

## РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА В БРУСНИКИ ЛИСТЬЯХ И ТОЛОКНЯНКИ ЛИСТЬЯХ МЕТОДОМ КАПИЛЛЯРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Рознятовская А.А.<sup>1</sup>, Сенченко С.П.<sup>1</sup>, Харахашян А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532 Ставропольский край, г.Пятигорск пр-кт Калинина 11), [rozniatovskaya@mail.ru](mailto:rozniatovskaya@mail.ru)

<sup>2</sup>ГБОУ ВПО РостГМУ Минздрава России (344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский, 29)

Представлены результаты разработки методик количественного определения арбутина в брусники листьях (*Vitis – idaeaefolia*) и толокнянки листьях (*Uvaeursifolia*) методом капиллярного электрофореза. Показано, что использование боратного электролита с pH 9,0 является достаточным для ионизации арбутина. При этом рабочие параметры были следующие: кварцевый капилляр диаметром 50 мкм с эффективной длиной 65 см; детектирование осуществлялось спектрофотометрически при 254 нм; напряжение составляло 20 кВ. В указанных условиях удалось достигнуть приемлемого разделения арбутина с сопутствующими компонентами сырья. Разработанная методика была подвергнута процедуре валидации по показателям: линейность, прецизионность и правильность. С использованием разработанной и валидированной методики установлено следующее содержание арбутина в сырье: брусники листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80614) – 6,21%±0,27, толокнянки листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80714) – 14,49%±0,54.

Ключевые слова: арбутин, капиллярный электрофорез, толокнянки листья, брусники листья.

## DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE ARBUTIN QUALITATIVE ANALYSIS IN COWBERRIES LEAVES AND BEARBERRY LEAVES USING THE CAPILLARY ELECTROPHORESIS METHOD

Roznyatovskaya A.A.<sup>1</sup>, Senchenko S.P.<sup>1</sup>, Kharakhashyan A.A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Pyatigorsk medico-pharmaceutical institute – branch to Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532 Stavropol region, Pyatigorsk, st. Kalinin 11), [rozniatovskaya@mail.ru](mailto:rozniatovskaya@mail.ru)

<sup>2</sup>The Rostov State Medical University (29, Nakhichevansky Street, Rostov-on-Don, 344022, Russia)

The results of development of the method for qualitative analysis of arbutin in cowberry leaves and bearberry leaves using the capillary electrophoresis method have been represented. It has been shown that the use of borate electrolyte with pH 9.0 is enough for arbutin ionization. At that, the operational characteristics were as follows: the quartz capillary with the diameter of 50 microns with the effective length of 65 cm; the detection was done in the spectrum photometric way at 254 nanometers; the voltage was 20 kV. In the indicated conditions, it proved to be possible to reach acceptable separation of arbutin and the accompanying raw material components. The developed method has been validated using the following characteristics: linearity, precision and accuracy. Using the developed and validated method, the following content of arbutin in the raw material has been determined: 6.21%±0,27 of cowberry leaves (OAO Krasnogorskleksredstva, series 80614), 14.49%±0.54 of bearberry leaves (OAO Krasnogorskleksredstva, series 80714).

Keywords: arbutin, capillary electrophoresis, bearberry leaves, cowberry leaves.

На сегодняшний день неотъемлемой частью номенклатуры лекарственных средств назначаемых в комплексной терапии воспалительных заболеваний мочевого пузыря и мочевыводящих путей (циститы, уретриты) является лекарственное растительное сырье, основные из которых это брусники листья (*Vitis – idaeaefolia*) и толокнянки листья (*Uvae ursifolia*). Мочегонные и уроантисептические свойства данных растительных объектов связаны в первую очередь с фенольными гликозидами арбутином и метиларбутином, а также с гидрохиноном и его метиловым эфиром [1].

Согласно нормативной документации на данные виды сырья, содержание арбутина в них должно быть не менее 6 % (толокнянки листья) и 4,5 % (брусники листья).

Следует сказать, что все нормативные документы на указанные виды сырья в качестве методики количественного определения арбутина предлагают использовать окислительно-восстановительное титрование йодом. Важно также отметить, что методика обременена сложными процедурами пробоподготовки и очистки, занимающими длительное время и невольно приводящими к возрастанию случайной погрешности. Кроме того, в итоге осуществляется титрование не только арбутина, а некоего комплекса, близких по химическим свойствам, веществ, что также не позволяет оценить истинное содержание арбутина.

Решение указанных вопросов возможно с использованием сепарационных методов анализа (ВЭЖХ, капиллярного электрофореза (КЭ)). И на сегодняшний день известно ряд ВЭЖХ-методик количественного определения арбутина в сырье [2-4]. В то же время использование КЭ может быть более оправданным, поскольку не требуется дорогостоящих растворителей и колонок. Кроме того, наличие более высоких параметров эффективности является ключевым преимуществом при анализе сложных растительных объектов, содержащих десятки, а порой и сотни соединений.

### **Цель работы**

Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в толокнянки листьях и брусники листьях с применением капиллярного электрофореза.

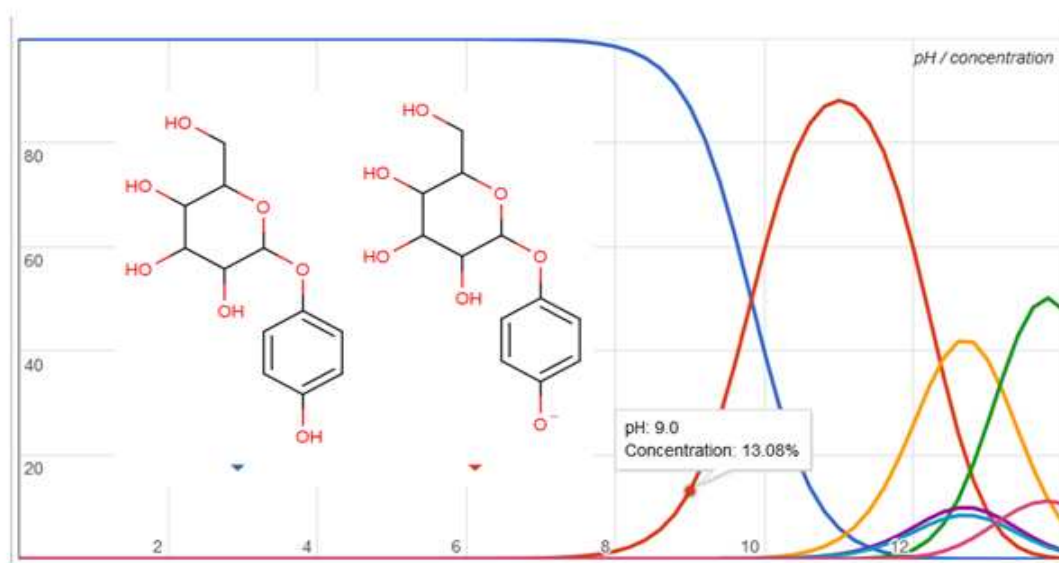
### **Материалы и методы исследования**

Для исследования использовали стандартный образец (СО) арбутина (Sigma, с содержанием не менее 98%), а так же образцы сырья толокнянки листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80714) и брусники листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80614).

Работу проводили с использованием системы капиллярного электрофореза Капель 103 Р (группа компаний Люмэкс, Россия) с кварцевым капилляром диаметром 50 мкм, общей длиной 75 см и эффективной длиной 65 см. Детектирование осуществляли спектрофотометрически при 254 нм в катодной области капилляра. Напряжение составляло 20 кВ (блок положительной полярности). Для подготовки капилляра и восстановления его поверхности проводили его последовательную промывку водой, 0,5 М раствором кислоты хлористоводородной, водой, 0,5 М раствором натрия гидроксида, водой и затем ведущим электролитом.

В работе реализовывался вариант зонного электрофореза, где в качестве ведущего электролита использовали 0,01М боратный буферный раствор с рН 9,0. Выбор электролита

связан с тем, что при данном значении рН, арбутин ионизируется по фенольному гидроксилу (Рисунок 1), являясь при этом заряженной частицей.



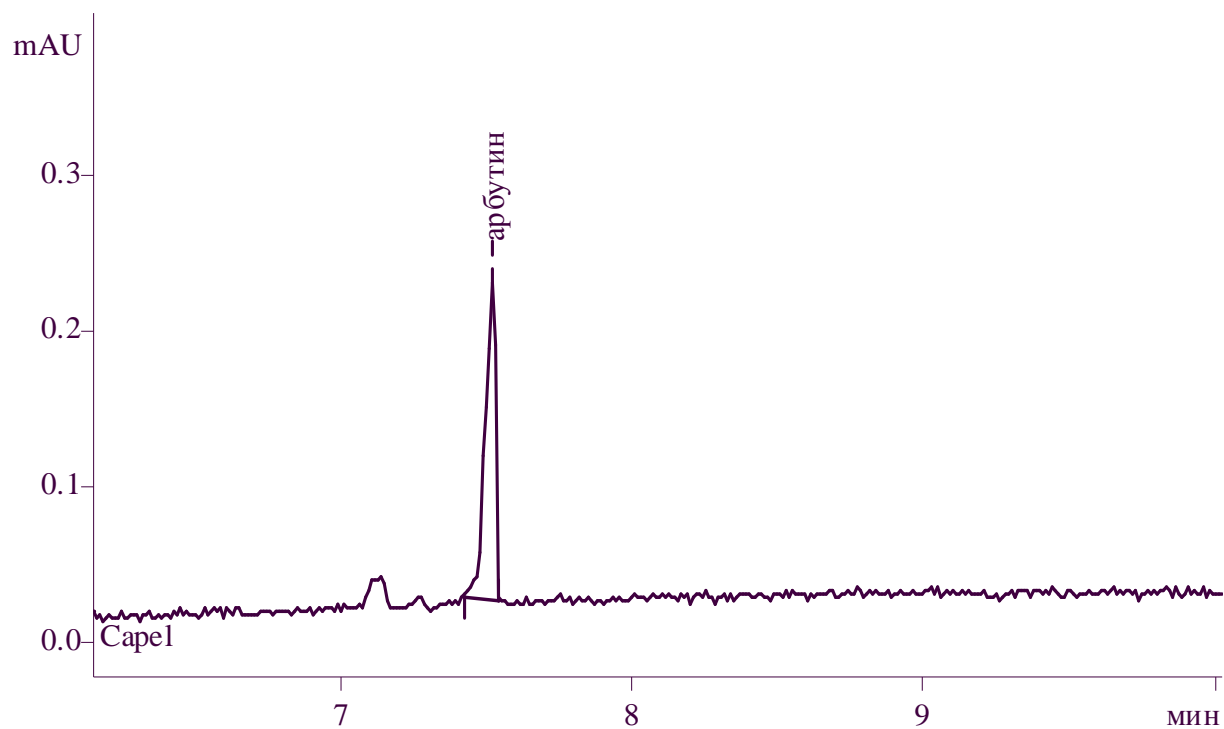
**Рисунок 1.** Зависимость степени ионизации арбутина от рН среды (по данным <http://www.chemicalize.org>).

Важно отметить, что при данном значении рН электролита арбутин ионизирован всего на 13 %, однако даже в этих условиях он обладает, хоть и незначительной, эффективной электрофоретической подвижностью.

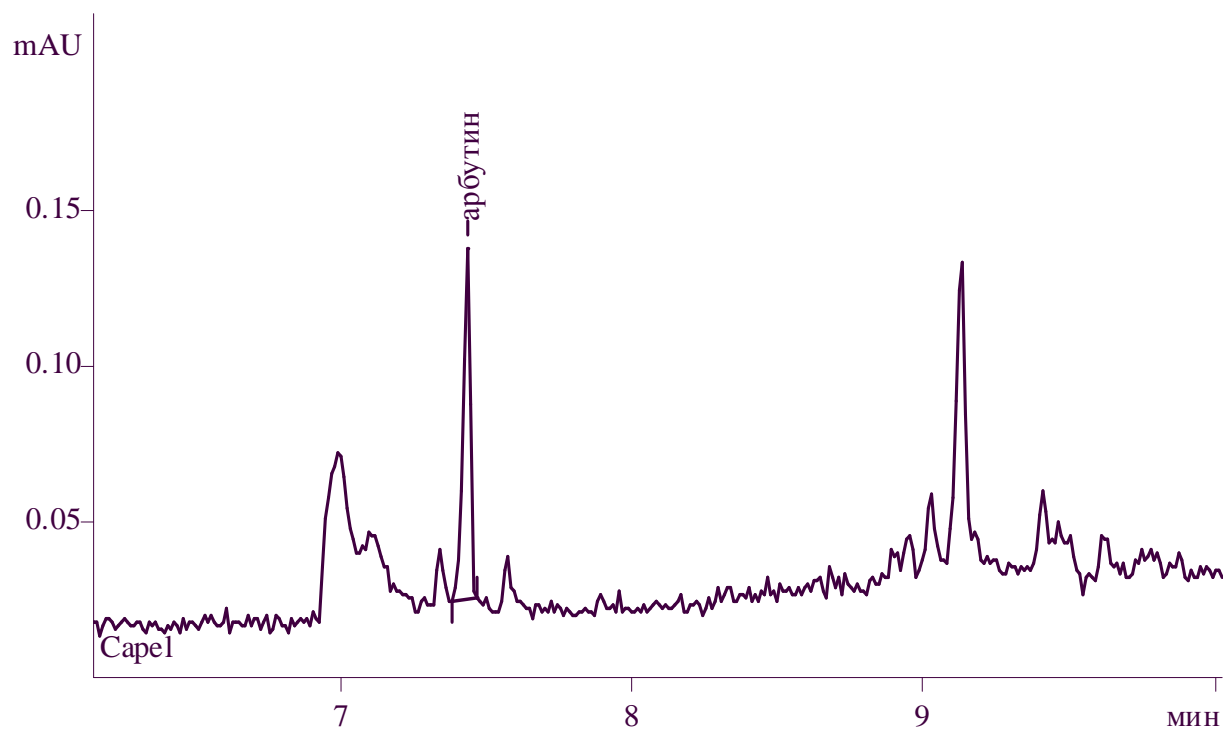
Извлечение арбутина из сырья проводили в соответствии с методикой, приведенной в нормативной документации на анализируемое лекарственное растительное сырье. Для этого точную навеску (около 0,5 г) сырья помещали в коническую колбу вместимостью 100мл, заливали 50 мл воды и присоединяли к обратному холодильнику. Нагревание вели на плитке, поддерживая слабое кипение, в течение 30 минут. Горячее извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл через бумажный фильтр диаметром 7 см. В колбу с сырьем повторно прибавляли 25 мл воды и кипятили в течение 20 минут. Повторное горячее извлечение фильтровали, объединяя извлечения. Остаток на фильтре промывали 20 мл горячей воды, также объединяя все извлечения. После охлаждения раствор доводили до метки водой и перемешивали. Далее 1 мл полученного раствора центрифугировали 5 мин при  $8000 \text{ мин}^{-1}$  и подвергали его анализу.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

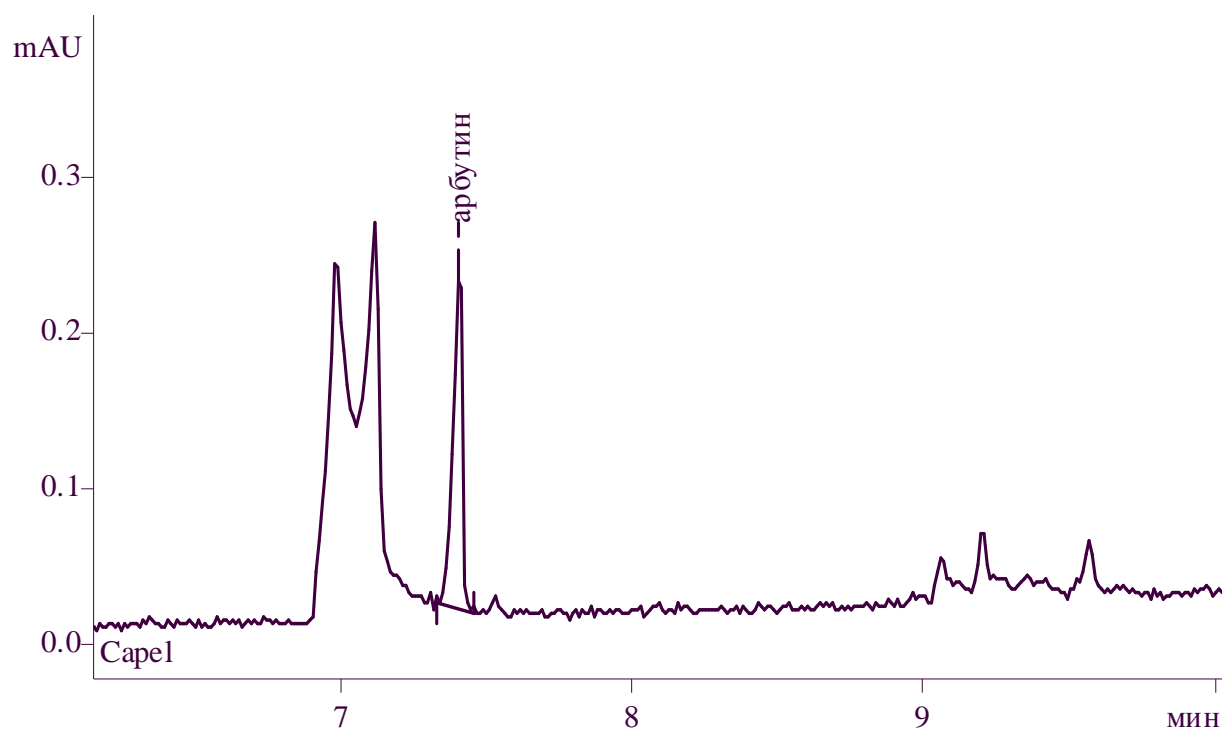
На рисунках 2-4 представлены электрофореграммы раствора СО арбутина, а также извлечений брусники листьев и толокнянки листьев.



**Рисунок 2.** Электрофореграмма раствора СО арбутина



**Рисунок 3.** Электрофореграмма извлечения брусники листьев

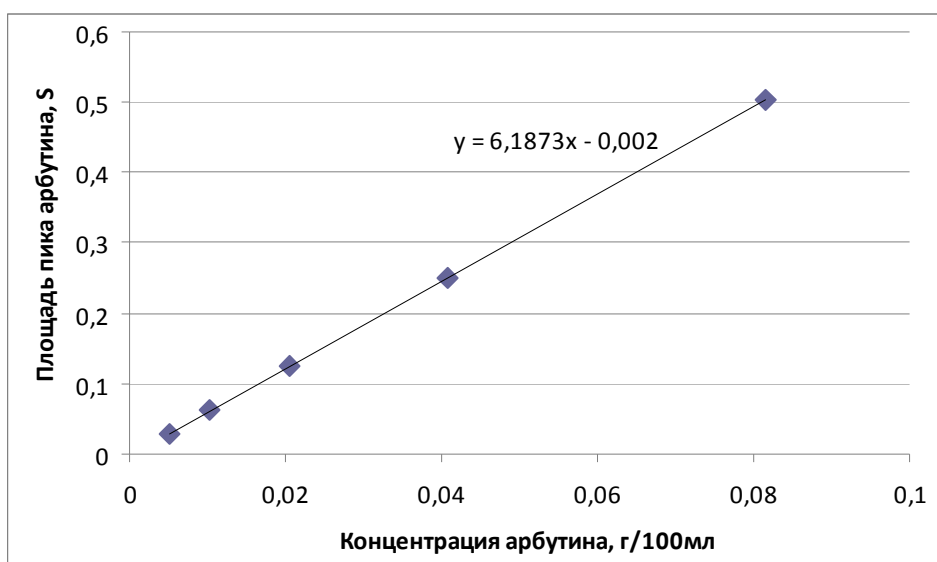


**Рисунок 4.** Электрофореграмма извлечения толокнянки листьев

В результате в обоих видах сырья было установлено наличие арбутина. При этом коэффициент его разделения с сопутствующими компонентами пробы был достаточным для его количественного определения.

Следующим этапом исследований была валидационная оценка разработанной методики по показателям: линейность, прецизионность и правильность.

Линейность методики определялась по итогам анализа серии растворов СО арбутина различной концентрации (от 0,0051 до 0,0816 г/100мл). На рисунке 5 представлен градуировочный график зависимости площади пика арбутина от его концентрации в растворе. Полученная зависимость имеет линейный характер и описывается следующим уравнением:  $y=6,1873x-0,002$ . При этом коэффициент корреляции ( $r$ ) был равен 0,999995, что позволяет использовать данное уравнение для количественного определения арбутина в указанном диапазоне концентраций.



**Рисунок 5.** Градуировочный график зависимости площади пика от концентрации арбутина в растворе

Для установления прецизионности (воспроизводимости) проводили 6 параллельных определений для каждого образца сырья. Расчет содержания (%) проводили по уравнению градуировочного графика арбутина, в пересчете на воздушно сухое сырье. Результаты оценки прецизионности методики количественного определения арбутина в брусники листьях и толокнянки листьях приведены в таблице 1-2.

**Таблица 1**

Результаты оценки прецизионности методики количественного определения арбутина в брусники листьях

Навеска, г	Площадь пика, S	Содержание, %	Характеристики
0,4999	0,167	6,28	$X_{cp} = 6,21 \%$ $SD = 0,27$ $RSD = 4,26\%$
0,5013	0,173	6,47	
0,5069	0,165	6,12	
0,5222	0,162	5,83	
0,5119	0,165	6,04	
0,5017	0,174	6,52	

**Таблица 2**

Результаты оценки прецизионности методики количественного определения арбутина в толокнянки листьях

Навеска, г	Площадь пика, S	Содержание, %	Характеристики
0,5106	0,416	15,21	$X_{cp} = 14,49 \%$ $SD = 0,54$
0,5102	0,403	14,75	

0,5030	0,389	14,44	RSD= 3,73 %
0,5041	0,3715	13,76	
0,5006	0,396	14,77	
0,5101	0,382	13,98	

Полученные результаты свидетельствуют о приемлемых значениях случайной погрешности, что свидетельствует о валидности методики по данному показателю.

Изучение правильности методики проводили путем анализа 9 образцов каждого сырья на трех уровнях концентраций. Оценку правильности методики проводили по открываемости ( $R$ , %). Результаты данной оценки представлены в таблице 3-4.

**Таблица 3**

Результаты оценки правильности методики количественного определения арбутина в брусники листьях

№ п/п	Уровень	Навеска, г	Теоретическое содержание арбутина в навеске сырья, мг	Найденное содержание арбутина в навеске сырья, мг	Открываемость ( $R$ ), %	Характеристики
1	1	0,3527	21,90	21,55	98,40	$R_{cp} = 100,57\%$ $SD = 3,26$ $RSD = 3,24\%$
2	1	0,3502	21,75	21,75	100,00	
3	1	0,3720	23,10	24,70	106,93	
4	2	0,4999	31,04	31,39	101,13	
5	2	0,5013	31,13	32,43	104,18	
6	2	0,5069	31,48	31,02	98,54	
7	3	0,6510	40,43	39,91	98,71	
8	3	0,6572	40,81	41,21	100,98	
9	3	0,6520	40,49	38,99	96,30	

**Таблица 4**

Результаты оценки правильности методики количественного определения арбутина в толокнянки листьях

№ п/п	Уровень	Навеска, г	Теоретическое содержание арбутина в навеске сырья, мг	Найденное содержание арбутина в навеске сырья, мг	Открываемость (R), %	Характеристики
1	1	0,3528	51,12	51,31	100,37	$R_{cp} = 100,17\%$ $SD = 3,71$ $RSD = 3,71\%$
2	1	0,3580	51,87	50,83	98,00	
3	1	0,3679	53,31	51,21	96,06	
4	2	0,5041	73,04	70,09	95,96	
5	2	0,5006	72,54	73,94	101,93	
6	2	0,5101	73,91	71,31	96,48	
7	3	0,6597	98,59	101,08	102,53	
8	3	0,6555	94,98	99,96	105,24	
9	3	0,6548	94,88	99,59	104,96	

Полученные результаты свидетельствуют, что значения открываемости для обоих веществ находятся в пределах 98 – 102%, что согласно общепринятым рекомендациям [5] свидетельствует о валидности методики по данному показателю.

С использованием разработанной и валидированной методики были получены следующие результаты количественного содержания арбутина в изучаемых образцах. Результаты представлены в таблице 5.

**Таблица 5**

Результаты количественного определения арбутина в брусники листьях и в толокнянки листьях

Образец	Содержание арбутина, % $\pm$ SD
Толокнянки листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80714)	14,49 $\pm$ 0,54
Брусники листья (ОАО «Красногорсклексредства», серия 80614)	6,21 $\pm$ 0,27



Полученные данные свидетельствуют о значительном содержании арбутина в изучаемых образцах. Кроме того, имеет место явное занижение нормативных показателей по содержанию арбутина в сырье, особенно в случае с толокнянки листьями.

### **Выводы**

Разработана методика количественного определения арбутина в толокнянки листьях и брусники листьях с использованием капиллярного электрофореза. Разработанная методика была валидирована по основным показателям, что подтверждает возможность ее использования для количественного определения арбутина в указанном сырье.

### **Список литературы**

1. Толокнянка обыкновенная *Arctostaphylosuva-ursi* (L.) Spreng. Р. В. Куцик, Б. М. Зузук., А.Т. Недоступ, Т. Пецко. Провизор Выпуск №18 2003 ([http://www.provisor.com.ua/archive/2003/N18/art\\_27.php](http://www.provisor.com.ua/archive/2003/N18/art_27.php)).
2. Моисеев Д.В. Кинетика реакции деструкции арбутина в листьях брусники обыкновенной при хранении в естественных и стрессовых условиях // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье».2013. №2. С. 106-111.
3. Thongchai W, Liawruangrath B, Liawruangrath S. High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts.// J Cosmet Sci.2007. Jan-Feb;58(1). P. 35-44.
4. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004.—240 с.
5. Guidelines for standard method performance requirements. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа:[http://www.aoac.org/imis15\\_prod/AOAC\\_Docs/StandardsDevelopment/eoma\\_appendix\\_f.pdf](http://www.aoac.org/imis15_prod/AOAC_Docs/StandardsDevelopment/eoma_appendix_f.pdf).

### **Рецензенты:**

Компанцева Е.В., д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической и токсикологической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г.Пятигорск.

Оганесян Э.Т., д.фарм.н., профессор, зав. кафедрой органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск.