

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JRQAI.2021.39.61.001>

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ

**А.А. Шамилов**, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (ФГБОУ ВО «ВГМУ»), г. Пятигорск, [shamilovxii@yandex.ru](mailto:shamilovxii@yandex.ru)

**В.Н. Бубенчикова**, доктор фарм. наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (ФГБОУ ВО «КГМУ»), г. Курск, [bubenhikova.ksmu@yandex.ru](mailto:bubenhikova.ksmu@yandex.ru)

**Е.Р. Гарсия**, аспирант кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (ФГБОУ ВО «ВГМУ»), г. Пятигорск, [x-pharm@mail.ru](mailto:x-pharm@mail.ru)

**М.В. Ларский**, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (ФГБОУ ВО «ВГМУ»), г. Пятигорск, [m.v.larsky@rmedpharm.ru](mailto:m.v.larsky@rmedpharm.ru)

**А.С. Чиряпкин**, аспирант кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава РФ (ФГБОУ ВО «ВГМУ»), г. Пятигорск, [alexey.chiriapkin@yandex.ru](mailto:alexey.chiriapkin@yandex.ru)

В работе представлены результаты разработки и валидации методики анализа арбутина в брусники обыкновенной листьях методом капиллярного электрофореза. Пробоподготовка извлечения проводилась в соответствии с ФС.2.5.0063.18 ГФ XIV издания. Установлено, что предложенным в ФС методом УФ-спектрофотометрии определяется количественное содержание не только компонента арбутина, а всей суммы фенологликозидов. Определен норматив содержания компонента арбутина в листьях брусники обыкновенной методом капиллярного электрофореза – не менее 4%. При этом результаты количественного содержания арбутина подтверждаются при использовании метода ВЭЖХ. Методика количественного определения арбутина в брусники обыкновенной

листьях методом капиллярного электрофореза валидирована по показателям «линейность», «прецизионность» и «внутрилабораторная прецизионность», «правильность». Разработанная методика может быть рекомендована для анализа сырья брусники.

**Ключевые слова:** брусники обыкновенной листья, арбутин, капиллярный электрофорез, ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрия

В настоящее время наблюдается тенденция увеличения использования хроматографических методов анализа лекарственного растительного сырья (ЛРС). В зарубежных странах основным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), служащий базовым методом контроля качества

ЛРС. В фармакопейном анализе на территории Российской Федерации используются 107 частных статей на ЛРС, из них в 7 применяется метод ВЭЖХ для оценки подлинности сырья и проведения количественного определения, большое количество методик основано на электронной спектроскопии. Это обусловлено использованием при анализе методом ВЭЖХ дорогостоящей аппаратуры, колонок и высокочистых растворителей (ацетонитрила, метанола и др.). Спектрофотометрический метод анализа используется чаще за счет доступности аппаратуры и реагентов, но стоит учитывать то, что при выборе подобного метода мы судим о сумме веществ в пересчете на доминирующий компонент. Количественное содержание мажорного компонента, в отличие от метода ВЭЖХ, методом спектрофотометрии определить невозможно [1,2].

Одним из таких сепарационных методов анализа, с помощью которого можно определить компонентный состав и количественное содержание каждого компонента, является капиллярный электрофорез (КЭ). С помощью КЭ достигается высокая эффективность разделения веществ, при этом не требуется использование дорогостоящих реактивов, хроматографических колонок (анализ проводится в кварцевом капилляре). Таким образом, стоит отметить преимущества использования КЭ перед ВЭЖХ – это значительно более низкая цена единичного анализа, наличие более стабильных условий анализа, экспрессность анализа. Однако до настоящего времени этот метод не нашел применения для анализа лекарственного растительного сырья.

Нами проведена разработка методики количественного определения арбутина с помощью капиллярного электрофореза. Ранее в литературе было описано использование капиллярного электрофореза для количественного определения арбутина в водном извлечении из листьев брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной [3]. Однако

мы ориентировались на пробоподготовку извлечения из брусники обыкновенной листьев согласно ФС ГФ XIV издания, так как спиртом этиловым 70%-ным извлекается наибольшее количество арбутина.

Брусники обыкновенной листья в ГФ XI издания стандартизовались по содержанию арбутина методом йодометрического титрования, в ГФ XIV издания используется метод электронной спектроскопии после предварительной очистки водно-спиртового извлечения на колонке с оксидом алюминия. Нормируется нижний предел – не менее 4,5% арбутина в пересчете на воздушно-сухое сырье [4].

**Целью** данной работы является разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники листьях методом капиллярного электрофореза.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты анализа – брусники обыкновенной листья, заготовленные в различных регионах Российской Федерации: Кабардино-Балкарская Республика (КБР), Зольский район, берег реки Харбас, осень 2019; Пермский край, Кудымкарский район, весна 2018; Брянская область, весна 2018; Иркутская область, Братский район, деревня Новое Приречье, лето 2019; Алтайский край, Павловский район, осень 2019; Московская область, Мытищинский район, весна 2019. Сбор осуществляли согласно требованиям ФС.2.5.0063.18 ГФ XIV издания.

Пробоподготовка для установления содержания арбутина в анализируемых объектах осуществлялась согласно требованиям ФС.2.5.0063.18 ГФ XIV издания, раздел «Количественное определение» [4].

Первоначально измеряли электронные спектры извлечений из брусники обыкновенной листьев на спектрофотометре СФ-2000 (ЗАО «ОКБ Спектр», Россия) в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм. Расчет проводили

по величине удельного показателя светопоглощения арбутина.

Далее определяли содержание арбутина методом КЭ. Для этого брали ранее полученное извлечение (ФС.2.5.0063.18) – очищенное на колонке с оксидом алюминия и без предварительной очистки. Анализ проводили на приборе «Капель-105М» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром (диаметр капилляра 75 мкм,  $L_{\text{общ}}/L_{\text{эф}} = 50/60$  см). Кварцевый капилляр предварительно промывали последовательно водой очищенной, 1 М раствором натрия гидроксида, водой очищенной, 1 М раствором кислоты хлористоводородной, водой очищенной и буферным раствором. Буферный и промывочные растворы фильтровали через мембранный фильтр «Владипор» типа МФАС-Б-4 (НТЦ «Владипор», Россия), диаметр диска 25 мм. Анализируемое извлечение и буферный раствор центрифугировали при 8000 об/мин, 5 мин. Условия анализа: ввод пробы осуществляли гидродинамически при 150 мбар·с; детектирование при длине волны 254 нм; напряжение +20 кВ; температура в капилляре 20°C; электролит: 10 мМ боратный буферный раствор с pH=9,8; время анализа – 10 минут.

Для обработки электрофореграмм использовали программу «Эльфوران» (версия 3.2.5). Содержание арбутина в извлечении рассчитывали по уравнению калибровочного графика, который был построен при анализе СО арбутина (Sigma-Aldrich) в аналитической области концентраций от 0,01 до 0,2 мг/мл.

Валидацию методики количественного определения арбутина методом капиллярного электрофореза в брусники обыкновенной листьях проводили в соответствии с ГФ XIV по параметрам линейности, прецизионности (повторяемость и внутрилабораторная прецизионность) и правильности [3].

Для подтверждения полученных результатов использовали обращенно-фазовый вариант ВЭЖХ. Анализ выполняли с использовани-

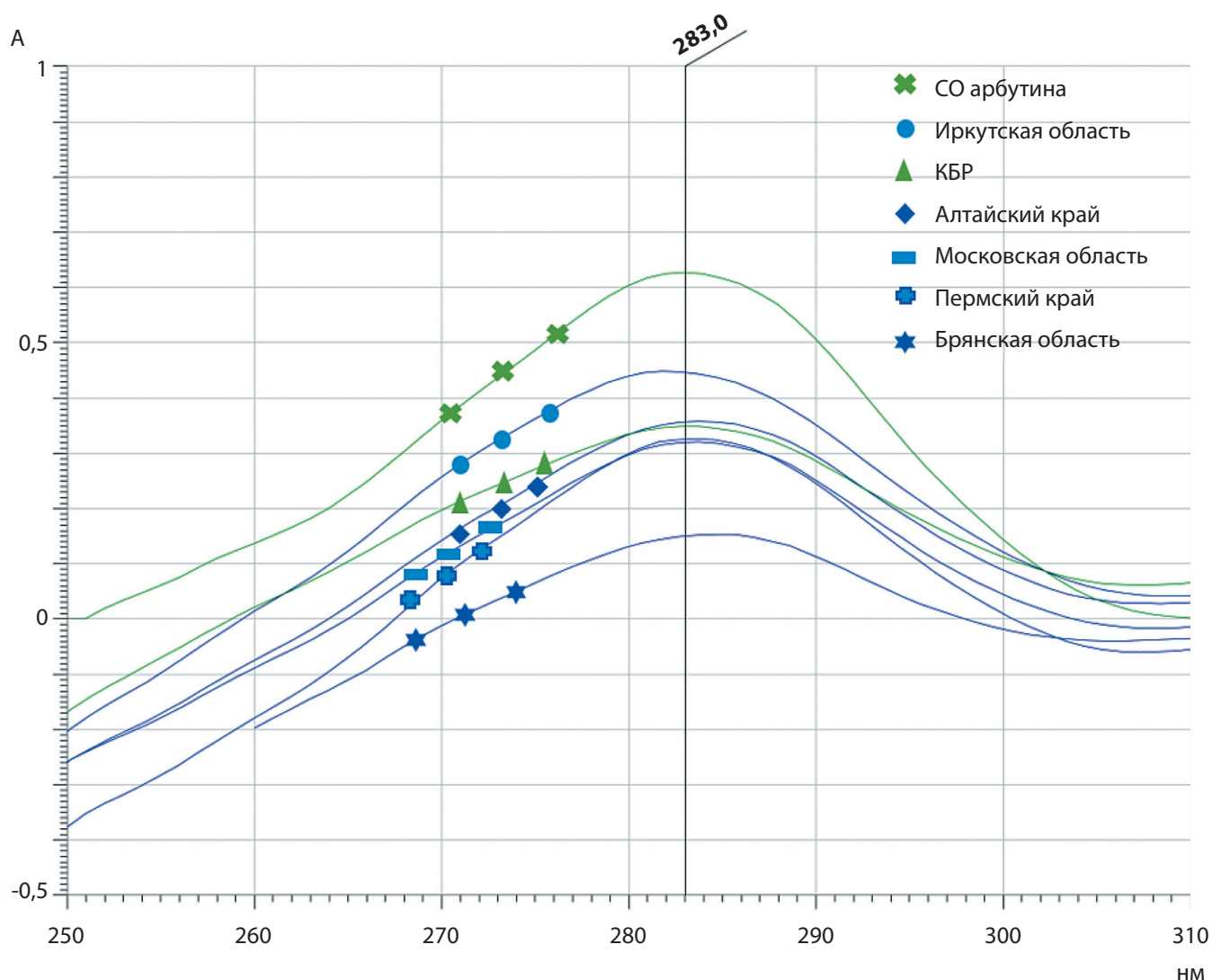
ем хроматографа «Стайер» («Аквилон», Россия), снабженного колонкой Luna C18 (Phenomenex, США) размером 150 x 4,6 мм (зернение сорбента 5 мкм) в изократическом режиме элюирования. Подвижная фаза представляла собой смесь 0,05 М раствора кислоты фосфорной и ацетонитрила в соотношении 97:3, скорость потока – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл, детектирование пиков осуществляли спектрофотометрически при 280 нм. Пробоподготовка включала разведение 1 мл неочищенных спиртовых извлечений из брусники обыкновенной листьев подвижной фазой до 10 мл. Определение количественного содержания арбутина в лекарственном растительном сырье проводили с использованием площади пика арбутина на хроматограммах растворов стандартного образца (Sigma-Aldrich, 0,003216% раствор СО в спирте этиловом 70%-ном).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный спектральный анализ исследуемых объектов показал, что максимумы светопоглощения извлечений совпали с максимумом светопоглощения арбутина ( $283 \pm 2$  нм) (рис. 1).

Результаты количественного определения в брусники обыкновенной листьях из различных мест естественного произрастания представлены в табл. 1.

При изучении оптимальных условий проведения анализа капиллярным электрофорезом перед нами встал вопрос о том, что в сырье арбутин может присутствовать в форме конъюгатов, например, в виде 2-О-кофеоил арбутина, а также совместно с метиларбутином и его продуктом распада гидрохиноном [5]. Некоторые из них могут вносить существенный вклад при спектральном методе анализа, так как, являясь фенологликозидами, не адсорбируются на колонке с оксидом алюминия.

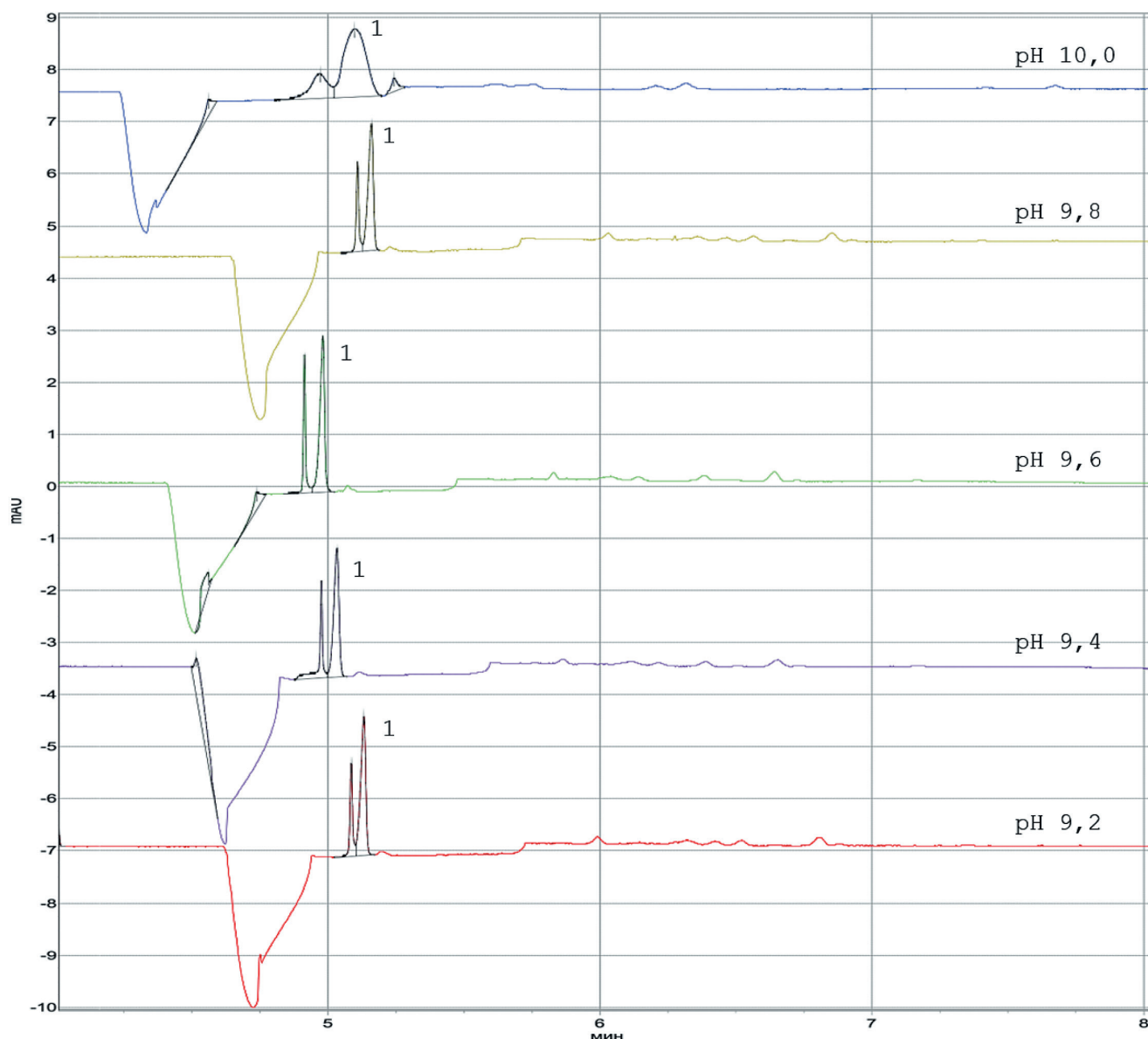


**РИС. 1.** Спектры поглощения раствора СО арбутина и водно-спиртовых извлечений (экстрагент – спирт этиловый 70%-ный) из брусники обыкновенной листьев, собранных в разных местах произрастания

Таблица 1

**РЕЗУЛЬТАТЫ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Регион заготовки	n	f	$\bar{x}$	$S_x$	$S_{\bar{x}}$	$t_{(p, f)}$	$\Delta x$	$\epsilon, \%$
КБР (осень 2019 г.)	7	6	8,50	0,1899	0,0718	2,45	0,18	2,07
Пермский край (весна 2018 г.)	7	6	7,91	0,2566	0,0970	2,45	0,25	3,11
Брянская область (весна 2018 г.)	7	6	5,74	0,2093	0,0791	2,45	0,20	3,50
Иркутская область (лето 2019 г.)	7	6	11,67	0,5503	0,2080	2,45	0,51	4,36
Алтайский край (осень 2019 г.)	7	6	8,31	0,2999	0,1134	2,45	0,28	3,34
Московская область (весна 2019 г.)	7	6	7,83	0,1907	0,0721	2,45	0,18	2,26



**РИС. 2.** Электрофореграммы водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70%-ный) из брусники обыкновенной листьев (Кабардино-Балкарская Республика), полученные при различных значениях pH 0,01 М боратного буферного раствора (1 – арбутин)

В связи с этим проведен подбор pH электролита с целью оптимального разделения пиков арбутина и сопутствующих компонентов. Установлено, что при использовании pH=9,6 0,01 М боратного буферного раствора достигается наилучшее разделение пика арбутина от других фенологликозидов в извлечении (рис. 2).

Кроме того, при pH=9,6 методика позволяет получать стабильные результаты, так как в диапазоне  $pH \pm 0,2$  эффективность пика арбутина меняется незначительно (табл. 2).

Таблица 2

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПИКА АРБУТИНА ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БОРАТНОГО БУФЕРНОГО РАСТВОРА С РАЗЛИЧНЫМ ЗНАЧЕНИЕМ PH**

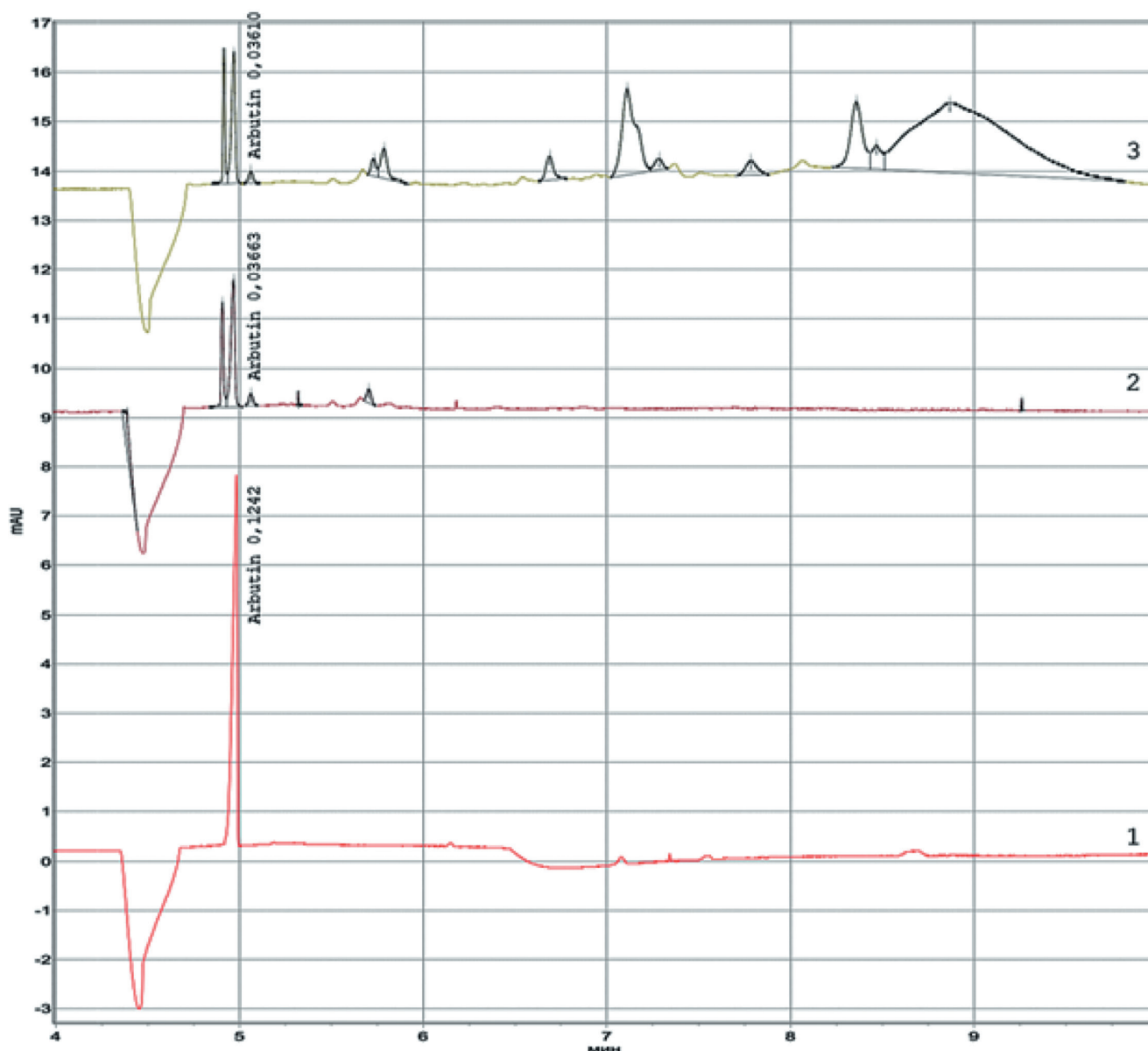
Эффективность, тыс. теоретических тарелок				
pH=9,2	pH=9,4	pH=9,6	pH=9,8	pH=10,0
414	418	434	439	18

Далее согласно методике анализировали в выбранных условиях извлечения, полученные с помощью очистки на колонке с алюминия оксидом, и неочищенные извлечения (рис. 3).

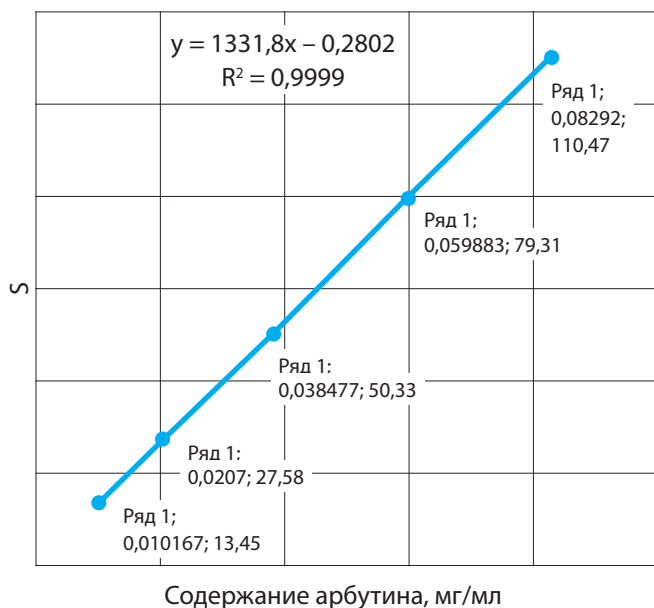
Разница между содержанием арбутина в неочищенном и очищенном извлечении – в пределах допустимой ошибки используемой методики, поэтому целесообразно проведение анализа методом капиллярного электрофореза без предварительной очистки извлечения

от сопутствующих соединений фенольной природы, что позволит сократить время анализа.

Таким образом, нами предложена следующая схема получения и анализа извлечения из брусники обыкновенной листьев на содержание арбутина методом капиллярного электрофореза: 0,5 г сырья (точная навеска) с размером частиц 1 мм экстрагируют 100 мл спирта этилового 70%-го, предварительно взвесив колбу с навеской и экстрагентом с по-



**РИС. 3.** Электрофореграммы: 1 – раствора СО арбутина; 2 – очищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70%-ный) из брусники обыкновенной листьев (Кабардино-Балкарская Республика); 3 – неочищенного водно-спиртового извлечения (экстрагент – спирт этиловый 70%-ный) из брусники обыкновенной листьев (Кабардино-Балкарская Республика). Концентрация арбутина мг/мл



**РИС. 4.** Калибровочный график линейной зависимости площади пика SO арбутина от его концентрации в растворе

грешностью ±0,01 г, на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. После экстракции извлечение охлаждают, колбу взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом этиловым 70%-ным. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр, смоченный спиртом этиловым 70%-ным, отбрасывая первые 10 мл фильтрата. Затем аликвоту объемом 3 мл полученного фильтрата вносят в мерную колбу объемом 25 мл и доводят до метки спиртом этиловым 70%-ным, перемешивают. Далее 1 мл извлечения центрифугируют при 8000 об/мин

Таблица 3

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРА «ЛИНЕЙНОСТЬ» ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	R
4	0,0424	56,23	1331,8	0,2802	0,999

в течение 5 минут и анализируют согласно выбранным условиям.

Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях в пересчете на воздушно-сухое сырье рассчитывают по уравнению:

$$X, \% = \frac{C_{\frac{\text{мг}}{\text{мл}}} \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{1000 \times a \times 3 \times (100 - W)} \quad (1),$$

где – концентрация арбутина в извлечении, рассчитанная по калибровочному графику (рис. 4); a – навеска сырья, г; W – влажность сырья, %.

Разработанная методика далее подверглась валидационной оценке согласно ОФС «Валидация аналитических методик» [4].

Линейность методики определяли по наличию линейного характера зависимости аналитического сигнала (площади пика) от концентрации стандартного образца арбутина в растворе в диапазоне концентраций 0,083–0,01 мг/мл.

Линейная зависимость наблюдалась в аналитической области концентраций арбутина от 0,08 до 0,01 мг/мл, коэффициент корреляции составил 0,999, что соответствует предъявляемым требованиям.

Параметр «прецизионность» оценивался как повторяемость (сходимость).

Повторяемость методики оценивали в 7 повторностях, проводимых одним аналитиком в один день, на одном приборе и с использованием одних реактивов (табл. 4).

Было определено относительное стандартное отклонение, которое не должно превышать 10% [6,7]. Данная величина не превышает 2,7%.

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность определялась в одной лаборатории, но в разные дни и двумя исполнителями на 3 образцах сырья в 3 повторностях (табл. 5).

Величина относительного стандартного отклонения не должна превышать 10% [6,7].

Таблица 4

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРА «ПОВТОРЯЕМОСТЬ» ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

№ эксперимента	Навеска, г	Площадь пика арбутина, mAU · с	Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях, %	Метрологические характеристики
1	0,5020	51,64	6,99	$\bar{x} = 6,73\%$ $S = 0,1938$ $S_{\bar{x}} = 0,0733$ $\Delta\bar{x} = 0,18$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 6,73 \pm 0,18$ $\bar{\epsilon} = \pm 2,67\%$
2	0,5015	49,25	6,67	
3	0,5034	48,53	6,55	
4	0,5004	49,89	6,77	
5	0,5011	51,55	7,00	
6	0,5021	48,53	6,57	
7	0,5022	48,51	6,56	
Влажность сырья – 6,26%				

Таблица 5

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПАРАМЕТРА «ВНУТРИЛАБОРАТОРНАЯ ПРЕЦИЗИОННОСТЬ» ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях, %			
Повтор	Образец 1 (Иркутская область, лето 2019 г.)	Образец 2 (КБР, осень 2019 г.)	Образец 3 (Алтайский край, осень 2019 г.)
<b>Исполнитель 1</b>			
1	9,42	6,99	7,17
2	10,10	6,67	6,77
3	10,57	6,55	6,52
<b>Исполнитель 2</b>			
4	9,74	6,77	6,37
5	10,30	6,99	6,73
6	9,50	6,57	6,40
Среднее значение	9,94	6,76	6,66
Стандартное (относительное) отклонение (RSD %)	4,64	2,91	4,49



В данном случае она не превышала 4,64%. Полученные данные показывают, что методика соответствует параметру «прецизионность».

Аналитическая методика считается правильной, если результаты эксперимента находятся в пределах доверительного интервала среднего результата, полученного по валидируемой методике. Также рассчитывается коэффициент Стьюдента, значение которого не должно быть больше табличного для соответствующего объема выборки ( $t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}$ ). Правильность определяли методом добавок известной концентрации стандартного образца арбутина к испытуемому извлечению, полученному из навески сырья 0,3 г с содержанием арбутина 60% от общей концентрации в сырье, до содержания арбутина 80%, 100% и 120%. Рассчитывали отношение найденного содержания к введенному и выраженному в процентах (открываемость), среднее значение открываемости, стандартное отклонение,

относительное стандартное отклонение. Содержание арбутина в испытуемом растворе составляло 0,0367 мг/мл (36,7 мкг/мл) (табл. 6).

Таким образом,  $t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}}(P, f)$ , так как  $0,73 < 2,31$ . Методика является правильной, поскольку не отягощена систематической ошибкой.

В результате экспериментально доказано, что разработанная методика пригодна для анализа арбутина методом капиллярного электрофореза. Разработанная методика была использована для количественного анализа содержания арбутина в образцах брусники обыкновенной листьев, собранных в нескольких регионах РФ (табл. 7).

Как видно из результатов табл. 7, наименьшее содержание арбутина обнаружено в сырье, заготовленном в Брянской области ( $4,13 \pm 0,18\%$ ), максимальное – в Иркутской области ( $9,86 \pm 0,43\%$ ). На основе полученных результатов предел содержания арбутина

Таблица 6

**РАСЧЕТНЫЕ ДАННЫЕ ПО ПАРАМЕТРУ «ПРАВИЛЬНОСТЬ» ПРИ ВАЛИДАЦИИ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

Содержание арбутина в извлечении из брусники обыкновенной листьев, мкг/мл	Добавлено СО арбутина		Ожидаемое содержание, мкг	Найденное содержание, мг	Открываемость, %	Метрологические характеристики
	мкл	мкг				
22,17	66,6	8,53	30,7	30,81	100,36	R = 100,87 SD = 3,58 RSD = 3,55 $t_{\text{выч}} = 0,73$
22,17	66,6	8,53	30,7	30,84	100,46	
22,17	66,6	8,53	30,7	30,22	98,44	
22,17	124,4	15,93	38,1	38,88	102,05	
22,17	124,4	15,93	38,1	38,04	99,84	
22,17	124,4	15,93	38,1	38,2	100,26	
22,17	189,3	24,23	46,4	46,07	99,29	
22,17	189,3	24,23	46,4	47,31	101,96	
22,17	189,3	24,23	46,4	48,81	105,19	

Таблица 7

**КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ, СОБРАННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ МЕСТАХ ПРОИЗРАСТАНИЯ, УСТАНОВЛЕННОЕ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА**

Место произрастания	n	f	$\bar{x}$	S	$S_{\bar{x}}$	t (P, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
КБР (осень 2019 г.)	7	6	6,73	0,1971	0,0745	2,45	0,18	2,71
Пермский край (весна 2018 г.)	7	6	5,83	0,1615	0,0611	2,45	0,16	2,66
Брянская область (весна 2018 г.)	7	6	4,13	0,1365	0,0516	2,45	0,13	3,17
Иркутская область (лето 2019 г.)	7	6	9,86	0,4689	0,1772	2,45	0,43	4,40
Алтайский край (осень 2019 г.)	7	6	6,61	0,3021	0,1142	2,45	0,28	4,23
Московская область (весна 2019 г.)	7	6	5,97	0,2288	0,0865	2,45	0,21	3,55

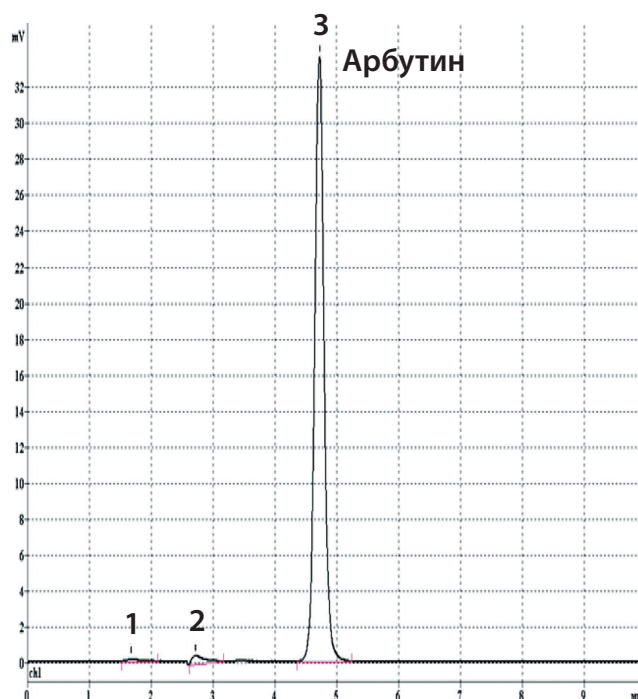
в брусники обыкновенной листьях не менее 4,0%, что несколько ниже, чем в ФС XIV издания. В связи с чем рекомендуем установить норматив содержания не менее 4%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при использовании УФ-спектрофотометрии результаты выше в среднем на 25% (разница в результатах от 16% до 28%), чем при определении количественного со-

держания компонента арбутина методом КЭ. По-видимому, вероятен вклад сопутствующих соединений при анализе методом УФ-спектроскопии. Широкий разброс результатов, полученных методом УФ-спектроскопии и капиллярного электрофореза (16–28%), может быть обусловлен временем сбора сырья брусники (до начала цветения и после созревания плодов), который регламентирует НД,



**РИС. 5.** Хроматограмма спиртового извлечения из брусники обыкновенной листьев



**РИС. 6.** Хроматограмма раствора стандартного образца арбутина

Таблица 8

**РЕЗУЛЬТАТЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ОБЫКНОВЕННОЙ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ ВЭЖХ**

№ эксперимента	Навеска, г	Площадь пика арбутина, мВ·сек	Содержание арбутина в брусники обыкновенной листьях, %	Метрологические характеристики
1	0,5020	251,16	6,32	$\bar{x} = 6,48\%$ $S = 0,1109$ $S_{\bar{x}} = 0,0453$ $\Delta\bar{x} = 0,12$ $\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 6,48 \pm 0,12$ $\bar{\varepsilon} = \pm 1,8\%$
2	0,5015	253,97	6,39	
3	0,5004	262,63	6,63	
4	0,5034	260,49	6,53	
5	0,5011	259,08	6,53	
6	0,5021	256,88	6,46	
Влажность сырья – 6,26%; площадь пика арбутина (0,003216% раствор СО) 253,97 мВ · сек				

географическим фактором и другими условиями.

С целью подтверждения результатов, полученных с помощью КЭ, тот же образец сырья (КБР, осень 2019 г.) анализировали методом ВЭЖХ. Типичная хроматограмма представлена на рис. 5, хроматограмма раствора стандартного образца арбутина – на рис. 6.

Результаты количественного определения этого же образца лекарственного сырья методом ВЭЖХ, выполненного в шестикратной повторности, представлены в табл. 8.

Содержание арбутина в анализируемом образце сырья составило  $6,48 \pm 0,12\%$ , что сопоставимо с результатами, полученными методом КЭ.

**ВЫВОДЫ**

Установлено, содержание арбутина в листьях брусники спектрофотометрическим методом из различных мест произрастания. Содержание арбутина колебалось от 5,74% до 11,67%.

Содержание арбутина, определенное методом капиллярного электрофореза, варьирова-

ло от 4,13% до 9,86%, что подтверждается и данными ВЭЖХ. Установлено, что фармакопейным методом – УФ-спектрофотометрия – получены завышенные результаты по сравнению с сепарационными методами. По-видимому, это связано с тем, что методом УФ-спектрофотометрии определяется содержание не только компонента арбутина, а всей суммы фенологликозидов. Определен норматив содержания арбутина в листьях брусники обыкновенной – не менее 4%.

Проведена валидация методики стандартизации брусники обыкновенной листьев методом капиллярного электрофореза. Установлено, что методика линейна ( $R < 0,99$ ), прецизионна ( $RSD \leq 4,64\%$ ), не отягощена систематической ошибкой – критерий Стьюдента  $t_{\text{выч}} < t_{\text{таб}} (P, f)$ .

Разработанная методика может быть рекомендована для анализа сырья брусники.

**БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК**

1. Бубенчикова В.Н., Кондратова Ю.А., Бубенчиков Р.А., Сухомлинов Ю.А., Шамилов А.А. Совершенствование методов стандар-

- тизации лекарственного растительного сырья. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития», посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (20–21 октября 2019 г.). – Курск. 2016. – С. 438–444.
2. Шамилов А.А., Морозов А.В., Гарсия Е.Р. Капиллярный электрофорез в анализе лекарственного растительного сырья. IV Гаммермановские чтения: сборник научных трудов (30–31 января 2019 г.). – Санкт-Петербург. 2018. – С. 352–355.
  3. Рознятовская А.А., Сенченко С.П., Харахиян А.А. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники листьях и толокнянки листьях методом капиллярного электрофореза // Современные проблемы науки и образования. 2014; 6: 1794.
  4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1, 4. <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>, свободный. Дата обращения: 23.01.2021.
  5. Liu P., Lindstedt A., Markkinen N., Sinkkonen J., Suomela J.P., Yang B. Characterization of Metabolite Profiles of Leaves of Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) and Lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) // J. Agric. Food Chem. 2014; 62 (49): 12015–12026. doi.org/10.1021/jf503521m.
  6. Руководство ICH «Валидация аналитических методик. Содержание и методология» Q2 (R1). Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации медицинских лекарственных средств // Фармация. 2008; 4: 3–10.
  7. Appendix F. Guidelines for Standard Method Performance Requirements. [http://www.eoma.aoc.org/app\\_f.pdf](http://www.eoma.aoc.org/app_f.pdf), свободный. Дата обращения: 23.01.2021.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ARBUTIN IN LEAVES OF LINGONBERRY (*VACCINIUM VITIS-IDAEA* L.)

**A.A. Shamilov<sup>1</sup>, V.N. Bubenchikova<sup>2</sup>, E.R. Garsiya<sup>1</sup>, M.V. Larsky<sup>1</sup>, A.S. Chiryapkin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

<sup>2</sup> Kursk State Medical University, Kursk, Russia

*In the work results of development and validation of analysis method of arbutin in lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) leafs by capillary electrophoresis. Extract was carried out according to Pharmaceutical article of State Pharmacopoeia of Russian Federation 14th edition. It was determined that quantitative analysis of lingonberry extract by UV-spectrophotometry establishes not only arbutin but total amount of phenoglycosides. Amount of arbutin in lingonberry leafs is established as not less 4% using capillary electrophoresis. Results of this analysis are confirmed by HPLC. Quantitative analysis of lingonberry extract by capillary electrophoresis are validated by linearity, precision, accuracy. Development method may be recommend for analysis lingonberry leafs.*

**Keywords:** *Vaccinium vitis-idaea* L., arbutin, capillary electrophoresis, HPLC, UV-spectrophotometry