

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВАЛЕРИАНОВОЙ
КИСЛОТЫ В КОРНЯХ ФЕРУЛА СУМБУЛ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**

Аннотация: Корни Ферула сумбул (*Umbelliferae*) имеют характерный мускусный запах и традиционно используются для снятия беспокойства, как успокаивающее средство при истерии и других нервных расстройствах. Настоящее исследование направлено на разработку и валидацию простого, надежного, точного и быстрого аналитического метода с высокоэффективной жидкостной хроматографии для оценки валериановой кислоты в корнях *Ferula sumbul*. Экстракт корней Ферула сумбул готовили путем кипячения порошкообразных корней с метанолом в течение 30 минут. Был разработан и проверен простой метод оценки валериановой кислоты с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с матричным фотодиодным детектором. Оценка проводилась с использованием колонки ВЕН Shield RP, C-18 (2,1×50 мм, 1,7 мкм) с изократным элюированием метанолом и 0,5% фосфорной кислотой (75:25) при скорости потока 0,25 мл/мин и обнаружении при 218 нм. Метод был разработан впервые и является точным с хорошей линейностью ($r^2 > 0,998$). Установлено, что в корнях Ферула сумбул содержится $12,62 \pm 0,074$ мкг/г валериановой кислоты. Разработанный метод может быть избирательно использован для оценки валериановой кислоты в корнях *Ferula sumbul*. Было обнаружено, что все параметры валидации находятся в допустимых пределах, установленных руководящими принципами ICH.

Ключевые слова: ультраэффективная жидкостная хроматография, валериановая кислота, *Ferula sumbul*, валидация.

Род *Ferula* (Umbelliferae) включает 130 видов, распространенных от Средиземноморья до Средней Азии. Этот род хорошо задокументирован как хороший источник биологически активных соединений, таких как кумарины, терпеновые спирты и производные сесквитерпена [1]. Ферула сумбул (син. *F. moschata* Reinsch.), широко известный как сумбул (хинди) или мускусный корень (англ.), состоит из цилиндрических или конических кусочков высушенных корней и корневищ с горьким вкусом и легким мускусным запахом [2]. Он традиционно использовался для снятия беспокойства, как успокаивающее средство при истерии и других нервных расстройствах, а также как мягкий стимулятор желудочно-кишечного тракта. Кумарины и бикумарины, выделенные из этанольного экстракта корней *Ferula sumbul*, проявляют анти-ВИЧ-активность и ингибируют высвобождение цитокинов [3].

Настоящее исследование включает оценку содержания валериановой кислоты в корнях Ферула сумбул с использованием ультраэффективной жидкостной хроматографии (UPLC). ВК является одним из важных компонентов препарата валериана лекарственная [4,5] и в основном отвечает за его анксиолитическую активность. Экстракт его корня веками использовался для лечения тревоги, эпилепсии и нарушений сна. UPLC, производная от хорошо известного аналитического метода, работает по тому же основному принципу, что и высокоэффективная жидкостная хроматография (HPLC), но уменьшенный размер частиц в колонке обеспечивает повышенную чувствительность, лучшее разрешение и более короткое время работы [6,7]. Уже зарекомендовавший себя метод ВЭЖХ для оценки ВА включает сложную систему растворителей для ее количественного определения [8,9]. Описанный здесь метод ВЭЖХ имеет

более короткое время выполнения, потребляет меньше растворителя ВЭЖХ и эталонного стандарта и обеспечивает лучшее разделение и повышенное разрешение.

Корни ферулы сумбул были закуплены у Rym Exports, Мумбаи, Индия. Они были заверены NISCAIR, Нью-Дели, с номером образца ваучера NISCAIR/RHMD/Consult/2014/2483-62-2 от 18.07.2014. Эталонный стандарт ВА был приобретен у Sigma-Aldrich, метанол для ВЭЖХ был получен у Merck Specialties Pvt. Ltd. (Мумбаи, Индия) и воду класса ВЭЖХ получали из системы Millipore (Биллерика, Массачусетс, США).

Точную навеску 1 мг ВК растворяли в метаноле и доводили объем до 10 мл в мерной колбе, получая концентрацию 100 мкг/мл. Его использовали в качестве маточного раствора для дальнейших разбавлений. Грубо измельченные корни Ферула сумбул (2 г) кипятили с обратным холодильником в течение 30 мин с метанолом для ВЭЖХ (20 мл). Полученный экстракт фильтровали через бумажный фильтр Whatmann (№ 10). Остаток промывают метанолом (5 мл), переносят в мерную колбу на 25 мл и доводят объем до концентрации 80 мг/мл. Его фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Раствор образца (0,50 мкл) вводили в систему ВЭЖХ. Весь процесс проводился в трехкратной повторности.

Анализ проводился на системе Waters Acquity UPLC H-Class, оснащенной бинарным насосом, автоматическим пробоотборником, матричным фотодиодным детектором (PDA) и программным обеспечением Empower 2™ (Waters, Милфорд, Массачусетс, США). Аналитический метод был разработан с использованием колонки ВЕН Acquity RP, C-18 (2,1×50 мм, 1,7 мкм, Waters, Милфорд, Массачусетс, США). Подвижная фаза состояла из метанола (растворитель А) и 0,5% фосфорной кислоты (растворитель Б) в соотношении 75:25. Скорость потока устанавливали на 0,25 мл/мин, вводимый объем составлял 0,50 мкл, температуру колонки

поддерживали на уровне 25° с помощью термостата для колонок, детекцию проводили с помощью детектора PDA при 218 нм.

Разработанный метод ВЭЖХ прошел валидацию в соответствии с рекомендациями ICH (Q2 (R1)) с точки зрения линейности, чувствительности, прецизионности, достоверности и надежности исследования [10]. Линейность определяли, используя уровни концентрации, построенные в диапазоне 0,5-2,0 мкг/мл. Калибровочную кривую строили путем построения площади пика в зависимости от концентрации. Коэффициент регрессии, наклон и точка пересечения рассчитывались по калибровочной кривой. Чувствительность метода определяли по пределу обнаружения (LOD, S/N=3) и пределу количественного определения (LOQ, S/N=10). Были введены серийные разведения стандартного раствора, и, таким образом, значения LOD и LOQ были рассчитаны с помощью программного обеспечения пригодности системы UPLC. Повторяемость метода анализировали путем введения разовой концентрации ВА шесть раз (n=6) в течение одних суток. Данные прецизионности выражали в процентах относительного стандартного отклонения (%RSD). Для определения точности метода проводили исследование извлечения путем добавления известного количества индивидуального стандарта при низке (80%), средней (100%) и высокой (120%) концентрации в крупноизмельченный лекарственный препарат и готовили образец, как описано ранее. Полученные таким образом три концентрации анализировали в трех повторностях, и результаты выражали в виде процентного извлечения добавленного стандарта. Надежность метода определяли путем преднамеренного изменения условий хроматографии, таких как изменение скорости потока ($0,25 \pm 0,02$ мл/мин), состава подвижной фазы (75:25 \pm 5) и объема впрыска ($0,5 \pm 0,1$ мкл). Каждый параметр анализировали трижды, и изменения времени удерживания выражали в %RSD по отношению к нормальному времени удерживания.

Оптимальные хроматографические условия были получены на колонке Acquity ВЕН Acquity, RP C-18 и изократическом элюировании с использованием различных соотношений метанол:0,5% водная фосфорная кислота (75:25) в качестве подвижной фазы для разработки метода ВА методом ВЭЖХ. Оптимизированные хроматографические условия привели к хорошо отделенному пику ВА в метанольном экстракте корней Ферула сумбул со стабильной базовой линией.

Валидацию разработанного метода проводили путем построения стандартной кривой ВА. Для стандарта ВА коэффициент корреляции (r^2) оказался равным $\geq 0,998$, что указывает на высокую степень корреляции между выбранными концентрациями и соответствующими площадями пиков, а также указывает на хорошую линейность разработанного метода. Наклон, точка пересечения и коэффициент корреляции для стандарта были определены с помощью регрессионного анализа. LOD для ВА составил 30 нг/мл, а LOQ – 100 нг/мл, что указывает на достаточную чувствительность метода. Было обнаружено, что значения %RSD для исследований повторяемости составляют 0,506%, что соответствует допустимым пределам (≤ 5) в соответствии с рекомендациями ICH. Было обнаружено, что процент восстановления для стандарта ВА находится в диапазоне 99,44-102,02 с $\%RSD \leq 1,311$, что свидетельствует о хорошем восстановлении стандарта. Значения %RSD для всех преднамеренно внесенных изменений в условия ВЭЖХ оказались в допустимых пределах: для расхода 0,038-0,311; для состава подвижной фазы 0,035-0,605; для объема впрыска 0,161-0,395. Для различных учитываемых параметров значения %RSD были менее 5%, что ясно указывает на надежность аналитического метода.

Цель настоящего исследования заключалась в разработке быстрого, точного и надежного аналитического метода для оценки ВА. ВА считается основным компонентом, ответственным за деятельность центральной нервной системы, и официально зарегистрирован как маркерное соединение

[11,12]. Основная цель исследования заключалась в описании метода ВЭЖХ, который можно было бы использовать для количественного определения и стандартизации корней Ферула сумбул. Предлагаемый метод имеет короткое время выполнения 7 мин, с временем удерживания около 3,2 мин. При таком коротком времени анализа и хорошем разрешении этот метод предлагает существенные преимущества по сравнению с ранее описанными методами ВЭЖХ [8] и, следовательно, может быть расширен для аналитических целей.

References

1. ZhumanijazoBA, F.F., Mukumov, I.U., & ShakiroBA, Sh.F. (2020). Rod ferula vo flore Dzhizzakskoj oblasti. Mezhdunarodnyj nauchnyj zhurnal «Vestnik nauki», № 8 (29) T.5, pp.64-75.
2. Gonzalez A, Barrera J. Chemistry and sources of mono- and bicyclic sesquiterpenes from Ferula species. In: Herz W, Kirby GW, Moore RE, Steglich W, Tamm C, editors. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. Vol. 64. New York: SpringerLink; 1995.
3. ZubajdoBA, T.M., et al. (2014). O farmakologicheskom izuchenii raznyh vidov roda feruly v medicine XX veka. Vestnik Tadzhijskogo Nacional'nogo Universiteta. Seriya Estestvennyh Nauk, 1-3, 225-229.
4. The European Pharmacopoeia. Vol. 2. Strasbourg, France: Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of Council of Europe, EDQM; 2011. p. 1269-63.
5. Rizaev, I. I. (2019). The structure of the social system as the basis for the self-organization of society. Scientific Bulletin of Namangan State University, 1(7), 151-156.
6. Cohen, S.G. (1992). Asthma in Antiquity: The Ebers Papyrus - Allergy. Proc. May-June, 13, 3, 147-154.

7. Rizaev, I. I. (2019). Evolutionary mechanisms of self-organization of the social system. *Scientific Bulletin of Namangan State University*, 1(9), 81-86.
8. Mahendra, P., & Bisht, S. (2011). Anti-anxiety activity of *Coriandrum sativum* assessed using different experimental anxiety models - *Indian J. Pharmacol.*, Sep., 43(5), 574-577.
9. Khayitboy, K., & Ilhom, R. (2020). The impact of liberalization on the development of the social system. *International Engineering Journal For Research & Development*, 5(3), 4-4.
10. Zhou P, Takaishi Y, Duan HQ, Chen B, Honda G, Itoh M, et al. Coumarins and bicoumarin from *Ferula sumbul*: antiHIV activity and inhibition of cytokine release. *Phytochemistry* 2000;53:689-97.
11. Fox, P.F., & McSweeney, P.L.H. (2009). *AdBAnced dairy chemistry: Volume 3, lactose, water, salts and minor constituents*, 3rd ed., New York: Springer.
12. Rizaev, I. I. (2019). Evolutionary mechanisms of self-organization of the social system. *Scientific Bulletin of Namangan State University*, 1(9), 81-86.
13. Karin, M., & Lin, A. (2002). NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* V.3, pp. 221-227.
14. Alikulov, S. A., & Rizaev, I. I. (2020). Methodological problems of research of social systems. *Theoretical & Applied Science*, (2), 717-720.
15. Nilsson, E., & Eyrich, B. (1950). On Treatment of Barbiturate Poisoning. *Acta Medica Scandinavica*, V. 137 (6), pp. 381-389.
16. Ergashev, I. I. (2017). Features of eBAuation of investment attractiveness of service enterprises. In *The Fourteenth International Conference on Economic Sciences* (pp. 102-105).
17. Datla, K.P., Christidou, M., Widmer, W.W., Rooprai, H.K., & Dexter, D.T. (2001). Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson`s disease. *Neuro Report*, V. 12 (17), pp.3871-5.

18. Сафаров, А. И., & Ризаев, И. И. (2021). Этапы самоорганизации социальной системы. In В поисках социальной истины (pp. 237-242).
19. Hirano, T., Abe, K., Gotoh, M., & Oka, K. (1995). Citrus flavone tangeretin inhibits leukaemic HL-60 cell growth partially through inhibition of apoptosis with less cytotoxicity on normal lymphocytes. *Br.J. Cancer.*, V. 72 (6), pp.1380-1388.
20. Тураев, Б. О. (2022). Фанда толерантлик ва интолерантлик. *Oriental renaissance: InnoBAtive, educational, natural and social sciences*, 2(Special Issue 23), 41-48.
21. Ризаев, И. И., & Муминова, З. О. (2021). Профессиональная подготовка личности: оздоровление и духовное воспитание. In Система менеджмента качества в вузе: здоровье, образованность, конкурентоспособность (pp. 264-268).
22. Тураев, Б. О. (2015). Онтология, гносеология, логика ва фан фалсафаси муаммолари'. Т.: Алишер Навоий номидаги Ўзбекистон Миллий кутубхонаси нашриёти, Б, 48-49.
23. Khotambekovna, E. M. (2021). Systematic Analysis of Education. *ResearchJet Journal of Analysis and Inventions*, 2(07), 85-96.
24. Ismoilovich, E. I. (2016). The mechanism of evaluation of innoBAtive investment processes effectiveness in the service sector. *SAARJ Journal on Banking & Insurance Research*, 5(3), 60-71.