



Разработка и валидация ВЭЖХ-методики количественного определения кумарина в бобах тонка

В. С. Шуракова✉, Е. С. Сурбеева, С. В. Стрелков, И. И. Тернинко

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России). 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литера А

✉ **Контактное лицо:** Шуракова Валерия Сергеевна. **E-mail:** valeriya.shurakova@spcru.ru

ORCID: В. С. Шуракова – <https://orcid.org/0009-0001-9938-1549>;

Е. С. Сурбеева – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>;

С. В. Стрелков – <https://orcid.org/0000-0002-7977-1080>;

И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 26.08.2025

Статья принята в печать: 28.10.2025

Статья опубликована: 31.10.2025

Резюме

Введение. Бобы тонка (семена *Dipteryx odorata*, семейство *Fabaceae*) – ценный источник кумарина, применяемого в пищевой, парфюмерной и косметической промышленности благодаря насыщенному аромату. Несмотря на фармакологическую ценность (антикоагулянтная, антиоксидантная активность), кумарин обладает доказанной гепато- и гематотоксичностью, что ограничивает его использование в ряде стран. Несмотря на контроль синтетического кумарина в ароматизаторах, природный аналог из бобов тонка не имеет четких нормативов, хотя обладает идентичной активностью. Рост спроса на натуральные продукты повысил популярность бобов тонка, однако недостаток научных данных об их безопасности и методах анализа затрудняет контроль качества. Разработка валидированных методик анализа с использованием метода ВЭЖХ – актуальная задача для обеспечения безопасности его применения в промышленности.

Цель. Разработка ВЭЖХ-методики количественного определения кумарина в бобах тонка и ее валидация с дальнейшей апробацией на нескольких партиях исследуемого объекта.

Материалы и методы. В качестве объектов исследования были использованы пять партий бобов тонка различных стран-производителей. Условия хроматографирования: колонка Luna C18(100) Å LC Column, 250 × 4,6 мм, 5 мкм, температура термостата – 40 °С, длина волны детекции – 275 нм, ПФ А – ацетонитрил, ПФ Б – вода. Режим элюирования: изократика (ПФ Б – 50 %) в течение 12 мин.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика валидна по показателям пригодности хроматографической системы, специфичности, линейности (диапазон 0,001–0,1 мг/мл) и прецизионности. Ее преимущества – экспрессность и экономичность, что упрощает контроль качества сырья. Количественное содержание кумарина в исследуемых объектах варьируется в диапазоне от 1,25 ± 0,07 % до 4,29 ± 0,12 %, что коррелирует с данными зарубежных исследователей.

Заключение. Разработана и валидирована ВЭЖХ-методика для количественного определения кумарина в бобах тонка. Разработанная методика может быть использована для стандартизации и рутинного анализа этого перспективного сырья в различных отраслях промышленности, обеспечивая необходимый уровень безопасности при его применении.

Ключевые слова: кумарин, бобы тонка, ВЭЖХ-методика, валидация, количественное определение

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

Вклад авторов. В. С. Шуракова – литературный поиск, планирование и выполнение экспериментальной работы, получение и обработка данных, формулирование выводов и написание статьи. Е. С. Сурбеева – выполнение экспериментальной работы, получение и обработка данных. С. В. Стрелков – редактирование рукописи. И. И. Тернинко – идея и планирование дизайна эксперимента, редактирование рукописи.

Финансирование. Анализ выполнен на базе центра коллективного пользования (ЦКП) «Аналитический центр» ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России.

Для цитирования: Шуракова В.С., Сурбеева Е.С., Стрелков С.В., Тернинко И.И. Разработка и валидация ВЭЖХ-методики количественного определения кумарина в бобах тонка. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(4). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2170>

Development and validation of a HPLC-method for the quantitative determination of coumarin in tonka beans

Valeriya S. Shurakova✉, Elizaveta S. Surbeeva, Stanislav V. Strelkov, Inna I. Terninko

Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. 14A, Prof. Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ **Corresponding author:** Valeriya S. Shurakova. **E-mail:** valeriya.shurakova@spcpcu.ru

ORCID: Valeriya S. Shurakova – <https://orcid.org/0009-0001-9938-1549>;

Elizaveta S. Surbeeva – <https://orcid.org/0000-0002-7005-2477>;

Stanislav V. Strelkov – <https://orcid.org/0000-0002-7977-1080>;

Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 26.08.2025

Accepted: 28.10.2025

Published: 31.10.2025

Abstract

Introduction. The tonka beans (seeds of *Dipteryx odorata*, family *Fabaceae*) is a valuable source of coumarin used in the food, perfume and cosmetic industries thanks to its rich aroma. Despite its pharmacological value (anticoagulant, antioxidant activity), coumarin has a proven hepatotoxicity and haematotoxicity, which limits its use in a number of countries. Despite the control of synthetic coumarin in aromatics, the natural analog of tunica beans does not have clear rules, although it has identical activity. Growing demand for organic products has increased the popularity of tonka beans, but lack of scientific data on their safety and methods of analysis makes quality control difficult. The development of validated techniques, such as HVACR, is an urgent task to ensure the safety of its application in industry.

Aim. Development of a HPLC-method for the quantitative determination of coumarin in beans and its validation with further testing on several batches of the studied object.

Materials and methods. Five batches of Tonka beans from different producing countries were purchased as research objects, for sample preparation was used US-bath. Chromatography conditions: Luna 5 μm C18(100) Å LC Column 250 $\times$ 4.6 mm, thermostat temperature – 40 °C, detection wavelength – 275 nm. Mobile phase A – acetonitrile, mobile phase B – water. Elution mode: isocratic mobile phase B – 50 % for 12 minutes.

Results and discussion. The method meets the criteria of suitability of the chromatographic system, specificity, linearity (range 0.001–0.1 mg/ml) and precision. Its advantages are expressiveness and economy, which simplifies the quality control of raw materials. The quantitative content of coumarin in the studied object ranges from $1.25 \pm 0.07\%$ to $4.29 \pm 0.12\%$.

Conclusion. Developed and validated by HPLC-methodology for the quantitative determination of coumarin in tonka beans. The developed methodology can be used to standardize this promising raw material in various industries, ensuring the necessary level of safety in its application.

Keywords: coumarin, beans thin, HPLC-method, validation, quantitative determination

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. Valeriya S. Shurakova – literature search, planning and execution of experimental work, data collection and processing, formulation of conclusions and writing of the article. Elizaveta S. Surbeeva – execution of experimental work, data collection and processing. Stanislav V. Strelkov – editing of manuscripts. Inna I. Terninko – the idea and planning of the design of the experiment, editing of manuscripts.

Funding. The analysis was carried out on the basis of the Collective Use Center (CUC) "Analytical Center" of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education (SPCPU) of the Ministry of Health of Russia.

For citation: Shurakova V. S., Surbeeva E. S., Strelkov S. V., Terninko I. I. Development and validation of a HPLC-method for the quantitative determination of coumarin in tonka beans. *Drug development & registration*. 2025;14(4). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2170>

ВВЕДЕНИЕ

Бобы тонка – семена тропического дерева *Dipteryx odorata* семейства бобовых (*Fabaceae*), ареал произрастания которого ограничен Южной Америкой,

преимущественно территорией Бразилии и Венесуэлы [1]. Бобы известны своим уникальным ароматом, что обуславливает их широкую популярность в пищевой промышленности, парфюмерии и косметике в качестве натурального усилителя вкуса и аромата [2].

Специфический аромат бобов тонка обусловлен накоплением значительного количества кумарина (2–4,3 % в сырье, до 20,9 % в экстрактах в зависимости от метода извлечения [1, 3, 4]), который, с одной стороны, проявляет таргетную фармакологическую активность – антикоагулянтную [5], противовоспалительную [6], антиоксидантную [7], что находит применение в фармакотерапии отдельных патологий («Варфарин», таблетки 2,5 мг, ООО «ОЗОН»; «Аммифурин», таблетки 20 мг и раствор для наружного применения 0,3 % – флаконы по 25, 50 и 100 мл, АО «Фармцентр ВИЛАР»¹), а с другой – характеризуется доказанным профилем токсичности в отношении системы кровообращения и печени [8, 9], что ограничивает его неконтролируемое использование в качестве ароматизатора законодательством ряда стран [10, 11]. ГОСТ 32049-2013 «Ароматизаторы пищевые. Общие технические условия»² регламентирует контроль кумарина в качестве синтетической пищевой добавки, однако контроль содержания природного соединения в растительных пищевых продуктах не урегулирован в нормативно-правовом поле.

В последние годы растет запрос потребителей на натуральность. Так, в 2023 году сегмент косметики для ухода за кожей показал рост на 15 %, достигнув объема в 380 миллиардов рублей, в свою очередь, доля экокосметики составила около 20 %, что на 5 % больше, чем годом ранее [12]. К товарам с натуральным составом относятся с большим доверием. Исследование Центра макроэкономического анализа и регионального прогнозирования Россельхозбанка показало, что в первом квартале 2024 года спрос на косметику из натуральных компонентов вырос на 47 % по сравнению с аналогичным периодом 2023 года [13]. Поэтому использование натуральных и безопасных ароматизаторов и добавок стало более востребованным не только в косметической, но и в других отраслях промышленности (ликеро-водочной, пищевой).

Бобы тонка набирают популярность среди потребителей, однако в отечественной научной литературе наблюдается дефицит публикаций по анализу и оценке безопасности использования данной добавки в различных продуктах.

Недостаток научного материала о содержании кумарина в бобах тонка ограничивает возможности контроля их качества и безопасности на рынке пищевых, косметических и парфюмерных товаров. Следовательно, детальное изучение этого направления представляется важным элементом обеспечения безопасности и качества натуральных ароматизаторов.

¹ Государственный реестр лекарственных средств. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>. Ссылка активна на 21.07.2025.

² ГОСТ 32049-2013. Ароматизаторы пищевые. Общие технические условия. Доступно по: <https://gostassistant.ru/doc/66589bfb-ad5d-4395-b71c-63e411e20438>. Ссылка активна на 07.06.2024.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) – один из наиболее эффективных методов анализа кумаринов, обеспечивающий высокую точность и селективность, что особенно важно при работе с продуктами, содержащими сложные природные матрицы и компоненты [14]. В литературе есть данные по определению количественного содержания кумарина в бобах тонка методом ВЭЖХ [1, 3, 4]. В представленных методиках используются преимущественно градиентные условия элюирования и растворы кислот в качестве подвижных фаз, кроме того аналитические условия отличаются длительным временем записи хроматограмм.

Исходя из вышесказанного, **целью данной работы** является разработка ВЭЖХ-методики количественного определения кумарина в бобах тонка и ее последующая валидация с дальнейшей апробацией на нескольких партиях исследуемого объекта.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования были использованы 5 партий бобов тонка, которые приобретали на маркетплейсах в онлайн-маркете у нескольких поставщиков. Обобщенная информация по приобретенным образцам представлена в таблице 1. Ботаническую идентификацию проводили по комплексу морфологических признаков с использованием специалистов Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН.

Для количественного определения производных кумарина использовали метод ВЭЖХ. Испытания проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XV, ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография»³. Исследование проводили с использованием системы высокоэффективного жидкостного хроматографа LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором на колонке Luna C18(2) 100 Å, 250 × 4,6 мм, 5 мкм. Рабочая длина волны – 275 нм.

Испытуемый раствор (ИР): 0,3 г бобов тонка (т.н.) помещали в колбу, добавляли 50 мл метанола и помещали в УЗ-баню (ООО «Сапфир», Россия). Экстракцию проводили при температуре 50 °С в течение 60 мин. Условия были подобраны в ходе разработки оптимальной пробоподготовки на индикаторном объекте [15]. После завершения экстракции полученный раствор фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводили объем до метки метанолом. 1,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводили до метки растворителем пробы (РП – 1 : 1 ацетонитрил – вода).

³ Государственная фармакопея РФ XV, ОФС.1.2.1.2.0005 «Высокоэффективная жидкостная хроматография». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/vysokoeffektivnaya-zhidkostnaya-khromatografiya/>. Ссылка активна на 07.06.2024.

Таблица 1. Объекты исследования

Table 1. Objects of research

Поставщик Provider	Страна-производитель Producing country	Наименование продукта Product name	Дата производства Production date	Присвоенный номер образца Claim number
Vanilla Lab	Венесуэла Venezuela	Бобы тонка целые, специи, 10 г Whole tonka beans, spices, 10 g	05.2024	0524
Kingsvanilla	Бразилия Brazil	Молотые бобы тонка, 10 г Ground tonka beans, 10 g	02.2025	0225
Kingsvanilla	Венесуэла Venezuela	Бобы тонка, натуральный ароматиза- тор для выпечки, 10 г Tonka Beans, Natural Baking Flavor, 10 g	04.2025	0425
TopVanille	Франция France	Бобы тонка Premium, 10 г Premium Tonka Beans, 10 g	05.2025	0525
Punto di Gusto	Франция France	Бобы тонка, ароматизатор пищевой натуральный кондитерский для вы- печки десертов, 25 г Tonka beans, natural food flavoring for baking desserts, 25 g	07.2025	0725

Раствор стандартного образца (СО): для анали-
за использовался СО кумарина (TRC Canada, $P = 99\%$,
валидный на дату проведения испытаний). Около
10 мг кумарина (точная навеска) помещали в мерную
колбу вместимостью 50 мл и доводили до метки ме-
танолом (раствор А – концентрация 0,2 мг/мл). Далее
готовили серию стандартных растворов с различны-
ми концентрациями (таблица 2).

Таблица 2. Схема приготовления
стандартных растворов для проведения
разработки методики

Table 2. Scheme of preparation of standard solutions
for the development of methodology

Объем аликвоты (наименование раствора) Aliquot volume (name of solution)	Объем мерной колбы Measuring flask volume	Концентрация полученного раствора (наименование раствора) Concentration of the resulting solution (name of the solution)
5,0 мл раствора А 5.0 ml of solution A	10 мл 10 ml	0,1 мг/мл (раствор Б) 0.1 mg/ml (solution B)
5,0 мл раствора Б 5.0 ml of solution B	10 мл 10 ml	0,05 мг/мл (раствор В) 0.05 mg/ml (solution C)
1,0 мл раствора Б 1.0 ml of solution B	10 мл 10 ml	0,01 мг/мл (раствор Г) 0.01 mg/ml (solution D)
1,0 мл раствора В 1.0 ml of solution C	10 мл 10 ml	0,005 мг/мл (раствор Д) 0.005 mg/ml (solution E)
1,0 мл раствора Г 1.0 ml of solution D	10 мл 10 ml	0,001 мг/мл (раствор Е) 0.001 mg/ml (solution F)

Растворы Б, В, Г, Д, Е использовали для оцен-
ки параметра «линейность» при валидации мето-
дики как ключевого показателя возможности при-
менения методики на практике [16]. Раствор Г
использовали для проверки пригодности хроматог-

рафической системы и расчета количественного
содержания кумарина в образце для оценки пара-
метра «прецизионность».

Условия хроматографирования: объем пробы –
20 мкл. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин,
температура термостата колонки – 40 °С. Детектор
диодно-матричный, длина волны детекции – 275 нм.
В качестве подвижной фазы (ПФ) использовали аце-
тонитрил (элюент А) и воду для хроматографии
(элюент Б). Режим элюирования изократичный при
ПФ Б 50 % в течение 12 мин, так как это время опти-
мально для выхода исследуемого вещества. Инъекти-
ровали растворы СО по 5 раз для проверки пригод-
ности хроматографической системы, для специфич-
ности, для прецизионности (для каждого параметра),
ИР – 5 раз для специфичности, 6 раз для прецизион-
ности; растворитель пробы инжесктировали 3 раза.

Содержание кумарина в бобах тонка (%) опреде-
ляли по формуле:

$$X(\%) = \frac{S_x \cdot a_o \cdot P \cdot 50 \cdot 10 \cdot 5 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{S_o \cdot a \cdot 1 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 10 \cdot 100 \cdot (100 - W)} = \frac{S_x \cdot a_o \cdot P \cdot 50}{S_o \cdot a \cdot (100 - W)},$$

где S_x – площадь пика кумарина в испытуемом рас-
творе; a_o – масса навески СО кумарина, мг; S_o – пло-
щадь пика кумарина в растворе СО; a – масса навес-
ки сырья, мг; P – содержание кумарина в СО, %; W –
влажность сырья, %.

Для подтверждения достоверности предложен-
ной методики проводили ее валидацию в соответст-
вии с ГФ РФ XV, ОФС.1.1.0012 «Валидация аналити-
ческих методик»¹, по следующим параметрам: про-

¹ Государственная фармакопея РФ. ОФС.1.1.0012 «Ва-
лидация аналитических методик». Доступно по: [https://
pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/
validatsiya-analiticheskikh-metodik/](https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/) Ссылка активна на
07.06.2024.

верке пригодности хроматографической системы (ППХС) (в соответствии с ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография»¹), специфичности, линейности, правильности, сходимости (доверительный интервал правильности отдельного определения), аналитической области.

Расчет основных статистических характеристик проводили, руководствуясь указаниями ГФ РФ, ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний»².

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ППХС: результаты оценки пригодности системы представлены в таблице 3. Хроматограмма раствора СО кумарина представлена на рисунке 1.

Таблица 3. Результаты хроматографирования раствора СО кумарина

Table 3. Results of chromatography coumarin’s reference solution

Наименование раствора Name of solution	t _R	S	N	As
СО кумарина – 1 Standard sample of coumarin – 1	5,48	878823	15945	1,14
СО кумарина – 2 Standard sample of coumarin – 2	5,46	889654	16428	1,14
СО кумарина – 3 Standard sample of coumarin – 3	5,45	882425	16120	1,14
СО кумарина – 4 Standard sample of coumarin – 4	5,41	899730	16484	1,14
СО кумарина – 5 Standard sample of coumarin – 5	5,42	917694	16299	1,14
Среднее значение Average value	5,44	893665	16255	1,14
Стандартное отклонение Standard Deviation	0,026	13,98		
RSD, %	0,47	1,56		

¹ Государственная фармакопея РФ. ОФС.1.2.1.2.0001 «Хроматография». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-2/1-2-1/1-2-1-2-khromatograficheskie-metody-analiza/khromatografiya/> Ссылка активна на 07.06.2024.

² Государственная фармакопея РФ. ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-fizicheskikh-fiziko-khimicheskikh-i-khimicheskikh-ispytaniy/> Ссылка активна на 07.06.2024.

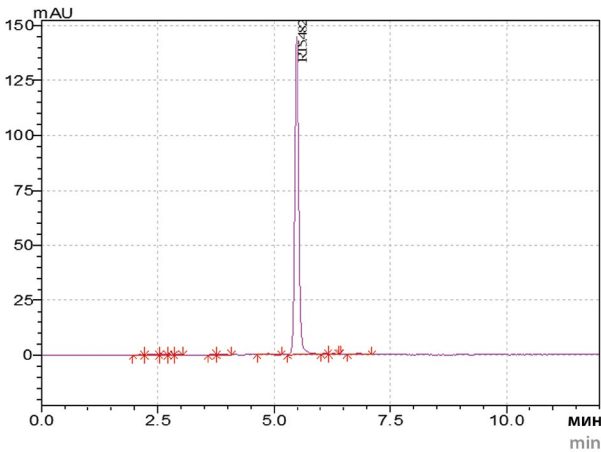


Рисунок 1. Хроматограмма раствора СО кумарина
Figure 1. Chromatogram of reference solution coumarin

Как видно из данных таблицы, хроматографическая система является пригодной: эффективность хроматографической колонки (N) – не менее 5000 теоретических тарелок; факторы асимметрии (As) пиков СО – не менее 0,8 и не более 1,5; относительное стандартное отклонение значений времен удерживания и площадей пиков СО кумаринов – не более 2 % (n ≥ 5).

Специфичность методики подтверждали с целью определения точности и селективности измерений кумарина в присутствии сопутствующих компонентов растительной матрицы.

Значения времен удерживания кумарина в испытуемом и стандартном растворе представлены в таблице 4. Рисунки УФ-спектров пиков кумарина в испытуемом и стандартном растворах представлены на рисунке 2. Хроматограмма растворителя представлена на рисунке 3.

Таблица 4. Времена удерживания пика кумарина в растворе стандартного и испытуемого образца

Table 4. Coumarin peak retention times in solution of standard and test sample

№ раствора Number of solution	t _R	
	раствор стандартного образца standard sample solution	раствор испытуемого образца test sample solution
1	5,48	5,44
2	5,46	5,44
3	5,45	5,45
4	5,41	5,44
5	5,42	5,44
$\bar{X}$	5,44	5,44
SD	0,026	0,040
RSD, %	0,47	0,07

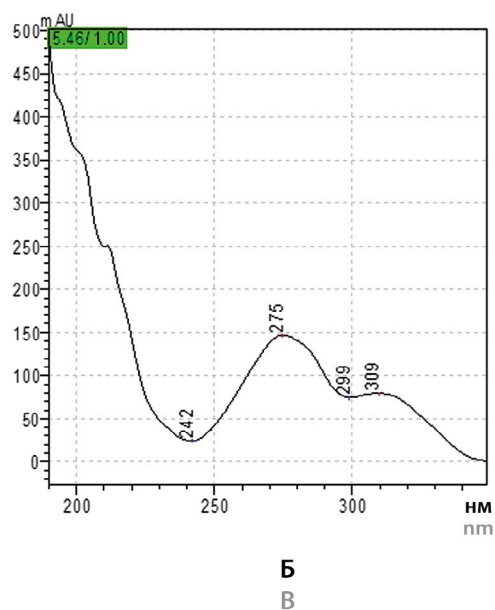
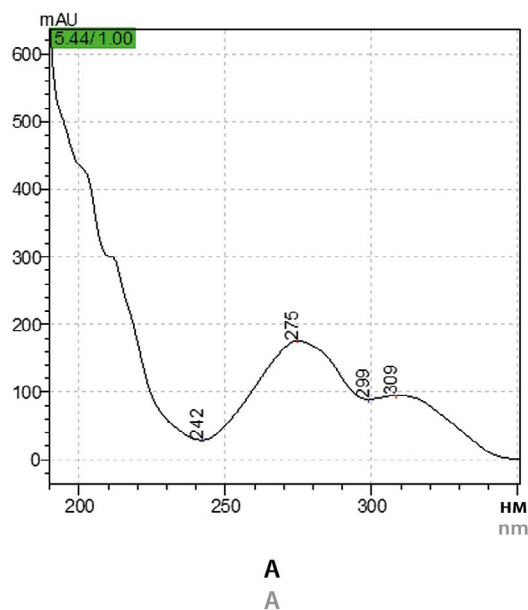


Рисунок 2. УФ-спектры пика кумарина в растворе СО (а) и в испытуемом растворе (б)

Figure 2. UV spectrum of coumarins peaks in reference solution (a) and in the test solution (b)

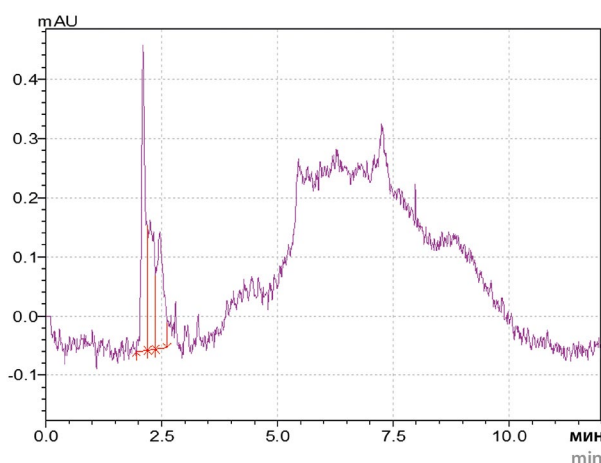


Рисунок 3. Хроматограмма растворителя пробы

Figure 3. Sample solvent chromatogram

Как видно из иллюстрационных данных, время на удерживания кумарина в испытуемых и стандартном растворах статистически достоверно совпадают. УФ-спектры пика кумарина в испытуемых и стандартных растворах имеют аналогичные максимум и минимум поглощения (275 и 242 нм соответственно). На

хроматограмме растворителя пробы отсутствуют пики с временем удерживания кумарина. RSD времен удерживания пиков кумарина в стандартном и в испытуемом растворах составляет 0,47 и 0,074 % соответственно, что менее 2 %. Следовательно, методика специфична.

Линейность: результаты оценки линейности представлены на рисунке 4 и в таблице 5.

Высокий коэффициент детерминации ($R^2 = 0,9957$) и коэффициент корреляции ($r = 0,9978$) подтверждают линейную зависимость между концентрацией растворов и площадью пиков, однако значительные стандартные отклонения и погрешности указывают на высокую неопределенность оценок параметров. Следовательно, аналитическая методика линейна, но применима только в исследуемом диапазоне концентраций.

Правильность: для исследования правильности готовили испытуемые растворы, содержащие 80, 100 и 120 % от концентрации кумарина, установленной в анализируемом объекте – бобах тонка – в качестве номинальной (2,38 %). Для приготовления 80 и 120 % растворов брали аликвоты 0,8 и 1,2 исходного раствора испытуемого образца соответственно. Результаты оценки правильности представлены в таблице 6.

Таблица 5. Результаты оценки линейности

Table 5. Results of linearity assessment

<i>f</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>Sa</i>	<i>Sb</i>	<i>t(P, f)</i>	Δa	Δb	<i>r</i>
3	347229	187722271	364691	$7,12 \cdot 10^6$	3,18	1159717	$2,26 \cdot 10^7$	0,9978

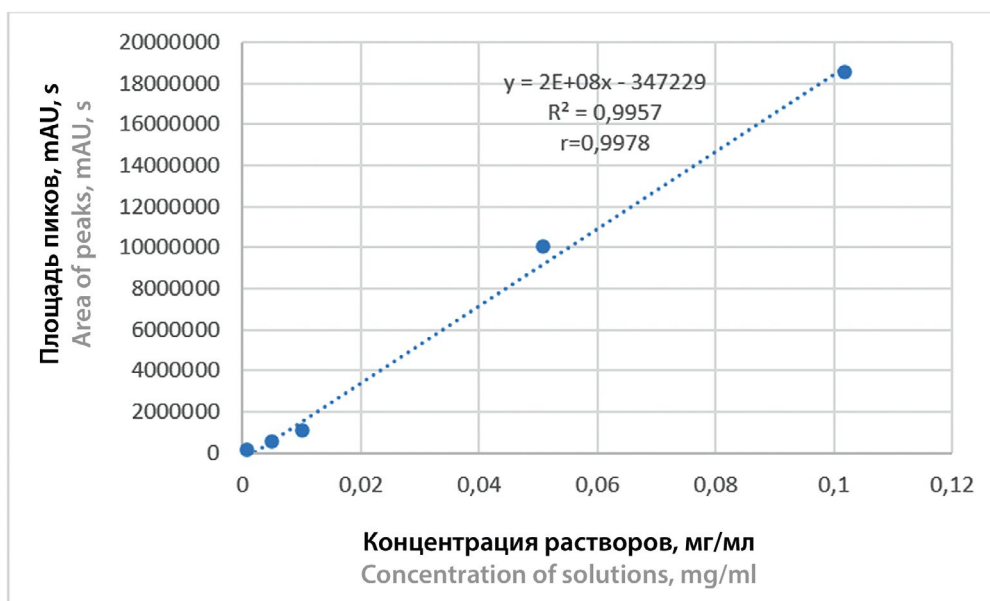


Рисунок 4. График зависимости площади пика от концентрации кумарина в нормализованных координатах

Figure 4. Graph of the dependence of the peak area on the concentration of coumarin in normalized coordinates

Таблица 6. Результаты оценки правильности

Table 6. Correctness assessment results

Введенное значение, % Entered value, %	Измеренное значение, % Measured value, %	Z (открываемость) Z (openability)	$\frac{ Z - Z_{cp} }{ Z - Z_{avg} }$
1,90	1,87	98,42	1,25
1,90	1,93	101,58	1,91
1,90	1,88	98,95	0,72
2,38	2,34	98,32	1,35
2,38	2,41	101,26	1,59
2,38	2,37	99,58	0,09
2,86	2,81	98,25	1,42
2,86	2,91	101,75	2,08
2,86	2,83	98,95	0,72
Z_{cp} Z_{avg}		99,67	
Доверительный интервал Confidence interval		2,24	
RSD, %		1,46	
$\frac{ 100 - Z_{cp} }{ 100 - Z_{avg} }$		0,33	

Как видно из данных таблицы, значения открываемости находятся в диапазоне от 98 до 102 %, полученные значения находятся внутри доверительного интервала, RSD менее 2,0 %, что говорит об отсутствии систематической ошибки методики.

Прецизионность оценивали на двух уровнях – сходимость и внутрилабораторная прецизионность. Результаты представлены в таблице 7.

Таблица 7. Результаты оценки сходимости и внутрилабораторной прецизионности

Table 7. Results of the assessment of convergence and intra-sampling precision

Измерение Measurement	Значения химика 1, % Chemist 1 values, %	Значения химика 2, % Chemist 2 values, %
1	2,24	2,22
2	2,51	2,52
3	2,31	2,33
4	2,44	2,40
5	2,46	2,45
6	2,32	2,30
$\bar{X}$	2,38	2,37
SD	0,11	0,10
RSD, %	4,4	4,6
$F_x < F_{tabl} (5,05)$	1,34	
$T_x < t_{tabl} (2,23)$	0,15	

Как видно из данных таблицы, RSD измерений химиков составило 4,4 и 4,6 %. Исходя из того, что в ходе проверки пригодности хроматографической системы значение RSD площади пика СО кумарина составило менее 2,0 %, повышенный RSD измерений может быть обусловлен природой объекта и сложностью растительной матрицы. Выборки сходимы, и их средние значения статистически достоверно не отличаются друг от друга. Накопление действующих веществ в растительных объектах неоднородно и может отличаться, что, вероятно, приводит к увеличению погрешности измерений. В связи с этим порог RSD измерений методики был установлен на уровне 5,0 %. Значение критерия Фишера по результатам измерений двух химиков составило 1,34 (что менее табличного значения 5,05), а критерия Стьюдента – 0,15 (табличное значение 2,23).

Аналитическая область: диапазон концентраций кумарина, в пределах которого методика обеспечивает требуемую линейность, правильность и прецизионность, составляет от 0,001 мг/мл до 0,1 мг/мл. Это следует из соответствия показателей «линейность», «правильность» и «прецизионность» предписанным требованиям в пределах данных концентраций.

Для апробации предложенной аналитической методики было определено содержание кумарина в 5 различных партиях бобов тонка. Хроматограмма испытуемого извлечения (репрезентативная) из бобов тонка представлена на рисунке 5. Результаты определения количественного содержания кумарина в различных партиях приведены в таблице 8.

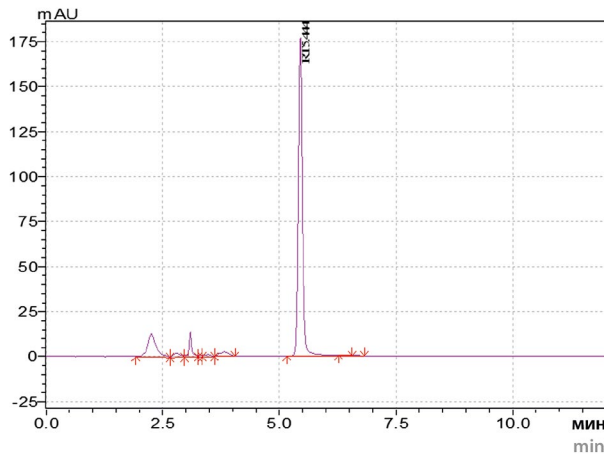


Рисунок 5. Хроматограмма испытуемого образца бобов тонка

Figure 5. Chromatogram of test sample of tonka beans

В ходе анализа было установлено, что содержание кумарина в изученных образцах составляет от $1,25 \pm 0,07$ % до $4,29 \pm 0,12$ %, что коррелирует с за-

рубежными исследованиями [1, 3, 4, 17], в которых отмечается, что уровень кумарина в исследуемых объектах находится в диапазоне от 2 до 4,3 %. При этом необходимо отметить, что не прослеживается зависимость между странами происхождения и партией сырья, номер которой, видимо, указывает на срок заготовки. Но при этом можно констатировать, что наименьшее содержание кумарина наблюдается в образце венесуэльского происхождения, однако для формулирования однозначного вывода о зависимости накопления кумарина от страны происхождения необходимо увеличить выборку сырья из данного региона.

Таблица 8. Результаты определения количественного содержания кумарина

Table 8. Results of quantitation of coumarin

Номер образца бобов тонка Tonka beans sample number	Количественное содержание кумарина, % Quantity of coumarin, %
0524	$2,38 \pm 0,11$
0225	$1,25 \pm 0,07$
0425	$2,95 \pm 0,07$
0525	$4,29 \pm 0,12$
0725	$3,01 \pm 0,11$

Предложенная методика показала воспроизводимость и способность давать достоверные результаты. Преимуществами методики являются ее экспрессность и ресурсосберегаемость, что позволит установить предел нормирования содержания кумарина в исходном сырье и проводить направленную оценку качества для обеспечения безопасности как сырья, так и продуктов на его основе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка стандартизированных методик количественного определения кумарина в бобах тонка крайне актуальна в связи с их широким применением в пищевой, парфюмерной и косметической промышленности, отсутствием нормативного регулирования для потенциально токсичного соединения растительного происхождения и растущим спросом на натуральные продукты.

Была разработана и валидирована методика количественного определения кумарина в бобах тонка. Предложенная методика основывается на методе ВЭЖХ и отличается экспрессностью (время записи хроматограммы – 12 мин), доступностью реагентов и быстротой пробоподготовки, что дает возможность использовать ее в рутинном анализе.

По результатам валидационных испытаний можно сделать вывод, что методика специфична, так как RSD времени удерживания пика кумарина для испы-

туемого и стандартного образцов менее 2,0 %, что говорит о стабильности хроматографического пика и подтверждает отсутствие матричного влияния и селективность метода. Коэффициент корреляции ($r > 0,99$) свидетельствует о линейной зависимости в рабочем диапазоне концентраций, что доказывает пригодность методики для количественного анализа. Значение RSD 4,4 % при оценке сходимости методики указывает на приемлемую повторяемость ввиду природы исследуемого объекта, что является допустимым значением. Значение RSD 1,5 % при оценке правильности указывает на высокую точность методики, а внутрилабораторная прецизионность подтверждает, что методика воспроизводима.

ЛИТЕРАТУРА

- Cuchet A., Jame P., Anchisi A., Schiets F., Carénini E., Casabianca H. Authentication of Tonka beans extracts (*Dipteryx odorata*) using LC-UV/MS, GC-MS and multi element (^{13}C , ^2H and ^{18}O) bulk specific isotope analysis. *Industrial Crops and Products*. 2024;209:118038. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.118038.
- Heghes S. C., Vostinaru O., Mogosan C., Iuga C. A., Filip L. Safety profile of nutraceuticals rich in coumarins: An update. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:803338. DOI: 10.3389/fphar.2022.803338.
- Toma A. C., Stegmüller S., Richling E. Coumarin contents of tonka (*Dipteryx odorata*) products. *European Food Research and Technology*. 2025;251(4):513–517. DOI: 10.1007/s00217-024-04570-2.
- Doctor N., Parker G., Vang K., Smith M., Kayan B., Yang Y. Stability and Extraction of Vanillin and Coumarin under Subcritical Water Conditions. *Molecules*. 2020;25(5):1061. DOI: 10.3390/molecules25051061.
- Gao L., Wang F., Chen Y., Li F., Han B., Liu D. The antithrombotic activity of natural and synthetic coumarins. *Fitoterapia*. 2021;154:104947. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.104947.
- Thakur A., Singla R., Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;101:476–495. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.07.010.
- Todorov L., Saso L., Kostova I. Antioxidant activity of coumarins and their metal complexes. *Pharmaceuticals*. 2023;16(5):651. DOI: 10.3390/ph16050651.
- Guo P. J., Zhao Y. N., Li J., Liu S. H., Wang Y. L., Wang C. Y. Toxicological research and safety consideration of coumarins. *Zhongguo Zhong yao za zhi = China Journal of Chinese Materia Medica*. 2020;45(3):518–522. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20191014.401.
- Sharifi-Rad J., Cruz-Martins N., López-Jornet P., Pons-Fuster López E., Harun N., Yeskaliyeva B., Beyatli A., Sytar O., Shaheen S., Sharopov F., Taheri Y., Docea A. O., Calina D., Cho W. C. Natural coumarins: exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:6492346. DOI: 10.1155/2021/6492346.
- Zughaib M. Do cinnamon supplements cause acute hepatitis? *American Journal of Case Reports*. 2015;16:250–254. DOI: 10.12659/AJCR.892804.

- Aspatwar A., Berrino E., Bua S., Carta F., Capasso C., Parkkila S., Supuran C. T. Toxicity evaluation of sulfamides and coumarins that efficiently inhibit human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020;35(1):1765–1772. DOI: 10.1080/14756366.2020.1822829.
- Хацаюк А. С., Павлова О. Е., Эхова М. Э. Роль и значение высокоэффективной жидкостной хроматографии в практике высокотехнологичных лабораторных исследований. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2016;3(66):215–219. DOI: 10.18411/hmes.d-2016-146.
- Шуракова В. С., Сурбеева Е. С. Разработка способа пробоподготовки растительного сырья, содержащего кумарины, для хроматографического анализа. В сб.: XIV Всероссийская научная конференция с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ «Молодая фармация – потенциал будущего». 28 марта – 02 апреля 2024. Санкт-Петербург. СПб.: Изд-во СПХФУ; 2024. С. 675–678.
- Эпштейн Н. А. Валидация аналитических методик: графические и расчетные критерии для оценки линейности методик на практике. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019;8(2):122–130. DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
- Lima J. C., Traczynski M., Giufreda W. M., Feihrmann A. C., Freitas L. S., Cardozo-Filho L. Modifier-Enhanced Supercritical CO₂ Extraction with GRAS Solvents of Coumarin from Cumaru Seeds (*Dipteryx odorata*). *Chemical Engineering Transactions*. 2017;57:301–308. DOI: 10.3303/CET1757301.

REFERENCES

- Cuchet A., Jame P., Anchisi A., Schiets F., Carénini E., Casabianca H. Authentication of Tonka beans extracts (*Dipteryx odorata*) using LC-UV/MS, GC-MS and multi element (^{13}C , ^2H and ^{18}O) bulk specific isotope analysis. *Industrial Crops and Products*. 2024;209:118038. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.118038.
- Heghes S. C., Vostinaru O., Mogosan C., Iuga C. A., Filip L. Safety profile of nutraceuticals rich in coumarins: An update. *Frontiers in Pharmacology*. 2022;13:803338. DOI: 10.3389/fphar.2022.803338.
- Toma A. C., Stegmüller S., Richling E. Coumarin contents of tonka (*Dipteryx odorata*) products. *European Food Research and Technology*. 2025;251(4):513–517. DOI: 10.1007/s00217-024-04570-2.
- Doctor N., Parker G., Vang K., Smith M., Kayan B., Yang Y. Stability and Extraction of Vanillin and Coumarin under Subcritical Water Conditions. *Molecules*. 2020;25(5):1061. DOI: 10.3390/molecules25051061.
- Gao L., Wang F., Chen Y., Li F., Han B., Liu D. The antithrombotic activity of natural and synthetic coumarins. *Fitoterapia*. 2021;154:104947. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.104947.
- Thakur A., Singla R., Jaitak V. Coumarins as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;101:476–495. DOI: 10.1016/j.ejmech.2015.07.010.
- Todorov L., Saso L., Kostova I. Antioxidant activity of coumarins and their metal complexes. *Pharmaceuticals*. 2023;16(5):651. DOI: 10.3390/ph16050651.
- Guo P. J., Zhao Y. N., Li J., Liu S. H., Wang Y. L., Wang C. Y. Toxicological research and safety consideration of

- coumarins. *Zhongguo Zhong yao za zhi = China Journal of Chinese Materia Medica*. 2020;45(3):518–522. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20191014.401.
9. Sharifi-Rad J., Cruz-Martins N., López-Jornet P., Pons-Fuster López E., Harun N., Yeskaliyeva B., Beyatli A., Sytar O., Shaheen S., Sharopov F., Taheri Y., Docea A. O., Calina D., Cho W. C. Natural coumarins: exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021;2021:6492346. DOI: 10.1155/2021/6492346.
 10. Zughaib M. Do cinnamon supplements cause acute hepatitis? *American Journal of Case Reports*. 2015;16:250–254. DOI: 10.12659/AJCR.892804.
 11. Aspatwar A., Berrino E., Bua S., Carta F., Capasso C., Parkkila S., Supuran C. T. Toxicity evaluation of sulfamides and coumarins that efficiently inhibit human carbonic anhydrases. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2020;35(1):1765–1772. DOI: 10.1080/14756366.2020.1822829.
 12. Hatsayuk A. S., Pavlova O. E., Ekhova M. E. Role and importance of high performance liquid chromatography in the practice of high-tech laboratory. *Health. Medical Ecology. Science*. 2016;3(66):215–219. (In Russ.) DOI: 10.18411/hmes.d-2016-146.
 13. Shurakova V. S., Surbeeva E. S. Development of a sample preparation method for plant materials containing coumarins for chromatographic analysis. In: XIV All-Russian Scientific Conference with International Participation of the Youth Scientific Society of St. Petersburg Chemical Federal University "Young Pharmacy – Potential of the Future". March 28 – April 2, 2024. St. Petersburg. St. Petersburg: St. Petersburg Chemical Federal University Publishing House; 2024. P. 675–678. (In Russ.)
 14. Epshtein N. A. Validation of Analytical Procedures: Graphic and Calculated Criteria for Assessment of Methods Linearity in Practice. *Drug development & registration*. 2019;8(2):122–130. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2019-8-2-122-130.
 15. Lima J. C., Traczynski M., Giufrida W. M., Feihrmann A. C., Freitas L. S., Cardozo-Filho L. Modifier-Enhanced Supercritical CO₂ Extraction with GRAS Solvents of Coumarin from Cumaru Seeds (*Dipteryx odorata*). *Chemical Engineering Transactions*. 2017;57:301–308. DOI: 10.3303/CET1757301.