

УДК 615.322.+633.88

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ ЛАКТОНОВ В ТРАВЕ СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ

Погодин И.С., Лукша Е.А.

ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрава России, Омск, Россия (644043, г. Омск, ул. Ленина, 12), e-mail: ipogodin82@mail.ru

В настоящее время внедрение в медицинскую практику нового лекарственного растительного сырья требует разработки методики количественного определения действующих веществ, соответствующей современным требованиям и прошедшей валидацию согласно рекомендациям ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека). В статье представлены экспериментальные исследования по разработке методики количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в траве соссюреи горькой. Проведена валидация методики по следующим критериям: специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность. Установлено, что предложенная методика является специфичной, линейной в аналитической области, точной и прецизионной. Полученные результаты будут включены в проект фармакопейной статьи «Соссюреи горькой трава».

Ключевые слова: соссюрея горькая, ВЭЖХ, валидация.

ELABORATION METHOD FOR QUANTITATIVE DETERMINATION SESQUITERPENE LACTONES IN HERBS SAUSSUREA AMARA

Pogodin I.S., Luksha E.A.

Omsk State Medical Academy Russian Ministry of Health, Omsk, Russia (644043, Omsk, Lenin str., 12) e-mail: ipogodin82@mail.ru

Currently, the introduction into clinical practice of new medicinal plants requires the development of methods of quantitative determination of the active ingredients, corresponding to modern requirements and passed validation as recommended by ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use). The article presents experimental studies on the development of methods of quantitative determination of sesquiterpene lactones by reverse-phase HPLC in the grass *Saussurea amara*. Conducted validation methodology on the following criteria: specificity, linearity, precision (reproducibility) and accuracy. Found that the proposed method is specific, linear in the analytical area, accurate and precision. The results will be included in the project pharmacopoeial article "Saussurea amara herbs."

Keywords: *Saussurea amara*, HPLC, validation.

Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.) – лекарственное растение из семейства сложноцветных (*Compositae*), произрастающее на территории Сибири и Дальнего Востока [6]. В народной медицине и скрининговых фармакологических исследованиях обнаружена туберкулоцидная, антипротозойная, противоопухолевая, антибактериальная, желчегонная активность [1; 2; 9]. Таким образом, перспективность внедрения в медицинскую практику нового растительного лекарственного сырья «Соссюреи горькой трава» как противоописторхозного средства не вызывает сомнений.

Фитохимические исследования надземной части соссюреи горькой показали, что одной из действующих групп биологически активных веществ (БАВ) являются сесквитерпеновые лактоны, обладающие антипаразитарной (противоописторхозной и противолямблиозной) активностью [4].

Для использования надземной части сосюреи горькой в качестве лекарственного растительного сырья необходимо разработать нормативную документацию, регламентирующую показатели подлинности и доброкачественности нового лекарственного растительного сырья.

Одним из важнейших показателей доброкачественности является количественное определение действующих групп БАВ.

Введение новой методики количественного определения обязательно предполагает проведение целого комплекса валидационных исследований согласно рекомендациям ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use – Международная конференция по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека) [5; 10].

Из всего вышесказанного следует, что **целью** нашей работы являлась разработка методики количественного определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой.

Материалы и методы

Для разработки методики количественного определения сесквитерпеновых лактонов использовали 10 образцов сырья травы сосюреи горькой, собранных в период 2010–2011 гг. в фазу массового цветения на территории Новосибирской, Тюменской, Курганской и Омской областей в пределах естественного ареала растения. Сушку сырья производили воздушно-теневым способом.

Для разработки методики количественного определения использовали метод обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Shimadzu LC-20 Prominence в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом PerfectSil 300 ODS C18, 4,6 x 250 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50;
- детектирование при длине волны 204 нм;
- температура колонки – комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Количественное содержание сесквитерпеновых лактонов в исследуемых образцах в процентах определяют методом сравнения со стандартным образцом (СО).

Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения LC Solutions.

Результаты и их обсуждение

Проведенные ранее фитохимические исследования [7] комплекса сесквитерпеновых лактонов сосюреи горькой показали, что содержащиеся в растении сесквитерпеновые лактоны, относятся к группе гваянолидов – гроссгемин, репин и цинаропикрин, из которых преобладающим является цинаропикрин.

Таким образом, опираясь на данные ВЭЖХ-анализа, можно сделать вывод о необходимости при разработке методик количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом ВЭЖХ делать пересчет на доминирующее вещество – цинаропикрин.

Методика: около 0,100 г (точная навеска) травы сосюреи горькой трижды экстрагируют смесью хлороформ – спирт этиловый в соотношении 4:1 при нагревании. Растворитель удаляют на ротационном испарителе. К сухому остатку приливают 10 мл подвижной фазы, растворяют при нагревании на водяной бане, охлаждают и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф.

Приготовление стандартного образца: около 0,005 г (точная навеска) СО цинаропикрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл подвижной фазы, нагревают на водяной бане до полного растворения образца и охлаждают. Доводят объем раствора до метки растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф.

Содержание цинаропикрина X (%) в пересчете на массу сырья в траве сосюреи горькой вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_o \times P \times 100 \times 100}{S_o \times m \times (100 - W) \times 100}$$

где S_o – площадь пика на хроматограмме раствора СО цинаропикрина (по данным LC Solutions);

S – площадь пика цинаропикрина на хроматограмме испытуемого раствора (по данным LC Solutions);

m_o – навеска СО цинаропикрина, в г;

m – навеска сырья сосюреи горькой, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в %;

P – содержание цинаропикрина в стандартном образце цинаропикрина, в %.

По результатам количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ было установлено, что содержание сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин в надземной части сосюреи горькой составляет $0,608 \pm 0,024\%$ (табл. 1).

Таблица 1 – Метрологическая характеристика метода количественного определения сесквитерпеновых лактонов в сосюреи горькой

n	\bar{X}_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$\bar{X} \pm \Delta x$
10	0,608	$0,55 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	2,26	$0,608 \pm 0,024$

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик: специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [5; 10].

Специфичность. Идентификация цинаропикрина подтверждалась совпадением времени удерживания анализируемого компонента и СО цинаропикрина (рис. 1, 2). Пики сопутствующих и родственных соединений, входящих в состав извлечения сосюреи горькой, хорошо разделяются с пиком цинаропикрина, время удерживания которого 11,25 мин, и не влияют на аналитическое определение.

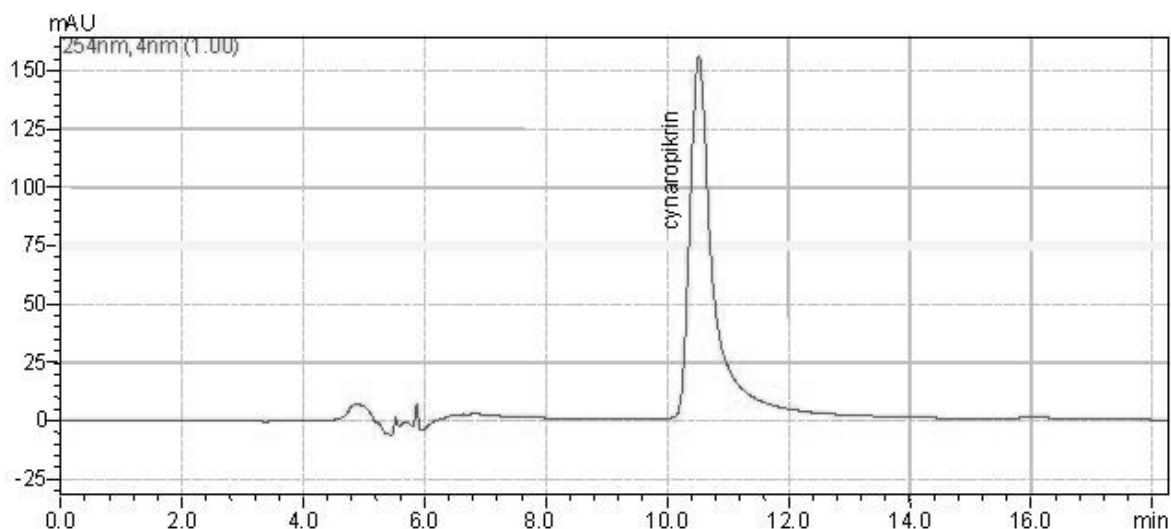


Рис. 1. Хроматограмма стандартного образца цинаропикрина:
по оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU.

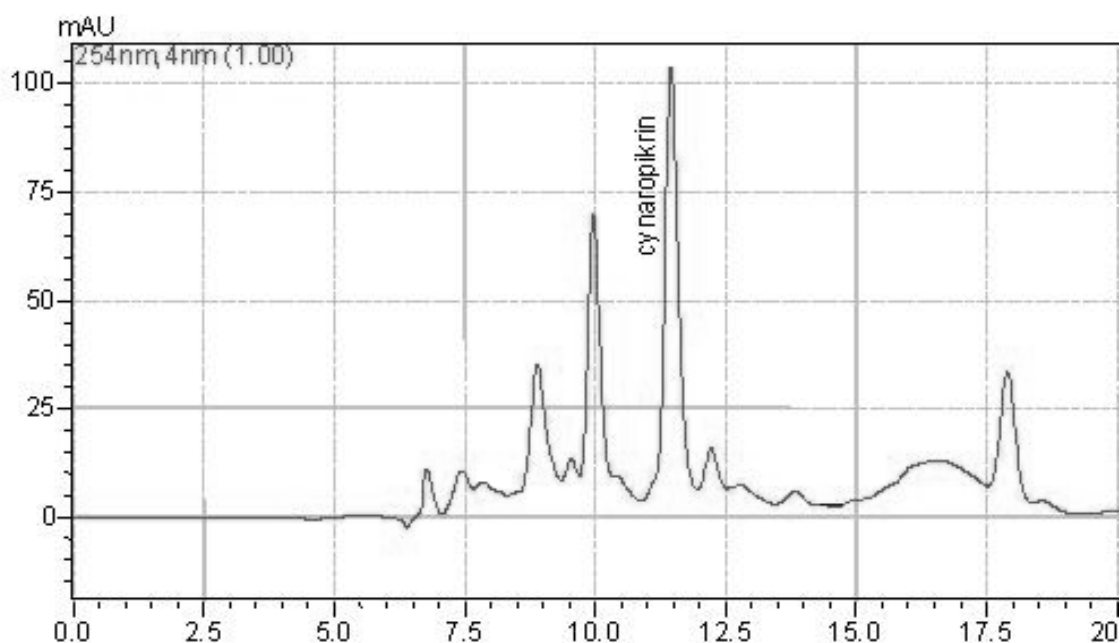


Рис. 2. Хроматограмма извлечения сосюреи горькой (цинаропикрин $t_R=11,25$):
по оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU

Линейность и аналитическая область методики была подтверждена анализом 7 проб разных концентраций в диапазоне от 70 до 130% от концентрации, принятой за 100% [8]. Сравнение зависимости между содержанием цинаропикрина (мг/мл) в испытуемых растворах и величинами площадей хроматографических пиков показало, что она имеет линейный характер. Результаты исследований представлены в таблице 2, графическая зависимость отражена на графике (рис. 3).

Таблица 2 – Результаты определения линейности методики

№ п/п	Концентрация цинаропикрина, мг/мл	Площадь пика цинаропикрина, mAU
1	0,425	469,99
2	0,485	537,13
3	0,544	604,27
4	0,612	671,41
5	0,670	738,55
6	0,733	805,69
7	0,786	872,84

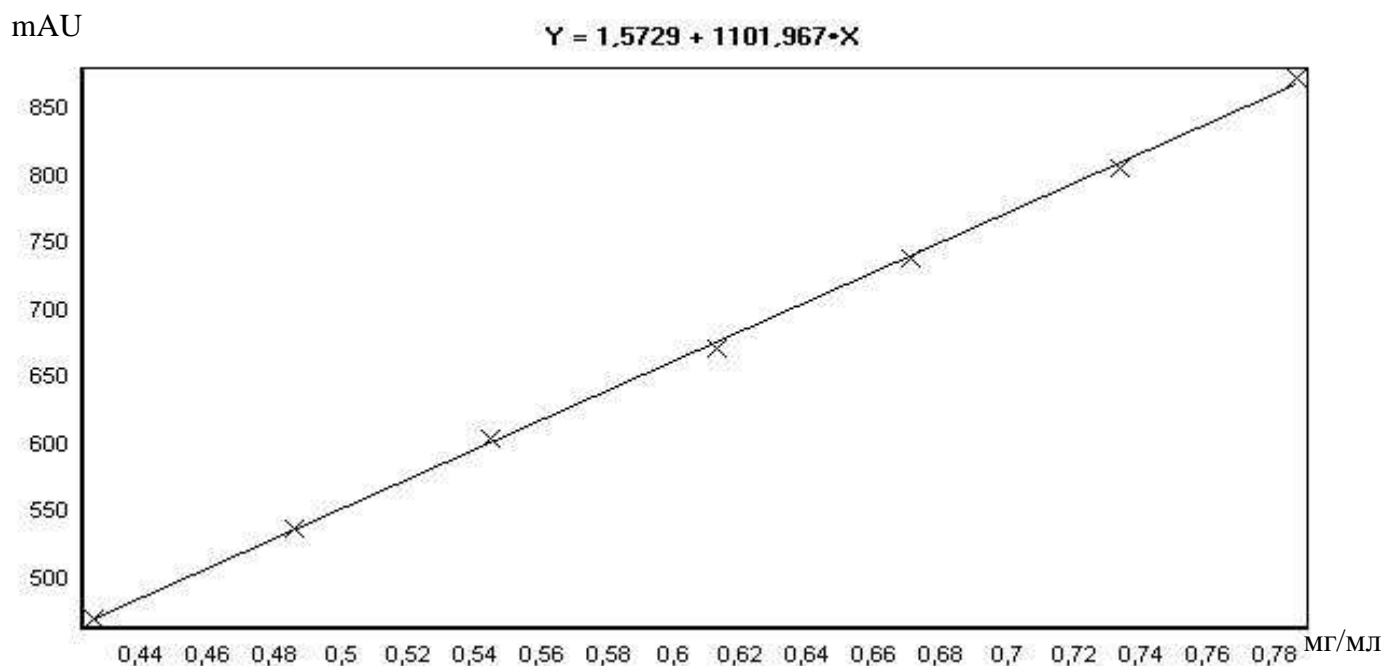


Рис. 3. Градуировочный график зависимости площадей хроматографических пиков от содержания цинаропикрина в траве сосюреи горькой: по оси абсцисс (x) – концентрация, мг/мл; по оси ординат (y) – высота пика, mAU.

Установлено, что в заданной области концентраций сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой график имеет линейный характер и описывается уравнением $y=1101,97 \cdot X+1,57$. Коэффициент корреляции (r) равен 0,999, что позволяет использовать данную методику для количественного определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой в данном диапазоне концентраций.

Для установления *прецизионности (воспроизводимости)* проводили 7 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты определения прецизионности методики.

№ п/п	Найденное содержание сесквитерпеновых лактонов, %	$(X_i - \bar{X})$	$[(X_i - \bar{X})^2] \times 10^{-6}$	Метрологические характеристики
1	0,606	-0,002	4	$\bar{X} = 0,608 \%$ $SD = 0,087$ $RSD = 1,25 \%$
2	0,618	0,010	100	
3	0,605	-0,003	9	
4	0,621	0,013	169	
5	0,597	-0,011	121	
6	0,601	-0,007	49	
7	0,606	-0,002	4	

В разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5%, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях [3].

Для определения точности методики проанализировали 9 образцов травы сосюреи горькой на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области. Для оценки полученных результатов использовали открываемость (R), которая, согласно требованиям нормативной документации, должна находиться в пределах $\pm 2\%$ [3].

В результате получены 9 значений открываемости, для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты определения точности методики определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой

№ п/п	Уровень	Навеска сырья, в г	Найденное содержание СЛ, %	Расчетное содержание СЛ, %	Открываемость (R), %	$(R_i - \bar{R})$	$(R_i - \bar{R})^2$	Метрологические характеристики
1	1	0,0511	0,312	0,311	100,32	0,56	0,3136	$\bar{R} = 99,76\%$ SD=0,439 RSD=0,440 %
2	1	0,0508	0,311	0,311	100	0,24	0,0576	
3	1	0,0496	0,310	0,311	99,68	-0,08	0,0064	
4	2	0,1042	0,605	0,607	99,67	-0,09	0,0081	
5	2	0,1037	0,604	0,607	99,51	-0,25	0,0625	
6	2	0,1046	0,607	0,607	100	0,24	0,0576	
7	3	0,1512	0,901	0,901	100	0,24	0,0576	
8	3	0,1497	0,890	0,901	98,78	-0,98	0,9604	
9	3	0,1518	0,900	0,901	99,89	0,13	0,0169	

Результаты определения точности методики показали, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи практически полностью совпадают. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5%, а открываемость R составляет 99,76%, что характеризует точность методики как удовлетворительную.

Установлено, что предлагаемая методика количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом ВЭЖХ в траве сосюреи горькой является специфичной, воспроизводимой и точной, что предполагает рекомендовать данную методику при контроле качества лекарственного растительного сырья «Сосюреи горькой трава».

Список литературы

1. Биологическая активность *Saussurea amara* / Л.Д. Модонова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 1986. – № 12. – С. 1472-1475.
2. Вичканова С.А. Антимикробная активность видов рода *Saussurea* DC. / С. А. Вичканова, М. А. Рубинчик, А. И. Шретер // Растительные ресурсы. – 1969. – Т. 5. Вып. 2. – С. 224-229.
3. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» : в 6 ч. – Введ. 23.04.02. – М. : Госстандарт России; Изд-во стандартов, 2002.
4. Краснов Е.А. Флора Сибири – источник биологически активных веществ и лекарственных средств // Бюллетень сибирской медицины. Приложение 2. – 2006. – Т. 5. – С. 11-18.
5. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н.В. Юргеля [и др.]. – М. : Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.
6. Серых Г.И. *Saussurea* DC. – Сосюрея, Горькуша. / Г.И. Серых, О.С. Жирова, И.М. Красноборов // Флора Сибири. Т. 13: Asteraceae (Compositae). – Новосибирск : Наука, 1997. – С. 180-209.
7. Фитохимическое исследование надземной части сосюреи горькой (*Saussurea amara* L.) / И.С. Погодин [и др.] // Омский научный вестник. Сер. «Ресурсы Земли. Человек». – 2010. – № 1 (94). – С. 115-118.
8. Эпштейн Н.А. Оценка пригодности (валидации) ВЭЖХ-методик в фармацевтическом анализе (обзор) // Хим.-фарм. ж. – 2004. – Т. 38. – № 4. – С. 40-56.
9. Choleric Effects of the Mongolian Medicinal Plant *Saussurea amara* in the Isolated Perfused Rat Liver / Glasl S. [other] // *Planta Med.* – 2007. – № 73 (1) – P. 59-66.
10. ICH Q2B / Validation of analytical procedure: Methodology // International Conference for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. – Geneva, 1996. – 75 с.

Рецензенты:

Гришин А.В. д. фарм. н., профессор, зав. кафедрой фармации ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрава России, г. Омск.

Пеньевская Н.А. д. мед. н., доцент, зав. кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологии ГБОУ ВПО «ОмГМА» Минздрава России, г. Омск.