

УДК 543.544.943.3

ВАЛИДАЦИОННАЯ ОЦЕНКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАЙКАЛИНА МЕТОДОМ ПЛАНАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

В.Э. Ким, Т.Д. Мезенова, Д.А. Коновалов

*Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ
Минздрава России, г. Пятигорск*

VALIDATION ESTIMATION OF BAICALIN DETERMINATION USING PLANAR CHROMATOGRAPHY

V.E. Kim, T.D. Mezenova, D.A. Konovalov

*Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical
University, Pyatigorsk*

Целью работы явился поиск доступной и в то же время эффективной методики количественного определения байкалина в жидком комплексном фитоизвлечении. В статье приведены экспериментальные данные количественного определения байкалина, полученные методом денситометрии. Методика была валидирована, есть возможность ее использования для идентификации и количественного определения байкалина в растительном сырье.

Ключевые слова: ТСХ, байкалин, шлемник байкальский, количественное определение.

В настоящее время перспективным и интересным направлением фармацевтической науки и практики с целью последующего клинического использования является изучение биологически активных соединений из лекарственного растительного сырья [1, 2]. Среди таких объектов наше внимание привлек байкалин – основное действующее вещество шлемника байкальского корней. Байкалин представляет собой гликозид с химической формулой $C_{21}H_{18}O_{11}$. По данным литературы байкалин обладает седативным, противоопухолевым, антиоксидантным, противовоспалительным действиями [3].

Анализ торговых образцов корней

The search for available and at the effective method of quantitative determination of Baicalin in liquid complex phyto-extraction was the purpose of this work. The article shows experimental data of quantitative determination of Baicalin, received with densitometry. The method was validated, therefore there is an opportunity of its use for identification and quantitative determination of Baicalin in plants active parts.

Keywords: TLC, Baicalin, Baikal skullcap, *Scutellaria baicalensis*, quantitative determination.

шлемника, проведенный с помощью ВЭЖХ, показал, что в них содержится от 7,0 до 8,6% байкалина и от 2,3 до 4,6% вогонизида, а также агликоны байкалеин и вогонин [4].

Целью работы явилась разработка и валидационная оценка доступной, достаточно эффективной и чувствительной методики идентификации и количественного определения байкалина. Для реализации поставленной цели использовали метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии. Метод фармакопейный, востребованный и не требует сложного аппаратного оснащения, а также по аналитическим характеристикам не уступает методу ВЭЖХ [5].

Приготовление раствора байкалина: около 0,05 г (точная навеска) стандартного образца (СО) байкалина (Sigma-Aldrich 95%) помещали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, добавляли около 30 мл 70% спирта этилового, нагревали раствор на водяной бане до растворения порошка при перемешивании, охлаждали до комнатной температуры, а затем доводили объем раствора спиртом до метки (концентрация 1 мкг/мл).

Хроматографирование проводили на пластинках марки Silufol, Sorbfil (ПТСХ-АФ-В-УФ) и Sorbfil (ПТСХ-П-А-УФ). Наиболее эффективными оказались пластинки для высокоэффективной хроматографии Sorbfil (ПТСХ-АФ-В-УФ), число теоретических тарелок 170.

Исследуемые системы растворителей: бензол – EtAc – HCOOH (3:1:0,05); AmOH – MeOH – HCOOH – H₂O (7:1:1:1); бензол – MeOH – бутанон – HCOOH (14:2:3:1); н-бутанол – CH₃COOH – H₂O (4:1:1).

Наиболее оптимальное значение R_f в системе растворителей н-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:1).

На линию старта длиной 15 см наносили 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0 мкл раствора СО байкалина. Пробы наносили при помощи микрошприца МШ-10. Пластинки помеща-

ли в камеру для хроматографирования объемом 2000 см³, насыщенную парами растворителя. После подъема растворителя на необходимый уровень пластинки вынимали, высушивали в вытяжном шкафу при комнатной температуре до удаления паров растворителя. Длина пробега растворителя около 8 см. Детектирование проводили в УФ свете и 5% NaOH, пластинки сканировали при помощи планшетного сканера «HP Scanjet 3670» (разрешение 100 dpi) и далее осуществляли ее цифровую обработку с помощью компьютерной программы «Видеоденситометр Sorbfil» (г. Краснодар).

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки (внешнего стандарта), по градуировочному графику зависимости «масса вещества – площадь пика» (линейная аппроксимация). Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента и биологических испытаний» [6].

На цифровой хроматограмме СО байкалина находится два пика с R_f 0,26 и 0,43 одинаковой окраски, что свидетельствует о неоднородности стандартного образца (рис. 1).

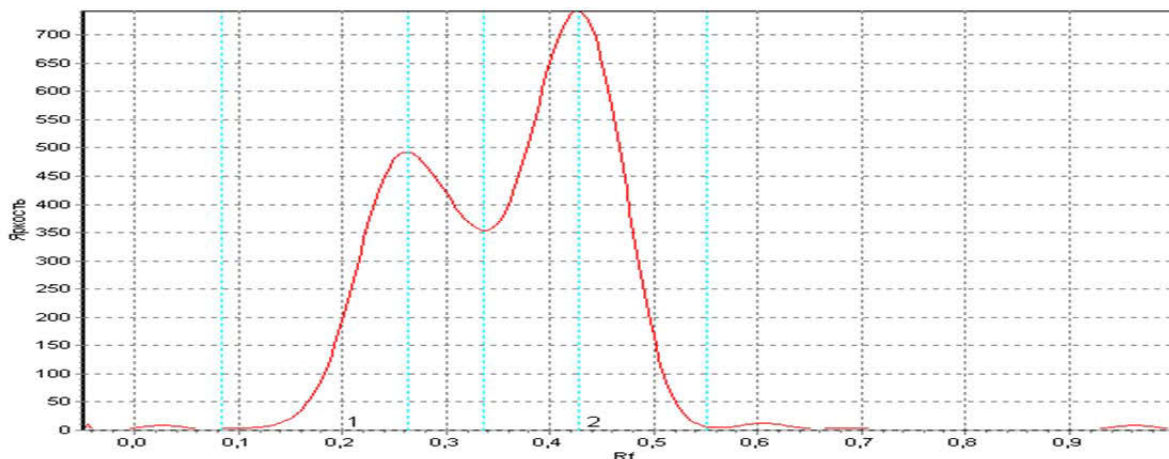


Рисунок 1 – Хроматограмма СО байкалина, полученная методом ТСХ

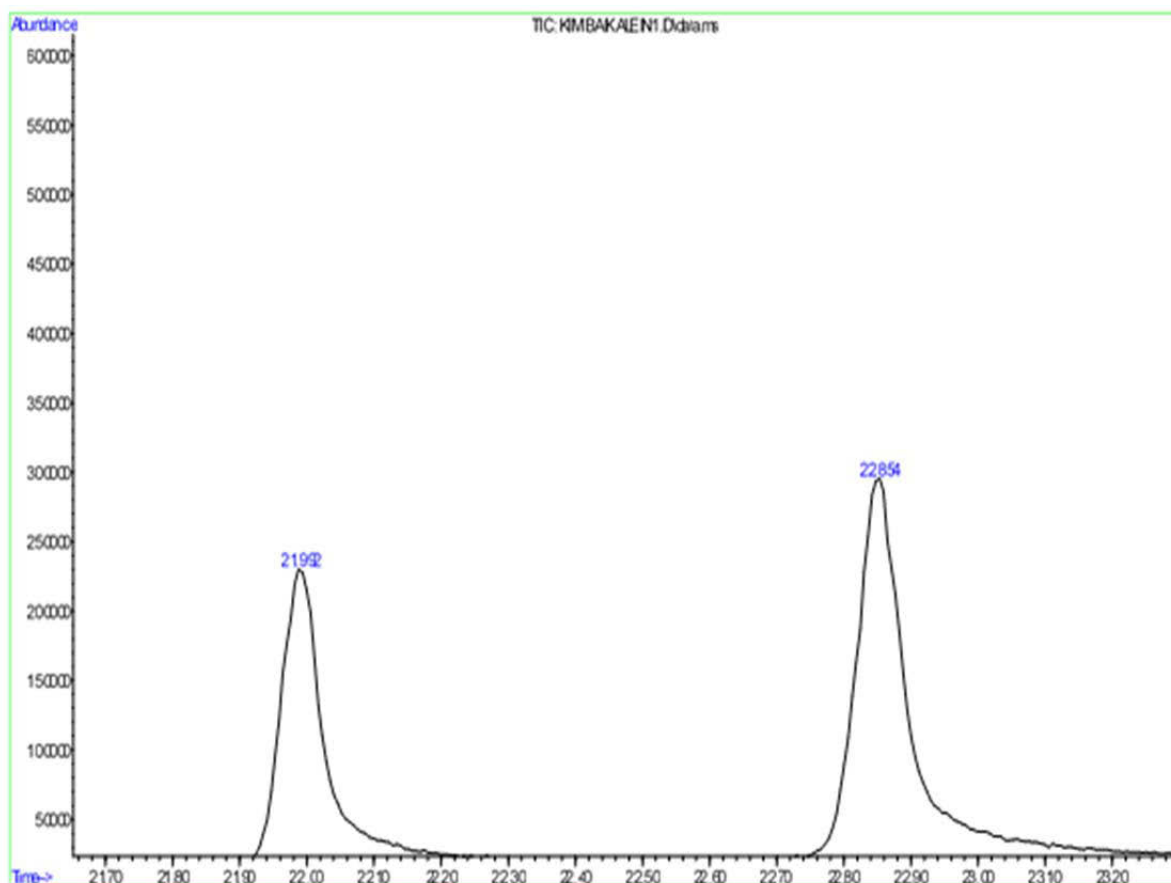


Рисунок 2 – Хроматограмма СО байкалина, полученная методом ГХ/МС

Методом внутренней нормализации определено, что содержание вещества с R_f 0,26 составило 39,9%, а с R_f 0,43 – 60,1%. Полученные нами данные соответствуют результатам, полученным методом ГХ/МС (рис. 2). Исследования проводили по данным пика с R_f 0,43.

Согласно рекомендации ГФ XII и международных стандартов, любая аналитическая методика должна быть подвергнута валидации, т.е. экспериментальному подтверждению ее пригодности к практическому использованию и получению достоверной информации об объекте анализа.

Валидацию методики определения байкалина проводили по следующим характеристикам: предел обнаружения (ПО), предел количественного определения, линейность, правильность.

Предел обнаружения (ПО) рассчитывали по формуле: $ПО = 3,3 \times S/b$, где: S – стандартное отклонение сигнала; b – угловой коэффициент градуировочного графика. $ПО = 0,197$ мкг.

Предел количественного определения (ПКО) рассчитывали по формуле: $ПКО = 10 \cdot S/b$, где: S – стандартное отклонение сигнала; b – угловой коэффициент градуировочного графика. $ПКО = 0,6$ мкг.

Линейность методики определяли экспериментально измерением аналитических сигналов для 5-и проб с разными концентрациями байкалина. При изучении зависимости площадей пиков от концентрации байкалина был получен следующий градуировочный график (рис. 3).

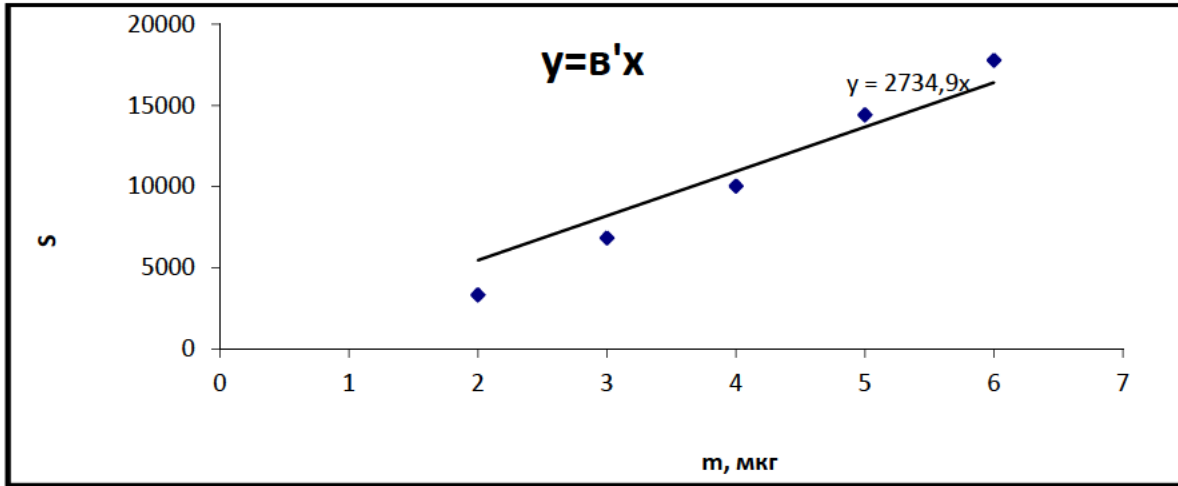


Рисунок 3 – Градуировочный график СО байкалина

Уравнение регрессии и коэффициент корреляции были рассчитаны в электронных таблицах Microsoft Excel.

Методом наименьших квадратов определяли значимость свободного члена линейной зависимости (a) и углового коэффициента (b).

Установлено, что зависимость площадей пиков от содержания байкалина в аналитической области методики (от 2 до 6

мкг в вводимой пробе) является линейной. Коэффициент корреляции $r = 0,993$. Уравнение регрессии имеет вид $S = 2,73 \cdot 10^3 m$.

Правильность методики определяли методом «введено-найдено». По уравнению градуировочного графика рассчитывали содержание байкалина на 5-и уровнях концентраций СО и определяли метрологические характеристики (табл. 1).

Таблица 1 – Оценка правильности определения байкалина

| Уровень | Взято, мкг | Найдено, мкг | Открываемость, % | Метрологические характеристики |
|---------|------------|--------------|------------------|---|
| 1 | 2,0 | 2,13 | 105 | $X_{ср} = 100,2$ $SD = 1,2$ $\Delta X = 2,76$ $RSD = 3,85\%$ $E\% = 2,76\%$ |
| 1 | 2,0 | 1,85 | 93 | |
| 2 | 3,0 | 3,06 | 102 | |
| 2 | 3,0 | 2,95 | 98 | |
| 3 | 4,0 | 3,90 | 97 | |
| 3 | 4,0 | 4,19 | 105 | |
| 4 | 5,0 | 4,88 | 98 | |
| 4 | 5,0 | 5,15 | 103 | |
| 5 | 6,0 | 5,95 | 99 | |
| 5 | 6,0 | 6,13 | 102 | |

Данной методикой было проведено обнаружение байкалина в спиртовом комплексном экстракте шлемника байкальского корней, синюхи голубой и пустырника травы. Ранее было доказано, что доминантным веществом комплекса является байкалин. На хроматограмме экстракта обнаружено 7 пятен, причем 2 из них по окраске и величине R_f соответствуют СО байкалина. Коэффициенты разделения $\alpha = 1,17$ (пятно с $R_f 0,43$) и $1,12$ (пятно с $R_f 0,26$).

Результаты исследований свидетельствуют, что методика имеет достаточно высокую чувствительность и эффективность. Методика количественного определения отвечает необходимым требованиям по показателям линейность и правильность. Данную методику можно использовать для идентификации и количественного определения байкалина в растительном сырье.

Библиографический список

1. Аджиенко В.Л. Социологические закономерности клинических исследований лекарственных средств: Автореф. дис. д. мед. н. – Волгоград: ВолгГМУ, 2008. – 48 с.
2. Аджиенко В.Л. Отношение врачей к практике клинических исследований // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2005. – № 4. – С. 32-34.
3. Попова Т.П., Литвиненко В.И., Ковалев И.П. Флавоны корней *Scutellaria baicalensis* // Химия природных соединений. 1973. №6. С. 729–733.
4. Шлемник байкальский. Фитохимия и фармакологические свойства / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, В.И. Литвиненко и др. – Томск: Изд-во Томск. ун-та, 1994. – 223 с.
5. Красиков В.Д. Основы планарной хроматографии. – СПб.: Химиздат, 2005. – 232 с.
6. Государственная фармакопея Российской Федерации. – 12-е изд. - М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2008. – Ч.2. – 704 с.

* * *

Ким Владислав Эрнестович – аспирант кафедры фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: разработка, исследование и стандартизация ЛС и БАД к пище.

Мезенова Татьяна Дмитриевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры аналитической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: анализ биологически активных соединений.

Коновалов Дмитрий Алексеевич – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: фитохимия, химия природных соединений, хемотаксономия. E-mail: konovalov_da@pochta.ru.