

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2023.25.53.003>

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЕЛЛАМУРИНА В ЛИСТЬЯХ БАРХАТА

А.И. Радимич, старший научный сотрудник отдела химии природных соединений, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

Г.В. Адамов, канд. фарм. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории атомарно-молекулярной биорегуляции и селекции, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

О.Ю. Куляк, канд. фарм. наук, ведущий научный сотрудник химии природных соединений, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

О.Л. Сайбель, доктор фарм. наук, руководитель Центра химии и фармацевтической технологии, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

Т.Д. Даргаева, доктор фарм. наук, профессор, главный научный сотрудник отдела химии природных соединений, ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), г. Москва

Одним из основных условий обеспечения качества лекарственных средств является использование современных физико-химических методов анализа для качественного и количественного определения действующих веществ. Согласно ВФС 42-1972-90 «Лист бархата», для оценки содержания фелламурина (феллавина) в данном сырье используется метод спектрофотометрии. Однако этот метод характеризуется недостаточной избирательностью для анализа индивидуального вещества в присутствии других близкородственных соединений и может приводить к получению завышенных результатов количественного определения. Целью настоящей работы явилась разработка и валидация методики количественного определения фелламурина в данном сырье с использованием ВЭЖХ-УФ. В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия анализа, разработана мето-

дика количественного определения фелламурина в листьях бархата и проведена ее валидация по показателям: специфичность, линейность, правильность, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность. С использованием данной методики проанализированы опытные партии листьев бархата и предложена норма содержания фелламурина не менее 1,5%. Результаты проведенных исследований включены в проект новой редакции нормативного документа ФС «Бархата листья».

Ключевые слова: бархат амурский, листья, фелламурин, ВЭЖХ, валидация

Современные требования к качеству лекарственных средств определяют необходимость разработки точных, достоверных и воспроизводимых методик их стандартизации. Среди разнообразия существующих в настоящее

время аналитических инструментов исследователи все чаще отдают предпочтение физико-химическим методам [1,2].

Для оценки содержания суммы биологически активных веществ в лекарственном растительном сырье и препаратах на его основе широко используется метод спектрофотометрии. В свою очередь, для качественного и количественного анализа индивидуальных веществ наиболее оптимальным выбором являются хроматографические методы (ВЭЖХ, ГЖХ) с различными вариантами детектирования [3].

Согласно ВФС 42-1972-90 «Лист бархата», стандартизация данного лекарственного растительного сырья проводится методом спектрофотометрии по содержанию фелламурина (феллавина). При этом измерение оптической плотности при аналитической длине волны учитывает не только вклад основного вещества – фелламурина, но и близкородственных соединений, имеющих аналогичное поглощение, что может приводить к получению завышенных результатов количественного определения [4].

Учитывая, что листья бархата служат сырьем для получения «Флакозида», представляющего собой фармацевтическую субстанцию с содержанием основного вещества (фелламурина) не менее 96%, для получения достоверных результатов анализа в данном случае в качестве метода анализа целесообразно использование ВЭЖХ-УФ [5].

В связи с этим в рамках актуализации ВФС 42-1972-90 «Лист бархата» для включения в Государственную фармакопею XV издания **целью** настоящей работы явилась разработка и валидация методики количественного определения фелламурина в данном сырье с использованием ВЭЖХ-УФ-анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили опытные партии листьев бархата амурского (*Phello-*

dendron amurense Rupr. синонимы: *Ph. lavalleyi* Dode, *Ph. sachalinense* Sarg.), заготовленные в 2020–2022 гг. от дикорастущих (Приморский край) и интродуцированных (Брянская и Рязанская области, Краснодарский край) растений.

В работе использовали следующее оборудование: высокоэффективный жидкостный хроматограф Prominence-i LC-2030C 3D с детектором PDA (Shimadzu, Япония), весы электронные аналитические ER-182A (AND, Япония), анализатор влажности ML-50 (AND, Япония); и реактивы: ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ (ТУ 20.14.43-017-29483781-2018, ООО «ТД Химмед»), кислота муравьиная (BCBQ0065V, Fluka), вода очищенная (ГФ РФ ФС 2.2.0020.18).

Приготовление раствора стандартного образца (СО) фелламурина (ФСО.2.1.00002 Глюкопиранозидметилбутенилтригидроксифлаванол): около 0,0360 г (точная навеска) стандартного образца фелламурина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, добавляют 50 мл спирта этилового 40% и перемешивают до полного растворения. Объем раствора доводят тем же растворителем до метки (раствор СО).

Приготовление испытуемого раствора (ИР). Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 250 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 40%. Колбу закрывают пробкой и взвешивают с точностью $\pm 0,01$ г. Присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 минут с момента растворителя. Колбу охлаждают до комнатной температуры, доводят растворителем до первоначальной массы, перемешивают. Извлечение фильтруют через бумажный складчатый фильтр «синяя лента».

Условия хроматографирования: колонка Phenomenex, Luna 5 μ m C18 (250 \times 4,6 мм), подвижная фаза (ПФ): ПФ «А» – 0,2% раствор

муравьиной кислоты в воде, ПФ «В» – 0,2% раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле; режим элюирования: содержание компонента «В» 0 мин. – 25%, 14,0 мин. – 25%, 14,5 мин. – 100%, 16,5 мин. – 100%, 20,0 мин. – 25%, 24,0 мин. – остановка анализа, скорость потока, 1,0 мл/мин, Температура термостата 30°C, Детектор – диодная матрица (длина волны 290 нм), объем пробы – 10 мкл, время хроматографирования – 24 мин.

Хроматографическая система считается пригодной, если:

- относительное стандартное отклонение площади пика фелламурина после пяти повторных введений раствора СО – не более 2,0%;

- относительное стандартное отклонение времени удерживания пика фелламурина после пяти повторных введений раствора СО – не более 2,0%;
- фактор асимметрии пика фелламурина на хроматограмме раствора СО не более 1,5, эффективность хроматографической колонки не менее 5000 т.т.

Содержание фелламурина (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 1 \cdot P \cdot (100 - W_{CO})}{S_0 \cdot a \cdot (100 - W_x)}$$

где S – площадь пика фелламурина на хроматограмме испытуемого раствора; a₀ –

Таблица 1

ВАЛИДАЦИОННЫЕ ПАРАМЕТРЫ, МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ И КРИТЕРИИ ИХ ПРИЕМЛЕМОСТИ

№ п/п	Наименование параметра	Методика определения	Критерий приемлемости
2	Специфичность	Проводят анализ стандартного раствора и испытуемого раствора	Совпадение времен удерживания пика фелламурина на хроматограмме ИР и СО с точностью не менее 99,0%
3	Линейность	Анализируют 5 растворов стандартного образца на всем диапазоне методики	Значение коэффициента корреляции калибровочной зависимости в диапазоне 80–120% должно быть не менее 0,995
4	Правильность	Проводят анализ 9 растворов модельной смеси на всем диапазоне методики	Соотношение «найдено/введено» должно составлять 100±2%
5	Повторяемость	Проводят анализ шести растворов одной серии сырья	Относительное стандартное отклонение содержания фелламурина в сырье не должно превышать 10,0%
6	Внутри-лабораторная прецизионность	Проводят анализ другим аналитиком в другой день той же серии сырья	Разница измерений не должна превышать 10%
7	Аналитическая область	Определение правильности, линейности и прецизионности аналитической методики	Правильность, линейность и прецизионность должны быть установлены внутри аналитического диапазона

навеска СО фелламурина, г; S_0 – площадь пика фелламурина на хроматограмме СО фелламурина; P – содержание основного вещества в СО фелламурина, %; W_{CO} – влажность СО фелламурина, %; a – масса навески испытуемого образца, г; W_x – влажность сырья, %.

Валидацию методики количественного определения фелламурина в листьях бархата проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [3]. Валидационные параметры, методики их определения и критерии приемлемости представлены в табл. 1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для уточнения оптимальных условий извлечения фелламурина из листьев бархата были проведены исследования по влиянию экстрагента и температуры экстракции на выход целевого вещества из сырья (табл. 2).

В результате было установлено, что наибольшее количество фелламурина извлекается при экстракции сырья спиртом этиловым 40% при нагревании на кипящей водяной бане.

В ходе дальнейших исследований была подобрана система растворителей и режим элюирования, позволяющий проводить количественное определение фелламурина в присутствии других метаболитов данного сырья.

На основании подобранных условий была предложена методика количественного определения фелламурина в листьях бархата, описанная в разделе «Материалы и методы».

Валидационную оценку разработанной методики проводили по показателям: специфичность, аналитический диапазон, линейность, правильность, воспроизводимость (сходимость) и внутрилабораторная прецизионность.

Предварительно для проверки пригодности хроматографической системы получили 5 хроматограмм раствора СО. Эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику фелламурина, составила 10156 т.т.; фактор асимметрии пика фелламурина – 1,2; относительное стандартное отклонение (RSD) площади пика фелламурина – 0,1%, времени удерживания – 0,28%.

Оценка специфичности показала, что среднее время удерживания фелламурина на хроматограмме СО – 13,15 мин., испытуемого

Таблица 2

ЗАВИСИМОСТЬ СОДЕРЖАНИЯ ФЕЛЛАМУРИНА ОТ ЭКСТРАГЕНТА И ТЕМПЕРАТУРНОГО РЕЖИМА ЭКСТРАКЦИИ ЛИСТЬЕВ БАРХАТА

Экстрагент	Содержание фелламурина, %	
	Экстракция при комнатной температуре	Экстракция на кипящей водяной бане
Спирт этиловый 20%	1,60±0,05	1,85±0,03
Спирт этиловый 30%	1,65±0,06	1,87±0,09
Спирт этиловый 40%	1,53±0,02	1,87±0,06
Спирт этиловый 50%	1,17±0,04	1,61±0,06
Спирт этиловый 60%	0,97±0,03	1,48±0,04
Спирт этиловый 70%	0,90±0,04	1,44±0,07

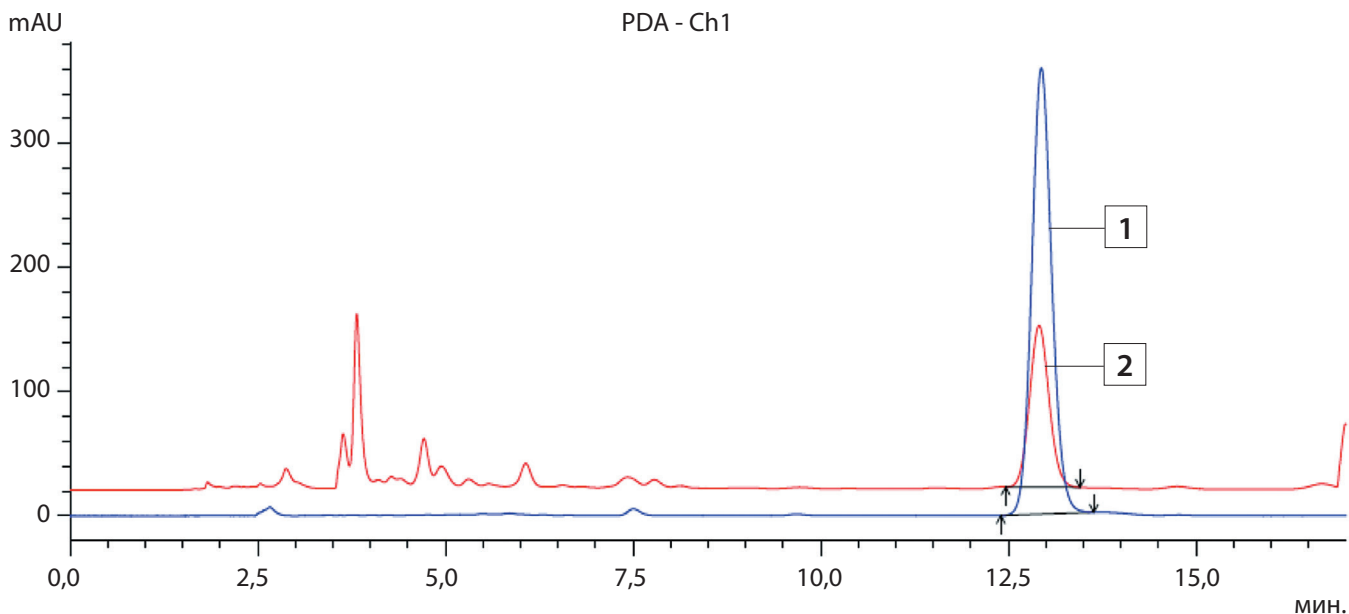


РИС. 1. ВЭЖХ-хроматограмма (290 нм) раствора СО фелламурина (1) и испытуемого раствора (2)

раствора – 13,12 мин. (рис. 1). Совпадение времен удерживания на хроматограммах стандартного и испытуемого раствора составило 99,8%.

Согласно установленным требованиям, правильность, линейность и прецизионность методики должны быть установлены внутри аналитического диапазона, составляющего 80–120% от предельных значений.

В проекте ФС «Бархата листья» содержание фелламурина нормируется на уровне не менее 1,5%, при этом концентрация фелламурина в испытуемом растворе будет составлять 150 мкг/мл. Максимальное содержание фелламурина в листьях бархата, установленное по результатам анализа опытных партий различных годов и мест заготовки, составляло 4,50%. С учетом возможного превышения данного порога валидация методики проводилась до уровня 6,0%, что составит 600 мкг/мл в испытуемом растворе. При соблюдении требований к установлению аналитического диапазона в области концентраций 80–120% от предельных значений для данной методики он будет составлять 120–720 мкг/мл.

Линейность методики определяли путем анализа пяти растворов с концентрацией фелламурина от 102,01 до 700,05 мкг/мл. График зависимости площади пика от концентрации фелламурина представлен на рис. 2. Значение коэффициента корреляции равно 0,99998.

Для оценки правильности готовили модельные смеси с концентрациями, соответ-

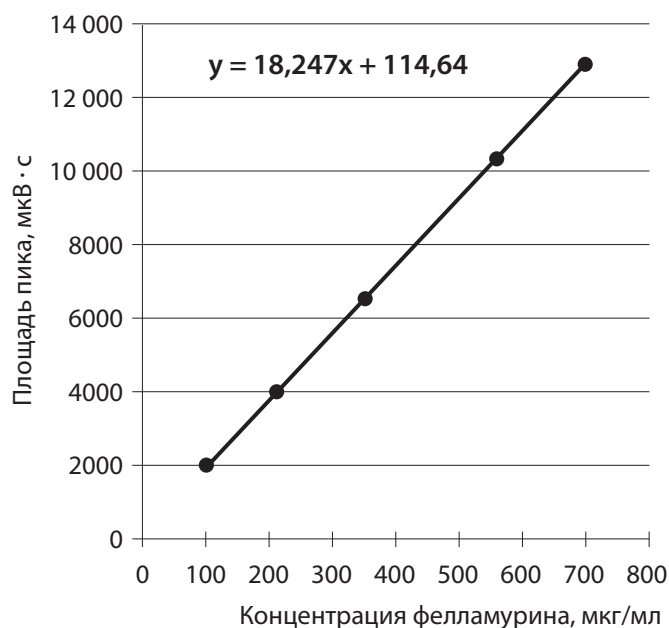


РИС. 2. График зависимости площади пика от концентрации раствора фелламурина

ствующими различным точкам аналитического диапазона. Поскольку приготовить модельную смесь, не содержащую целевое вещество, не представляется возможным, то в качестве матрицы использовали извлечение, полученное согласно методике, но с уменьшением навески сырья в 2 раза. Модельные смеси готовили смешиванием извлечения (И) и раствора с концентрацией фелламурина 700,0 мкг/мл (Р) по схеме, представленной в табл. 3. Растворы готовили в мерной колбе объемом 25 мл, доводили до метки спиртом этиловым 40%. Опыт проводили в трех повторностях.

Фактическую концентрацию фелламурина рассчитывали исходя из его содержания в извлечении и объема добавки раствора Р.

Найденные концентрации рассчитывали на основе измеренных значений. При этом площадь пика фелламурина определяли как разницу между площадями пиков на хрома-

тограммах модельной смеси с добавкой и исходного извлечения без добавки. Результаты оценки правильности приведены в табл. 4. Среднее отношение фактическая/найденная составило 100,1%.

Повторяемость оценивали путем анализа шести извлечений, приготовленных, согласно методике, из образца одной партии сырья, заготовленной в Брянской области в 2022 г. Среднее содержание фелламурина по результатам шести измерений составило 2,1%. Относительное стандартное отклонение по результатам шести измерений 6,89% (табл. 5).

Для определения внутрилабораторной прецизионности проводили анализ другим аналитиком в другой день трех образцов той же серии сырья согласно методике. Среднее содержание фелламурина по результатам трех измерений составило 2,2%. Разница между аналитиками – 4,8%.

Таблица 3

СХЕМА ПРИГОТОВЛЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ СМЕСЕЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ

№ п/п	Модельная смесь	Площадь пика фелламурина, мкВ · с	Концентрация добавки фелламурина фактическая, мкг/мл
1–0	Раствор И-1	588 817	0
1–1	5 мл раствора И-1 + 1,5 мл раствора Р	1 390 272	42,0
1–2	5 мл раствора И-1 + 10 мл раствора Р	5 747 767	280,0
1–3	5 мл раствора И-1 + 20 мл раствора Р	11 089 643	560,0
2–0	Раствор И-2	550 631	0
2–1	5 мл раствора И-2 + 1,5 мл раствора Р	1 341 237	42,0
2–2	5 мл раствора И-2 + 10 мл раствора Р	5 735 163	280,0
2–3	5 мл раствора И-2 + 20 мл раствора Р	10 961 198	560,0
3–0	Раствор И-3	572 900	0
3–1	5 мл раствора И-3 + 1,5 мл раствора Р	1 366 037	42,0
3–2	5 мл раствора И-3 + 10 мл раствора Р	5 767 912	280,0
3–3	5 мл раствора И-3 + 20 мл раствора Р	11 010 291	560,0
	Раствор СО	6 540 478	–

Таблица 4

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПРАВИЛЬНОСТИ МЕТОДИКИ

№ п/п	Площадь пика фелламурина, мкВ · с, за вычетом площади пика извлечения	Концентрация фелламурина в модельной смеси фактическая, мкг/мл	Концентрация фелламурина в модельной смеси найденная, мкг/мл	Отношение фактическая/найденная, %
1–0	801 455	42,0	42,8	98,1
1–1	5 158 950	280,0	275,7	101,6
1–2	1 050 0826	560,0	561,2	99,8
2–0	790 606	42,0	42,3	99,4
2–1	5 184 532	280,0	277,1	101,1
2–2	10 410 567	560,0	556,4	100,7
3–0	793 137	42,0	42,4	99,1
3–1	5 195 012	280,0	277,6	100,9
3–2	10 437 391	560,0	557,8	100,4

Таким образом, все значения аналитических параметров соответствовали критериям приемлемости и свидетельствовали о пригодности разработанной методики для анализа содержания фелламурина в листьях бархата.

С помощью данной методики были проанализированы опытные партии сырья разных мест и годов заготовки.

Согласно ВФС 42-1972-90 «Лист бархата», норма содержания фелламурина составляла

не менее 2,5%. Однако ввиду того, что использованный нами метод ВЭЖХ-УФ является более селективным по сравнению со спектрофотометрией, то при актуализации данного нормативного документа следует уменьшить его до значения не менее 1,5%. Установление такой нормы подтверждено результатами анализа опытных партий сырья, заготовленных как от дикорастущих (Приморский край), так и от культивируемых (Брянская

Таблица 5

РЕЗУЛЬТАТЫ ОЦЕНКИ ПОВТОРЯЕМОСТИ

№ пробы	Площадь пика на хроматограмме испытуемого раствора, мкВ · с	Масса навески сырья, г	Содержание фелламурина в испытуемом образце, %
1	3 514 910	0,9815	2,1
2	3 547 620	0,9968	2,0
3	3 347 357	0,9785	2,0
4	3 549 401	1,0021	2,0
5	4 066 947	1,0083	2,3
6	4 079 679	1,0150	2,3

Таблица 6

РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ОПЫТНЫХ ПАРТИЙ ЛИСТЬЕВ БАРХАТА

Место, месяц и год заготовки	Содержание фелламурина, %
Краснодарский край, август 2020 г.	1,70±0,07
Рязанская область, сентябрь 2020 г.	4,50±0,18
Приморский край, сентябрь 2020 г.	2,19±0,09
Приморский край, июль 2021 г.	3,35±0,10
Брянская область, август 2021 г.	1,87±0,08
Брянская область, август 2022 г.	2,52±0,51
Приморский край, июль 2022 г.	3,25±0,09

и Рязанская области, Краснодарский край) растений.

ВЫВОДЫ

В результате проведенных исследований подобраны оптимальные условия анализа и разработана методика количественного определения фелламурина в листьях бархата.

Проведенная валидация позволила охарактеризовать ее положительно по основным аналитическим показателям: специфичность, линейность, правильность, повторяемость и внутрилабораторная прецизионность.

На основании результатов анализа опытных партий сырья с использованием разработанной методики скорректирована норма содержания фелламурина.

Разработанная методика включена в проект новой редакции ФС «Бархата листья».

Исследования проведены согласно плану научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме «Фитохимическое обоснование ресурсосберегающих технологий переработки лекарственного растительного сырья и рационального использования биологически активных веществ растительного происхождения» (FGUU-2022-0011).

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Марахова А.И., Сорокина А.А., Жилкина В.Ю. Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе / Монография. – Москва: Типография «Ваш формат», 2017. – С. 308.
2. Саканян Е.И., Бунятян Н.Д., Сакаева И.В., Лякина М.Н., Шемерянкина Т.Б., Постюк Н.А., Рукавицына Н.П. Современные подходы к структуре построения фармакопейных статей на лекарственное растительное сырье // Фармация. – 2015. – Т. 64(4). – С. 9–11.
3. Государственная фармакопея XIV издания [Электронный ресурс]. – М., 2018. – Режим доступа: <https://femb.ru/record/pharmacosorea14> (Дата обращения 27.02.2023).
4. ВФС 42-1972-90 «Лист бархата».
5. Карабаева В.В., Крепкова Л.В., Бабенко А.Н., Бортникова В.В., Фатеева Т.В., Мизина П.Г., Михеева Н.С., Карабаева О.Н. Ретроспективный анализ экспериментального и клинического изучения флакозида при вирусных гепатитах // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Т. 10(4). – С. 169–176. DOI:10.33380/2305-2066-2021-10-4-169-176.

IMPROVEMENT OF METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHELLAMURIN IN PHELLODENDRONI LEAVES

A.I. Radimich, G.V. Adamov, O.Yu. Kulyak, O.L. Saybel, T.D. Dargaeva

All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (FGBNU VILAR), Moscow, Russia

One of the main conditions for ensuring the quality of medicines is the use of modern physicochemical methods of analysis for qualitative and quantitative determination of active substances. According to pharmacopoeial article VFS 42-1972-90 "Phellodendroni leaf" to assess the content of phellamurin (phellavin) in this raw material is used spectrophotometric method. However, this method is characterized by insufficient selectivity for the analysis of an individual substance in the presence of other closely related compounds and can lead to overestimated results of quantification. The aim of the present work was to develop and validate a method for the quantitative determination of phellamurin in this raw material using HPLC-UV. As a result of the conducted studies, the optimal conditions of analysis were selected and the technique for quantitative determination of phellamurin in phellodendroni leaves was developed and its validation was carried out in terms of specificity, linearity, correctness, repeatability and in-laboratory precision. Using this methodology, experimental batches of phellodendroni leaves were analyzed and the norm of phellamurin content of not less than 1.5% was proposed. The results of the conducted research are included in the draft of the new edition of the normative document "Phellodendroni leaves".

Keywords: *Phellodendron amurense* Rupr, leaves, phellamurin, HPLC, validation