторность	Содержание суммы лактонов в пересчете на артемизинин в абсолютно сухом сырье полыни однолетней, %
1	1,619
2	1,633
3	1,524
4	1,612
5	1,523
6	1,629
Среднее значение	1,588
Относительное стандартное отклонение (RSD), %	3,3%

Относительное стандартное отклонение равно 3,3%, это говорит о том, что методика позволяет получить удовлетворительные по сходимости результаты.

При оценке точности методики на всех трех уровнях определения концентрации суммы лактонов в анализируемых навесках были получены сопоставимые результаты (табл. 3).

Таблица 3

**Результаты установления точности методики**

№ опыта	Навеска сырья, г	$x_i^*$	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$	Метрологические характеристики  $S_x = 0,0675$ $S_{\bar{x}} = 0,0225$ $\Delta x = 0,052$ $\varepsilon = 3,28\%$ $RSD = 4,3\%$
1.	24,2581	1,57	0,014	0,0002	
2.	24,1064	1,63	0,046	0,0021	
3.	24,3271	1,66	0,076	0,0058	
4.	25,2547	1,59	0,006	0,00004	
5.	25,5471	1,54	0,044	0,002	
6.	25,5281	1,61	0,026	0,0007	
7.	26,6471	1,43	0,154	0,024	
8.	26,5268	1,62	0,036	0,0013	
9.	26,4892	1,61	0,026	0,0007	
Среднее значение $\bar{x} = 1,584$					
Сумма значений $\sum (x_i - \bar{x})^2 = 0,03684$					

*Примечание:* \* – содержание (%) в пересчете на абсолютно-сухое сырье.

Относительное стандартное отклонение равно 4,3% и не превышает величину RSD, предусмотренную для спектрофотометрических методов.

Результаты по установлению правильности методики представлены в табл. 4.

Таблица 4

**Определение правильности методики (результаты опытов с добавками)**

№ пробы	Количество добавленного стандарта	Содержание суммы лактонов в % теоретическое	Содержание суммы лактонов в % практическое	Открываемость, R, %	$\bar{R} = 99,85$ $SD=5,332$ $RSD=5,34\%$
1	0	1,61	1,61	100	
2	0,05	1,66	1,643	98,97	
3	0,05	1,66	1,674	100,84	
4	0,05	1,66	1,641	102,56	
5	0,1	1,71	1,682	98,36	
6	0,1	1,71	1,675	98,01	
7	0,1	1,71	1,794	104,91	
8	0,15	1,76	1,721	97,78	
9	0,15	1,76	1,738	98,75	
10	0,15	1,76	1,732	98,40	

*Примечание:* \* – содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в абсолютно сухом сырье



В разработанной методике средний процент открываемости составил 99,85 %, а относительное стандартное отклонение не превышает 10-15%, что соответствует величине RSD, оптимальной для данного метода анализа биологического объекта.

**Выводы.** Использование сочетания методов тонкослойной хроматографии и прямой спектрофотометрии позволило разработать методику количественного определения суммы сесквитерпеновых лактонов (в пересчёте на артемизинин) в траве полыни однолетней.

На основании результатов, полученных в процессе валидации методики по параметрам линейности, повторяемости, воспроизводимости и правильности, можно сделать вывод о пригодности разработанной нами методики для контроля качества сырья полыни однолетней.

#### Список литературы

1. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity / R.S. Bhakuni, [et al.] // *Current Science*. – 2001 - Vol. 80, Is. 1. – P. 35-48.
2. Ferreira, J.F.S. Developmental studies of *Artemisia annua*: flowering and artemisinin production under greenhouse and field conditions./ J.F.S. Ferreira, J.E. Simon, J. Janick - *Planta Medica*, 1995, 61:167–170.

### QUANTITATIVE DEFINITION OF THE SUM OF SESQUITERPENE LACTONES IN A GRASS OF A WORMWOOD ANNUAL

**D.D. VINJUKOV**  
**D.A. KONOVALOV**

*Pyatigorsk state  
pharmaceutical academy,  
Pyatigorsk*

*e-mail: konovalov\_da@pochta.ru*

Research objective - working out of a technique of quantitative definition of the sum of sesquiterpene lactones in a grass of a wormwood annual in recalculation on an artemisinin. For achievement of the given purpose used a combination of a method of a thin-layer chromatography and a direct spectrophotometry.

In the developed technique the average percent of a quantification limit makes 99,85%, and the relative standard deviation does not exceed 10-15% that corresponds to size RSD, optimum for the given method of the analysis of biological object.

On the basis of the received results, it is possible to draw a conclusion on suitability of the developed technique for quality assurance of raw materials of a wormwood annual.

Key words: a wormwood annual, an artemisinin, sesquiterpene lactones, a thin-layer chromatography, a spectrophotometry.