

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ АНАЛИТИЧЕСКОЙ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ ПОДЛИННОСТИ ПОБЕГОВ *VACCINIUM MYRTILLUS L.*

Г.Я. Мечикова¹, Н.В. Матющенко¹, О.В. Смирнова²

¹Дальневосточный государственный медицинский университет (г. Хабаровск),

²ФГБУ «ИМЦЭУАОСМП» Росздравнадзора (г. Москва)

Development and validation of analytical method for verification of identity of shoots of *Vaccinium myrtillus L.*

G.Y. Mechikova¹, N.V. Matyushchenko¹, O.V. Smirnova²

¹The Far Eastern State Medical University (Khabarovsk, Russia)

²Federal State Budget Institution «Information and Methodological Center for Expertise,
Stocktaking and Analysis of Circulation of Medical Products» (Moscow, Russia)

РЕЗЮМЕ

Разработана методика определения подлинности побегов черники обыкновенной методом хроматографии в тонком слое сорбента. Определены оптимальные условия проведения хроматографического анализа. Валидация методики проведена по следующим параметрам: специфичность, прецизионность и робастность. Установлено, что все исследуемые валидационные характеристики находятся в пределах критериев приемлемости. Результаты валидации позволили включить разработанную методику в проект фармакопейной статьи «Черники обыкновенной побеги – цельные, измельченные и порошок «ангро», принятой на рассмотрение ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России (вх. № 6473 от 23.04.13 г.).

Ключевые слова: валидация, хроматография в тонком слое сорбента, специфичность, прецизионность, робастность, побеги черники обыкновенной, флавоноиды.

RESUME

A method was developed for verification of identity of bilberry shoots by chromatography in a thin layer of sorbent. The optimal conditions for the chromatographic analysis were stated. The method was validated to ensure specificity, precision and robustness. Statistical calculations proved the validation parameters to be within the boundaries of acceptance criteria. The results of the validation allowed to include the method into pharmacopoeia monograph «Bilberry shoots: whole, crushed and powdered», adopted for approval by FSBI Scientific Center for Expertise of Medical Products of Russian Ministry of Health (Ref. № 6473, April 23, 2013).

Keywords: validation, chromatography in a thin layer of sorbent, specificity, precision, robustness, bilberry shoots, flavonoids.

Стандартизация лекарственного растительного сырья ввиду композиционного разнообразия его химического состава представляет собой весьма сложную аналитическую задачу. Практически невозможно провести идентификацию сырья на основе данных первичного фитохимического этапа определения его подлинности – качественных реакций. Качественные реакции позволяют лишь констатировать присутствие в сырье группы или групп биологически активных веществ. Наиболее специфичными в этом отношении являются хроматографические методы анализа.

В ФС-42-2948-93, регламентирующей качество побегов *Vaccinium myrtillus L.*, подлин-

ность сырья определяется только с помощью одной качественной реакции с железосодержащими квасцами на дубильные вещества.

Цель данной работы – разработка и валидация методики хроматографии в тонком слое сорбента для определения подлинности побегов *V. myrtillus L.*

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектами исследования служили побеги *V. myrtillus L.*, собранные по ареалу вида. Хроматографию в тонком слое сорбента проводили на пластинках «Сорбфил» ПТСХ-П-В (Россия) размером 100 x 100 мм и «TLC Silica gel 60 F₂₅₄»

Alluminium sheets (Merck, Германия) размером 200 x 200 мм. Нанесение проб на пластинки осуществляли с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat V (Camag, Швейцария). В работе использовали стандартный образец гиперозида (Sigma Aldrich, Cat. No 00180585) [1].

Валидацию методики проводили в соответствии с установленными требованиями. В ходе работы рассматривались такие валидационные характеристики, как специфичность, прецизионность и робастность в соответствии с правилами и рекомендациями [2, 3].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При разработке методики ТСХ изучались вопросы подготовки пробы для анализа – тип экстрагента, время экстракции, условия экстракции, а также состав хроматографической системы, тип пластинок, схема и реагент детектирования, количество наносимой пробы на пластинку, подготовка камеры (время насыщения) и пластинок для хроматографирования, длина пробега подвижной фазы.

Опытным путем было установлено, что в качестве испытуемого раствора целесообразно использовать извлечение, полученное с помощью спирта этилового 70 %. Между тем, анализ хроматографического профиля неочищенного экстракта показал, что зоны адсорбции, соответствующие флавоноидам, делятся нечетко, ряд зон перекрываются, что значительно затрудняет определение их хроматографических характеристик. В связи с этим была изучена перспективность использования в анализе стадии очистки методом избирательной экстракции. Для этого спиртовой экстракт упаривали под вакуумом до водного остатка, выпавший осадок липофильных веществ отфильтровывали, далее сгущенный водный экстракт для очистки от хлорофилла и остатков смол промывали несколько раз хлороформом до обесцвечивания последнего. Для получения

полифенольной фракции водный остаток подвергали далее экстрагированию этилацетатом. В результате проведения очистки были получены хроматограммы с четкими и компактными зонами адсорбции, представляющие собой хроматографический полифенольный образ специфичный для *V. myrtillus* L.

При выборе оптимального объема наносимой пробы были учтены особенности морфологии и химического состава сырья *V. myrtillus* L. Во-первых, побеги являются неоднородным сырьем, и содержание стеблевых частей в нем по данным товароведческого анализа может варьировать от 40 % до 70 %. При этом установлено, что полифенолы листьев и стеблей отличаются как по компонентному составу, так и по количественному содержанию. Во-вторых, полифенольная композиция сырья исследуемого вида характеризуется определенной естественной вариабельностью: максимальное и минимальное содержание флавоноидов и дубильных веществ в образцах отличается в 3 раза и 1,8 раз, соответственно [4]. Поэтому для получения объективных результатов хроматографирования предлагается наносить на пластинку два объема анализируемой пробы – 5 мкл и 10 мкл. Данный подход является нестандартным решением для аналогичного рода методик, но оправдан для сырья *V. myrtillus* L.

Выбор остальных параметров хроматографирования проводили по совокупности ряда критериев – четкое разделение и компактность зон адсорбций, а также рациональное расположение зон на хроматографической пластинке. Выбранные значения параметров хроматографирования приведены в табл. 1.

Валидационную оценку разработанной хроматографической методики проводили по следующим характеристикам: специфичность, прецизионность и робастность.

Специфичность разработанной методики подтверждали путем визуального сравнения

Таблица 1

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Пластинка	«TLC Silica gel 60 F254» Alluminium sheets (Merck, Германия) размером 200 x 200 мм
Подвижная фаза	этилацетат-хлороформ-спирт метиловый-вода- кислота муравьиная (20:1:1:1)
Объем наносимой пробы	5 мкл и 10 мкл
Стандартный образец	гиперозид (Sigma Aldrich, Cat. No 00180585)
Пробег подвижной фазы	15 см
Реагент детектирования	4 % раствор алюминия хлорида в спирте этиловом 95 %

Таблица 2

Результаты оценки повторяемости разработанной методики

Rf зон адсорбции в испытуемых образцах, соответствующих зоне адсорбции стандартного образца гиперозида								
Пластинка 1			Пластинка 2			Пластинка 3		
0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,24	0,24	0,24
$\Delta Rf = 0,01$								

Таблица 3

Результаты оценки промежуточной прецизионности и воспроизводимости разработанной методики

Номер пробы	Промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность		Воспроизводимость (межлабораторная прецизионность)
	Аналитик 1	Аналитик 2	
	Rf зон адсорбции в испытуемых образцах, соответствующих зоне адсорбции стандартного образца гиперозида		
1	0,25	0,26	0,27
2	0,25	0,26	0,27
3	0,25	0,26	0,27
4	0,25	0,25	0,26
5	0,25	0,25	0,26
6	0,25	0,25	0,26
7	0,24	0,26	0,27
8	0,24	0,26	0,27
9	0,24	0,26	0,27
ΔRf	0,02		
	0,03		

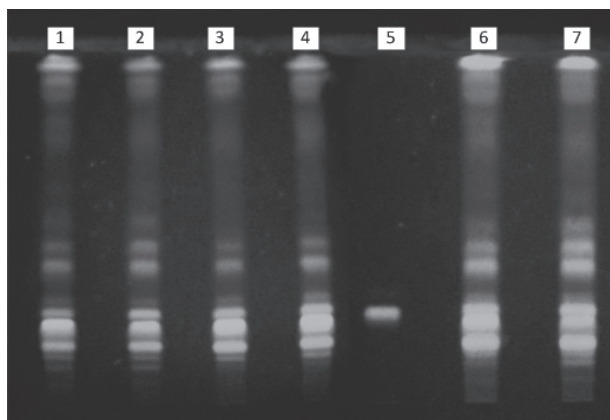


Рис. 1. Хроматограммы образцов *Vaccinium myrtillus* L. (треки 1-4, 6-7), собранные по ареалу вида и хроматограмма стандартного образца гиперозида (трек 5).

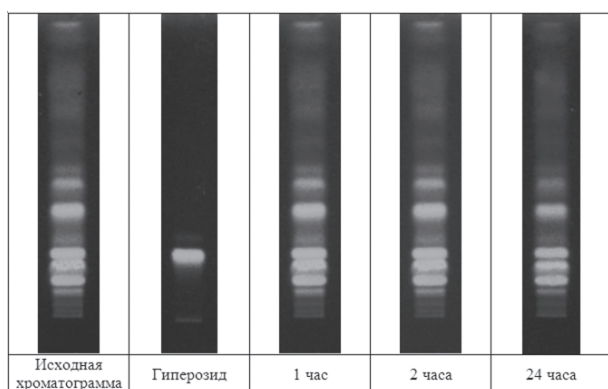


Рис. 2. Оценка устойчивости испытуемых проб перед хроматографированием.

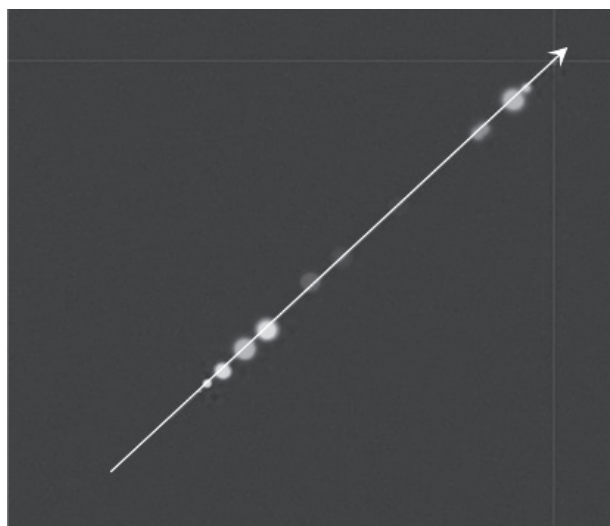


Рис. 3. Оценка устойчивости пробы во время хроматографирования.

хроматографических профилей разных серий *V. myrtillus* L., собранных по ареалу вида в разные периоды вегетации растения, а также путем визуального сравнения зоны адсорбции в треках испытуемых образцов по цвету

и расстоянию от линии старта зоне адсорбции в треке раствора стандартного образца гиперозида.

Как видно на рис. 1, хроматограммы исследуемых образцов *V. myrtillus* L. по количеству, цвету, интенсивности и позициям зон адсорбции совпадают между собой, и в треках испытуемых образцов обеспечивается четкое определение зоны адсорбции, соответствующей по цвету и расстоянию от линии старта зоне адсорбции стандартного образца гиперозида.

Для определения повторяемости значений Rf зоны адсорбции в треках испытуемых образцов, соответствующей зоне адсорбции стандартного образца гиперозида, использовали 3 серии *V. myrtillus* L. Каждый образец наносили на хроматографическую пластинку в трех повторностях. Исследования проводили в течение короткого временного интервала, соблюдая синхронные условия – анализ выполнял один и тот же аналитик, используя

хроматографические пластинки и реактивы одних и тех же серий.

При проведении исследований промежуточной и межлабораторной прецизионности были учтены все возможные требуемые обстоятельства лабораторий, обуславливающие внутри- и межлабораторную вариабельность: сотрудники, временной дрейф, хроматографические пластинки разных серий, реактивы и растворители разных серий и т.д. Для оценки этих параметров валидации использовали данные сходимости представленные в табл. 1 и набор данных, полученных при выполнении методики вторым аналитиком в другой день и данные второй лаборатории.

Критериями приемлемости является вариабельность значений R_f , которая для трех повторностей на одной пластинке не должна превышать 0,01, для повторяемости – 0,02, для промежуточной прецизионности – 0,05 и 0,07 по воспроизводимости [5, 6].

Как видно из табл. 2 и 3, полученные результаты исследований не превышают установленных критериев приемлемости, что свидетельствует о прецизионности разработанной методики в условиях повторяемости, промежуточной прецизионности и воспроизводимости.

Робастность методики проводили на стадии разработки методики. Отрабатывались: экстрагент, время экстракции, состав подвижной фазы, количество наносимой пробы, типы хроматографических пластинок и др. Полученные результаты нашли свое отражение в валидируемой методике.

На этапе валидации были также проведены исследования по стабильности испытуемых проб перед хроматографированием и во время хроматографирования. Для оценки устойчивости испытуемых проб перед хроматографированием этилацетатную фракцию наносили на хроматографическую пластинку сразу после приготовления, а затем через 1 час, 2 часа и 24 часа. Оценка стабильности испытуемых проб во время хроматографирования подтверждалась с помощью двухмерной тонкослойной хроматографии.

На рис. 2 представлена оценка устойчивости испытуемых проб перед хроматографированием где видно, что зоны адсорбции совпадают по количеству, расстоянию от линии старта, цвету, интенсивности и форме. Удовлетворительные результаты получены и по устойчивости испытуемых проб во время хроматографирования. На фотографии 3 видно, что зоны

адсорбции на хроматограмме лежат на одной прямой между точкой нанесения пересечения фронтов подвижных фаз. Таким образом, разработанная методика робастна.

ВЫВОДЫ

1. Разработана и валидирована методика хроматографического определения подлинности побегов *V. myrtillus* L.

2. Полученные результаты включены в проект фармакопейной статьи «Черники обыкновенной побеги – цельные, измельченные и порошок «ангро», принятой на рассмотрение ФГБУ «НЦ ЭСМП» Минздрава России (вх. № 6473 от 23.04.13 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Мечикова Г.Я., Матющенко Н.В., Смирнова О.В. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в побегах *Vaccinium myrtillus* L. // Башкирский химический журнал. – 2013. – Т. 20. – № 2. – С.66–71.

2. Береговых В.В., Пятигорская Н.В., Беляев В.В., Аладышева Ж.И., Мешковский А.П. Валидация в производстве лекарственных средств / Под ред. члена-корреспондента РАМН, профессора В.В. Береговых. – М.: Издательский дом «Русский врач», 2010 г. – 286 с.

3. Валидация аналитических методик для производителей лекарств: Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным союзом фармпроизводителей Германии (ВАН) / Перевод выполнен Ж.И. Аладышевой, О.Р. Спицким, научная редакция В.В. Береговых. – М.: Литтера, 2008 г. – 132.

4. Мечикова Г.Я., Степанова Т.А. Содержание фенольных соединений в побегах некоторых видов рода *Vaccinium* L. флоры Дальнего Востока // Материалы VIII Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты 2-5 октября 2012 г., Москва. – М.: ИФР РАН; РУДН, 2012. – С.389.

5. Reich E., Schibli A. Validation of high-performance thin-layer chromatographic methods for the identification of botanicals in a cGMP environment // Journal of AOAC International. – 2008. – Vol. 91. – No. 1. – С.13–20.

6. Reich E., Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. – New York\$ Stuttgart: Thieme, 2007. – 264 p.

Адрес автора

К.фарм.н. Мечикова, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО ДВГМУ Минздрава России (г. Хабаровск).

galina.m.ya@mail.ru