

[https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-104-107](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-104-107)
УДК 615.32; 615.07



Оригинальная статья / Research article

Определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного травы

М. В. Ароян*, Ю. Э. Генералова, И. И. Тернинко, И. Е. Каухова, Е. К. Новикова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А

*Контактное лицо: Ароян Мария Вахтанговна. E-mail: mariya.aroyan@pharminnotech.com

ORCID: М. В. Ароян – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Ю. Э. Генералова – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
И. Е. Каухова – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>; Е. К. Новикова – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Статья поступила: 20.10.2021

Статья принята в печать: 01.12.2021

Статья опубликована: 27.12.2021

Резюме

Введение. Субстанции растительного происхождения проявляют разнообразную фармакологическую активность в сочетании с относительно низкой токсичностью и частотой проявления побочных эффектов. В связи с этим, перспективным направлением является стандартизации субстанций растительного происхождения в процессе разработки новых растительных препаратов.

Цель. Качественное и количественное определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного.

Материалы и методы. В качестве объекта исследований использовали субстанцию – сухой экстракт донника лекарственного травы. Определение индивидуального кумарина проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований на основании сопоставления времен удерживания пробы с временем удерживания стандартного образца кумарина в исследуемом образце сухого экстракта методом высокоэффективной жидкостной хроматографии был идентифицирован кумарин. Содержание кумарина в сухом экстракте составило $0,642 \pm 0,007$ %.

Заключение. Полученные данные о качественном и количественном содержании кумарина в сухом экстракте донника лекарственного были использованы в разработке проекта спецификации показателей качества.

Ключевые слова: донник лекарственный, сухой экстракт, кумарин, высокоэффективная жидкостная хроматография, качественный анализ, количественный анализ

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. И. Е. Каухова, М. В. Ароян, Е. К. Новикова предложили технологию получения сухого экстракта из донника лекарственного травы. И. И. Тернинко, Ю. Э. Генералова качественно обнаружили и количественно определили индивидуальный кумарин в сухом экстракте донника лекарственного. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Ароян М. В., Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Каухова И. Е., Новикова Е. К. Определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):104–107. [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-104-107](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-104-107)

Determination of Individual Coumarin in a Dry Extract of *Melilotus Officinalis* L.

Mariya V. Aroyan*, Yuliya E. Generalova, Inna I. Terninko, Irina E. Kaukhova,
Ekaterina K. Novikova

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

*Corresponding author: Mariya V. Aroyan. E-mail: mariya.aroyan@pharminnotech.com

ORCID: Mariya V. Aroyan – <https://orcid.org/0000-0002-8314-8398>; Yuliya E. Generalova – <https://orcid.org/0000-0002-2573-6036>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>;
Irina E. Kaukhova – <https://orcid.org/0000-0002-0896-6956>; Ekaterina K. Novikova – <https://orcid.org/0000-0002-2602-0697>.

Received: 20.10.2021

Revised: 01.12.2021

Published: 27.12.2021

Abstract

Introduction. Substances of plant origin exhibit a variety of pharmacological activity in combination with a relatively low toxicity and frequency of side effects. In this regard, a promising direction is the standardization of substances of plant origin in the development of new herbal medicinal products.

Aim. Qualitative and quantitative determination of individual coumarin in a dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Materials and methods. A dry extract of the *Melilotus officinalis* L. was used as an object of research. Determination of individual coumarin was carried out by high-performance liquid chromatography.

Results and discussion. As a result of the research, coumarin was identified by high performance liquid chromatography based on comparison of retention times of the sample with retention times of a standard sample of coumarin in the sample of dry extract under research. The coumarin contents in the dry extract was 0.642 ± 0.007 %.

© Ароян М. В., Генералова Ю. Э., Тернинко И. И., Каухова И. Е., Новикова Е. К., 2021

© Aroyan M. V., Generalova Yu. E., Terninko I. I., Kaukhova I. E., Novikova E. K., 2021

Conclusion. The data obtained on the qualitative and quantitative content of coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L. were used in the development of the draft version specification of quality indicators.

Keywords: *Melilotus officinalis* L., dry extract, coumarin, high performance liquid chromatography, qualitative analysis, quantitative analysis

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Irina E. Kaukhova, Mariya V. Aroyan, Ekaterina K. Novikova proposed a technology for obtaining a dry extract from the herb *Melilotus Officinalis* L. Inna I. Terninko and Yuliya E. Generalova qualitatively detected and quantified individual coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the Center for Collective Use "Analytical Center of Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University" within the framework of agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of Russia.

For citation: Aroyan M. V., Generalova Yu. E., Terninko I. I., Kaukhova I. E., Novikova E. K. Determination of individual coumarin in a dry extract of *Melilotus officinalis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):104–107. (In Russ.) [https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4\(1\)-104-107](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-104-107)

ВВЕДЕНИЕ

Зарубежный и отечественный фармацевтический рынок характеризуется тенденцией к увеличению потребительского интереса к лекарственным средствам растительного происхождения. Расширение сырьевой базы лекарственных растений объясняется относительно низкой частотой побочных явлений и возможностью длительного приема лекарственных растительных препаратов [1–3]. В связи с чем, особое внимание следует уделять изучению химического состава лекарственных растений, стандартизации лекарственных субстанций растительного происхождения, разработке эффективных технологий получения лекарственных препаратов на их основе [4–7]. Среди лекарственного растительного сырья (ЛРС) перспективным объектом изучения является донник лекарственный.

Донника лекарственного трава впервые включена в Государственную Фармакопею 13 издания. При качественном анализе донника лекарственного травы были выявлены кумарины, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, сапонины, полифенолы. В предварительных фармакологических исследованиях у извлечений из травы донника лекарственного были установлены обезболивающий, противовоспалительный, капилляроукрепляющий эффекты. Однако до настоящего времени на фармацевтическом рынке практически отсутствуют лекарственные средства на основе экстрактов из донника лекарственного [8–10].

Цель работы. Качественное и количественное определение индивидуального кумарина в сухом экстракте донника лекарственного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Стандартный образец (СО) кумарина (CAS 91-64-5, ≥98 %), спирт (ГОСТ Р 51652-2000), вода очищенная (ФС.2.2.0020.15 «Вода очищенная»), ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (gradient grade, ≥99,9 %), кислота ортофосфорная 85 % (ГОСТ 6552-58).

Объектом исследования являлась субстанция – сухой экстракт донника лекарственного, представляющий собой порошок темно-коричневого цвета, с характерным запахом, горького вкуса.

Методы. Качественное и количественное определение кумарина проводили методом ВЭЖХ (Shimadzu LC-20, SPD-M20A, снабженным диодно-матричным детектором).

Хроматографические условия: колонка Intersil ODS3, 250 × 4,6 мм, 5 мкм (Phenomenex, США); подвижная фаза 0,1 % кислота ортофосфорная/ацетонитрил в соотношении 75/25; скорость потока 1 мл/мин; объем пробы 20 мкл; температура колонки 40 °C; длина волны 275 нм.

Приготовление стандартного раствора кумарина: раствор готовили путем растворения кумарина в 96 % этиловом спирте. Точную навеску СО кумарина помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки 96 % этиловым спиртом. Растворы перемешивали. Получали растворы с содержанием стандартного вещества 9,5 мг (исходный раствор). Стандартный раствор готовили непосредственно перед анализом путем разбавления исходных растворов водой очищенной до концентраций 0,0095 мг/мл.

Подготовка пробы испытуемого образца. Точную навеску сухого экстракта донника лекарственного травы помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, прибавляли 1 мл этилового спирта 96 %, доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали и фильтровали. Все растворы фильтровали через мембранный фильтр Nylon с диаметром пор 0,45 мкм (Perkin Elmer, США) и записывали хроматограммы.

Количественное обнаружение кумарина проводили методом внешнего стандарта. Подготовку раствора СО кумарина и пробы испытуемого образца проводили по методике, описанной выше.

Содержание кумарина в сухом экстракте пересчитывали на стандарт в процентах (X) вычисляли по формуле 1:

$$X = \frac{C_{\text{ст}} S_x P 100}{C_o S_{\text{ст}} (100 - W)},$$

где $C_{\text{ст}}$ и C_o – концентрация стандарта и испытуемого вещества, г/мл; $S_{\text{ст}}$ – площадь пика стандарта, mV/c; S_x – площадь пика вещества в сухом экстракте, mV/c; P – содержание вещества в стандартном образце, %; W – потеря в массе при высушивании сухого экстракта, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для получения сухого экстракта донника лекарственного травы, содержащего кумарин, навеску лекарственного растительного сырья, измельченного на электро траво- и корнерезке (ТУ 37-53 тип 622-1-М, Россия) до размера частиц 0,5–1,0 мм, загружали в емкость, заливали экстрагентом – этиловый спирт 65 % в соотношении сырье–экстрагент 1:20. Экстрагирование осуществляли методом мацерации в ультразвуковой бане (ПСБ-2835-05 ПСБ-Галс, Россия) при температуре 75 °С, время экстрагирования – 25 минут. Полученное извлечение отстаивали при температуре не выше 8 °С в течение 2 суток, отфильтровывали. Сушку экстракта проводили в сушильном шкафу (Смоленское СКТБ СПУ, Россия) при температуре 55–60 °С до остаточного влагосодержания в экстракте не более 5 %. Сухой экстракт измельчали и просеивали через сито 1,0 мм [11].

На рисунке 1 представлена хроматограмма стандартного образца кумарина.

Результаты хроматографического исследования пробы испытуемого образца представлены на рисунке 2.

Идентификацию кумарина проводили путем сопоставления времен удерживания пика, полученного на хроматограмме пробы с временем удерживания стандартного образца кумарина, а также спектров поглощения соответствующих пиков (рисунк 3).

Время удерживания пика стандартного образца кумарина составляло 19,39 мин, на хроматограмме исследуемого образца сухого экстракта наблюдается

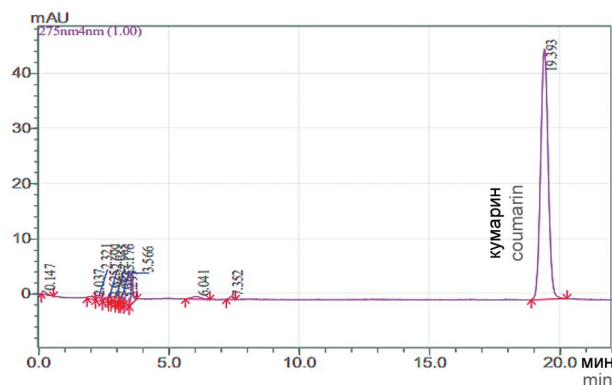


Рисунок 1. Хроматограмма СО кумарина

Figure 1. Chromatogram of coumarin

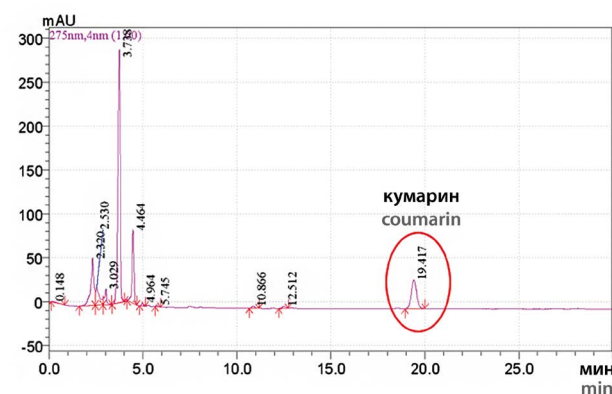


Рисунок 2. Хроматограмма ВЭЖХ сухого экстракта донника лекарственного

Figure 2. HPLC chromatogram of a dry extract of *Melilotus officinalis* L.

пик с временем удерживания 19,42 мин, относительная погрешность времен составляет 0,2 %, что позволяет идентифицировать пик как кумарин. Спектры, полученные для указанных пиков, совпадают по положению максимумов поглощения, что подтверждает идентификацию пика, как кумарин.

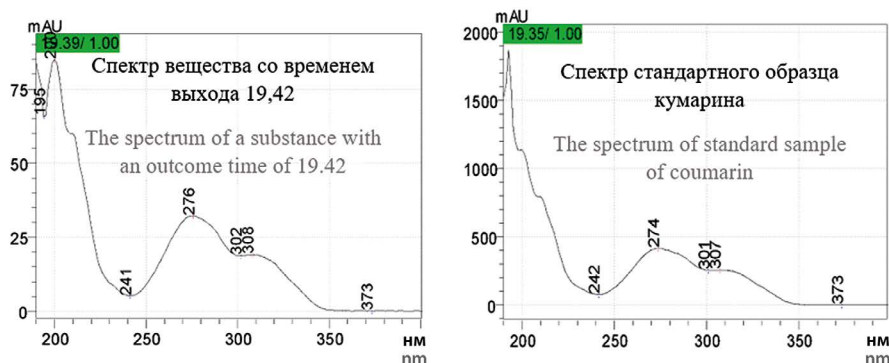


Рисунок 3. Спектр СО кумарина и сухого экстракта донника лекарственного

Figure 3. Spectrum of coumarin and dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Результаты количественного определения кумарина в сухом экстракте донника лекарственного представлены в таблице 1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований методом ВЭЖХ с использованием раствора свидетеля (СО кумарина) в сухом экстракте донника лекарственного установлено наличие кумарина.

Методом ВЭЖХ установлено, что сухой экстракт донника лекарственного содержит $0,642 \pm 0,007$ % кумарина.

ЛИТЕРАТУРА

- Скибина А. А., Боков Д. О., Гравель И. В., Ермакова В. А., Самылина И. А. ВЭЖХ-анализ фенольного комплекса грудного сбора № 4 и сухого экстракта на его основе. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):98–102. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Kaukhova I. E., Weinstein V. A., Burakova M. A., Aroyan M. V., Novikova E. K. Methods of extraction of medicinal vegetable raw materials in phytosubstances technology. *Advances in Biological Sciences Research. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences*. 2019;7:140–142. DOI: 10.2991/isils-19.2019.32.
- Демидова О. А., Архипов В. В., Журавлева М. В., Александрова Т. В., Александров А. А. Безопасность лекарственных растительных препаратов: клинико-фармакологические аспекты. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2020;8(4):165–177. DOI: 10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177 1CC.
- Каухова И. Е., Новикова Е. К., Чачин Д. А. Разработка условий экстрагирования череды трехраздельной травы, золотарника канадского травы, репешка обыкновенного травы. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3:64–67.
- Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Kaukhova I. E., Aroyan M. V. Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):559–563. DOI: 10.1007/s11094-019-02037-5.
- Bryda O., Stadnytska N. Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: Advantages and limitations. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(5):1737–1751.
- Hashemi S. M. B., Khaneghah A. M., Koubaa M., Barba F. J., Abedi E., Niakousari M., Tavakoli J. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 2018;65:197–204. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
- Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus officinalis* – A review. *Journal of Pharmacy*. 2020;10(1):26–36.
- Mirzaei S. Z., Lashgarian H. E., Karkhane M. Bio-inspired silver selenide nano-chalcogens using aqueous extract of *Melilotus officinalis* with biological activities. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021;8:56–63. DOI: 10.1186/s40643-021-00412-3.
- Liu Y.-T., Gong P.-H., Xiao F.-Q., Shao S., Zhao D.-Q., Yan M.-M., Yang X.-W. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflam-

matory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*. 2018;23(2):271. DOI: 27110.3390/molecules23020271.

- Аройан М. В. Исследования по выбору основы для геля на основе сухого экстракта донника лекарственного. Сборник материалов конференции «Молодая фармация – потенциал будущего»; 2019 22–23 апреля. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2019. 922 с.

REFERENCES

- Skibina A. A., Bokov D. O., Gravel I. V., Ermakova V. A., Samylin I. A. HPLC-analysis of phenolic complex in pectoral species № 4 and it's dry extract. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2019;8(2):98–102. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-98-102.
- Kaukhova I. E., Weinstein V. A., Burakova M. A., Aroyan M. V., Novikova E. K. Methods of extraction of medicinal vegetable raw materials in phytosubstances technology. *Advances in Biological Sciences Research. Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences*. 2019;7:140–142. DOI: 10.2991/isils-19.2019.32.
- Demidova O. A., Arhipov V. V., Zhuravleva M. V., Aleksandrova T. V., Aleksandrov A. A. Bezopasnost' lekarstvennykh rastitel'nykh preparatov: kliniko-farmakologicheskie aspekty. *Bezopasnost' i risk farmakoterapii*. 2020;8(4):165–177. (In Russ.) DOI: 10.30895/2312-7821-2020-8-4-165-177 1CC.
- Kaukhova I. E., Novikova E. K., Chachin D. A. Development of conditions for the extraction of a series of *Bidens tripartita* herba, *Solidago canadensis* herba, *Agrimonia eupatoria* herba. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;3:64–67. (In Russ.)
- Belokurov S. S., Narkevich I. A., Flisyuk E. V., Kaukhova I. E., Aroyan M. V. Modern extraction methods for medicinal plant raw material (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2019;53(6):559–563. DOI: 10.1007/s11094-019-02037-5.
- Bryda O., Stadnytska N. Extraction methods of extractive substances from medicinal plant raw materials: Advantages and limitations. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*. 2021;25(5):1737–1751.
- Hashemi S. M. B., Khaneghah A. M., Koubaa M., Barba F. J., Abedi E., Niakousari M., Tavakoli J. Extraction of essential oil from *Aloysia citriodora* Palau leaves using continuous and pulsed ultrasound: Kinetics, antioxidant activity and antimicrobial properties. *Process Biochemistry*. 2018;65:197–204. DOI: 10.1016/j.procbio.2017.10.020.
- Al-Snafi A. E. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus officinalis* – A review. *Journal of Pharmacy*. 2020;10(1):26–36.
- Mirzaei S. Z., Lashgarian H. E., Karkhane M. Bio-inspired silver selenide nano-chalcogens using aqueous extract of *Melilotus officinalis* with biological activities. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021;8:56–63. DOI: 10.1186/s40643-021-00412-3.
- Liu Y.-T., Gong P.-H., Xiao F.-Q., Shao S., Zhao D.-Q., Yan M.-M., Yang X.-W. Chemical constituents and antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activities of *Melilotus officinalis* (Linn.) Pall. *Molecules*. 2018;23(2):271. DOI: 27110.3390/molecules23020271.
- Aroyan M. V. *Issledovaniya po vyboru osnovy dlya gelya na osnove sukhogo ekstrakta donnika lekarstvennogo. Sbornik materialov konferentsii «Molodaya farmatsiya – potentsial budushchego»* [Research on the choice of a base for a gel based on a dry extract *Melilotus officinalis* L. Collection of materials of the conference "Young Pharmacy-the potential of the future"]; 2019 April 22–23. St. Petersburg: SPCPU Publishing house; 2019. 922 p. (In Russ.)

Таблица 1. Количественное содержание кумарина в сухом экстракте донника лекарственного

Table 1. Quantitative content of coumarin in the dry extract of *Melilotus officinalis* L.

Наименование вещества Ingredient name	\bar{t}_{cr} , мин \bar{t}_{cr} , min	\bar{t}_x , мин \bar{t}_x , min	\bar{S}_{cr} , mV/c	S_x , mV/c	Содержание вещества в сухом экстракте, % Substance content in the dry extract, %	Метрологическая характеристика результатов Metrological characteristics of the results
Кумарин Coumarin	19,393	19,417	914281	648886 642695 639902	0,647 0,641 0,638 $X = 0,642 \pm 0,007$	$S^2 = 0,00014$ $S = 0,011$ $\bar{S}_x = 0,0089$ $\varepsilon, \% = 1,19$