

УДК 615.32/.31

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АРБУТИНА В ЛИСТЬЯХ БАДАНА
ТОЛСТОЛИСТНОГО МЕТОДОМ ВЭЖХ****VALIDATION OF ASSAY OF ARBUTINE IN LEAVES OF BERGENIA BY HPLC****Д.В. Моисеев
D.V. Moiseev***Витебский государственный медицинский университет
Белоруссия, 210000, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27**Vitebsk State Medicinal University
Belorussia, 210000, Vitebsk, Frunze Av., 27**E-mail: ussr80@yandex.ru*

Аннотация. Представлена простая и экспрессная методика определения арбутина в листьях бадана толстолистного (*Bergenia crussifolia* L.) методом ВЭЖХ. Для экстракции используется вода очищенная. Определение арбутина проводится на обращено-фазовой колонке (Zorbax SB C-18 250×4.6 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования; подвижная фаза 0.01 М КН₂Р₀4 (рН=3.0) и ацетонитрил; температура колонки 30° С. Представленную методику можно использовать для идентификации и количественного определения арбутина в растительном сырье.

Resume. Simple and fast procedure for assay of arbutine in leaves of bergenia (*Bergenia crussifolia* L.) by HPLC is described. For extraction a pure water are used. Determination of arbutine are provided in reverse-phase column (Zorbax SB C-18 250×4.6 mm, 5 mkm) - gradient elution; a mobile phase 0.01M potassium dihydrophosphate (pH=3.0) and acetonitrile; column temperature 30° C are used. Presented method are offered to be used for identification and assay of arbutine in plants.

Ключевые слова: бадан толстолистный, ВЭЖХ, арбутин, *Bergenia crussifolia*, валидация.
Keywords: leather bergenia, HPLC, arbutine, *Bergenia crussifolia*, validation.

Введение

Актуальность использования лекарственных растений неизмеримо возросла в последние годы. Это обусловлено тем, что в связи с возросшей продолжительностью жизни людей увеличивается число лиц с сочетанной патологией, требующей одновременного приема ряда лекарственных средств. Преимуществом лекарственных растений является их малая токсичность и возможность длительного применения без существенных побочных явлений для лечения и профилактики различных заболеваний. По различным данным, в мире разрешены к применению в медицинской практике более чем 600 лекарственных средств растительного происхождения.

Бадан толстолистный - *Bergenia crussifolia* (L.) Fritsch. из семейства камнеломковых (*Saxifragaceae*). Многолетнее растение с ползучим прямо по поверхности земли, сильно ветвящимся толстым корневищем длиной до нескольких метров. Все его листья прикорневые, широко-овальные, имеют длину от 20 до 30 см и ширину до 20 см, расположены на длинных широких черешках. Листовые пластинки кожистые, толстые, темно-зеленые, блестящие. Осенью они приобретают красный и бурый цвет. Листья бадана обладают кровоостанавливающим, противовоспалительным и вяжущим действием. Листья бадана применяют при болезнях пищеварительной системы (колитах, энтероколитах, гипосекреторном гастрите), при аллергии, для нормализации обмена веществ. Отвар листьев оказывает антигипоксическое и желчегонное действие, обладает антибактериальной активностью в отношении грамположительных бактерий, в гинекологической практике при различных кровотечениях. Сухие листья бадана используют для приготовления так называемого «монгольского чая», имеющего тонизирующие свойства, улучшающего обмен веществ в организме и нормализующего давление [Яковлев, 2010]. Листья бадана содержат до 20% арбутина и

2-4% свободной галловой кислоты и гидрохинона [Муравьева и др., 2002]. В процессе вегетации содержание арбутина в листьях бадана колеблется от 9% (в октябре) до 18,5% (в июне). При этом наибольшее содержание арбутина в пересчете на единицу сырья составляет 35-45 мг/лист и приходится на конец июня и июль [Моисеев, 2013]. Арбутин является наиболее удобным соединением для проведения количественного анализа при стандартизации листьев бадана толстолистного, а его содержание регламентируется на уровне не менее 5% [Яковлев, 2010].

В литературе описаны различные подходы к определению арбутина в растительных объектах и лекарственных формах. В частности, для листьев брусники предлагается использовать тонкослойную хроматографию с денситометрическим определением концентраций [Рыка, 2007] или метод обращенно-фазовой ВЭЖХ [Моисеев, 2011; Thongchai, 2007; Rychlińska, 2012]. Стоит отметить, что суммарные аналитические характеристики в методе ТСХ практически не уступают таковым в ВЭЖХ. Но это достигается, прежде всего, за счет использования высокоточного дозирующего устройства фирмы SAMAG. При этом по стоимости полный набор аппаратуры для метода ТСХ сопоставим с ценой жидкостного хроматографа. Метод ВЭЖХ является более универсальным для анализа разнообразных растительных объектов за счет лучшего разрешения пиков веществ. Для определения вещества в нескольких разных растительных объектах предпочтительнее использовать градиентный режим элюирования. В данном случае условия хроматографирования использовались те же, что и в методике определения арбутина в листьях брусники обыкновенной, разработанной ранее [Моисеев, 2011].

Цель

Целью данной работы является экспериментальное обоснование оптимальных условий экстракции арбутина из листьев бадана толстолистного, а также валидация и апробация методики хроматографического определения арбутина в данном растительном сырье.

Материалы и методы исследования

Заготовку листьев бадана проводили в ботаническом саду УО «Витебский государственный медицинский университет» (Витебская область, Республика Беларусь) в начале июля в соответствии с рекомендациями GACP (Надлежащая практика сельскохозяйственного производства лекарственного растительного сырья). Для инактивации ферментов листья высушивали при температуре 85° С с принудительной вентиляцией в течение двух часов, а затем использовали воздушно-теневую сушку. Для определения содержания арбутина в образцах использовали жидкостный хроматограф фирмы Agilent 1100, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G1313A. Сбор данных, обработку хроматограмм и спектров поглощения проводили с помощью программы Agilent ChemStation for LC 3D. Анализ проводили на хроматографической колонке Zorbax StableBond C-18 250×4,6 мм, размер частиц 5 мкм. Подвижная фаза: ацетонитрил («Merck») и 0,01 М КН₂РО₄ (х.ч.) рН 3,0 в градиентном режиме (табл. 1), скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин, рабочая длина волны 280 нм выбрана на основании анализа спектра поглощения арбутина в области максимума его пика на хроматограмме (рис. 1). Разделение проводили при температуре колонки 30° С [Моисеев, 2011]. При проведении исследований использовали стандартный образец арбутина (пр-во «Sigma-Aldrich», Lot 087K1179). Градуировочный график линеен в диапазоне концентраций растворов арбутина 12,5-3000 мкг/мл.

Таблица 1
Table. 1

Режим подачи подвижной фазы Gradient of mobile phase

Время, мин	Содержание ацетонитрила, об. %
0-40	5-35%
40-40.1	35-5%
40.1-43	5%

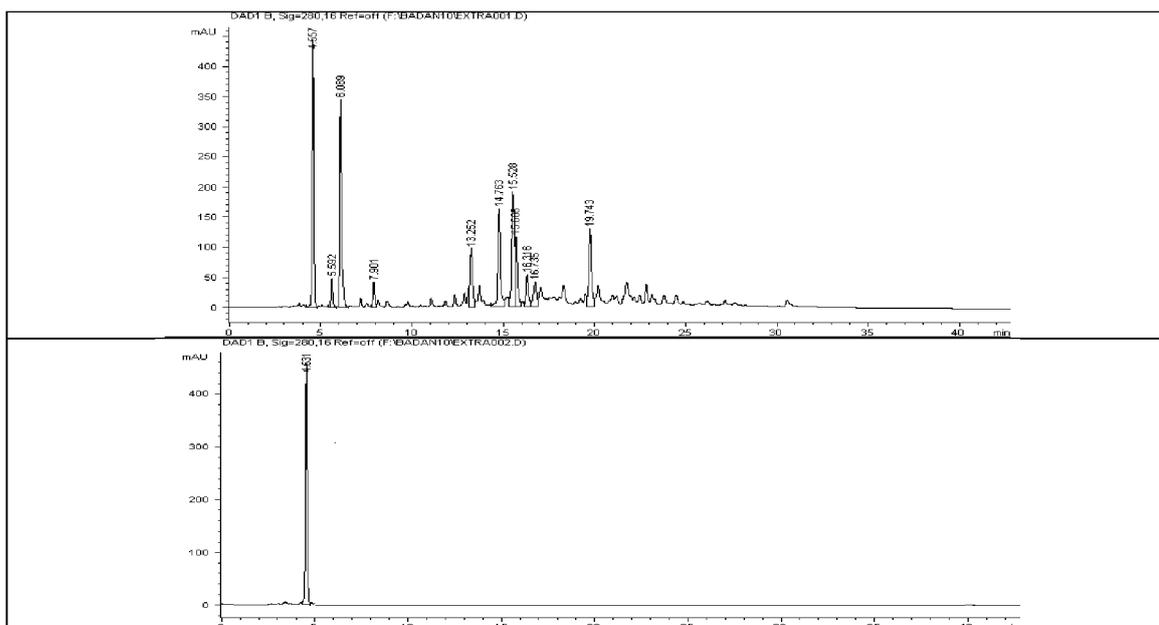


Рис. 1. Хроматограммы: сверху – водного экстракта из листьев бадана и внизу – стандартного образца арбутина (концентрация 500 мкг/мл)

Fig. 1. Chromatogram's: above - the aqueous extract from the leaves of bergenia and below – standard solution of arbutine (concentration 500 µg/ml)

Результаты и их обсуждение

Влияние концентрации спирта на экстракцию арбутина. В ходе эксперимента использовали воду очищенную и этиловый спирт 96%, и их смеси по объему. Экстрагирование проводили в течение 40±10 мин на кипящей водяной бане в герметично закупоренном флаконе, при этом за 100%-ое высвобождение арбутина принимали максимальное числовое значение, полученное в ходе эксперимента (рис. 2).

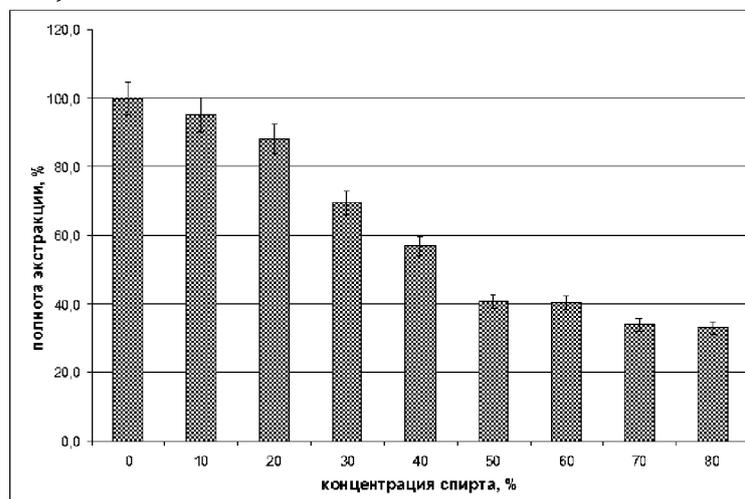


Рис. 2. Зависимость полноты экстракции арбутина из листьев бадана от концентрации этилового спирта
Fig. 2. Dependence of extraction the arbutine from the leaves of bergenia from concentration of alcohol

Таким образом, оказалось, что из исследованных экстрагентов, использованных для определения арбутина в листьях бадана, наилучшим является вода.

На следующем этапе исследований подбиралось оптимальное соотношение массы сырья и объема экстрагента (рис. 3). В Государственной фармакопее Республики Беларусь и Европейской фармакопее приведены методики, в которых рекомендуется проводить экстракцию арбутина из ЛРС при соотношениях сырья и экстрагента от 1:10 до 1:50.

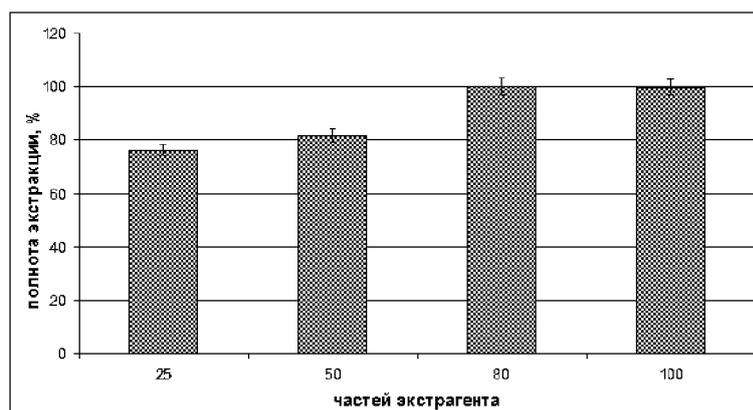


Рис. 3. Зависимость полноты экстракции арбутина из листьев бадана от соотношения сырья и экстрагента
Fig. 3. Dependence of extraction the arbutine from the leaves of bergenia from ratio of herbal substances and extractant

Как видно из рис. 3, наибольшая экстракция арбутина из листьев бадана достигается при соотношениях сырья и экстрагента 1:80 и 1:100.

Продолжительность экстракции оказывает существенное влияние на полноту извлечения веществ из растительного сырья. В фармакопейных статьях на лекарственное растительное сырье продолжительность экстракции может составлять от 10 минут до 2-3 часов. В наших исследованиях максимальное извлечение арбутина находится в диапазоне 30-45 минут нагревания на водяной бане (рис. 4). Дальнейшее экстрагирование не приводило к увеличению выхода вещества. Проведение двукратной экстракции также не позволяет увеличить выход арбутина из растительного сырья.



Рис. 4. Зависимость полноты экстракции арбутина из листьев бадана от продолжительности экстракции
Fig. 4. Dependence of extraction the arbutine from the leaves of bergenia from time of extraction

Валидация методики количественного определения методом ВЭЖХ проводилась в соответствии с рекомендациями фармакопей по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, устойчивость, прецизионность, стабильность растворов при хранении в автосэмплере [ГФ РБ, 2-ое изд. т.1, 2012; ГФ РФ, XIII вып., т.1, 2015].

Специфичность – подтверждалась совпадением времен удерживания пиков арбутина на хроматограммах раствора стандартного образца арбутина и испытуемых образцов ЛРС и отсутствию пика на хроматограмме используемого растворителя (вода). Для оценки специфичности использовали такой параметр, как спектральная чистота пика арбутина в растительном сырье (более 99.7%), а также селективность ($\alpha > 1.6$) и коэффициент разрешения пиков ($R_s > 5.0$) арбутина и других пиков на хроматограмме. Эффективность разделения по пику арбутина составляла более 12 тысяч теоретических тарелок, коэффициент асимметрии пика арбутина около 0.9.

Линейность методики определяли путем пятикратного построения градуировочного графика в диапазоне концентраций растворов арбутина 12.5-3000 мкг/мл (рис. 5).

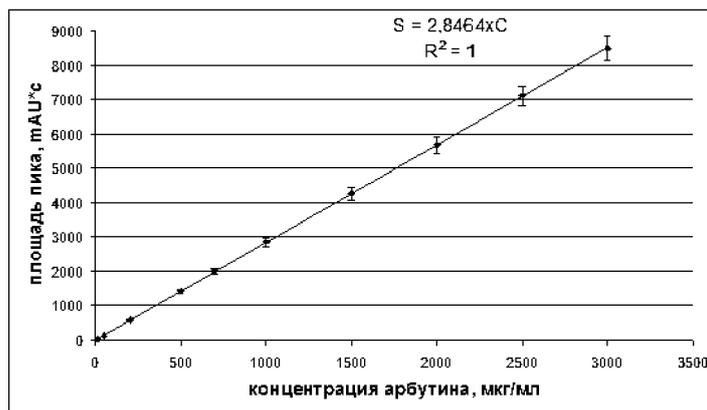


Рис. 5. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала (площадь пика) от количества введенного вещества

Fig. 5. The calibration graph of the dependence of the analytical signal (peak area) from quality of substances

Правильность методики проверяли для трех различных концентраций в трех повторностях путем смешивания в соотношении 1:1 экстракта из листьев бадана и растворов арбутина с концентрациями 500, 1000 и 1500 мкг/мл (табл. 2).

Таблица 2
Table.2

**Правильность методики определения арбутина (n=3, P=0.95)
Accuracy of assay of quantitative determination of arbutine (n=3, P=0.95)**

Содержание арбутина в экстракте растительного сырья (мкг/мл)	Добавлено (мкг/мл)	Обнаружено Проба № 1 (мкг/мл)	Обнаружено Проба № 2 (мкг/мл)	Обнаружено Проба № 3 (мкг/мл)	Открываемость, %	Относительное стандартное отклонение, %
820	500	644	656	657	98.8	1.10
820	1000	896	902	913	99.3	0.95
820	1500	1148	1159	1163	99.7	0.65

Устойчивость методики проверяли на стандартных растворах арбутина путем изменения температуры колонки (30±5° С), значения рН буферного раствора (3.0±0.5). Значения концентрации арбутина статистически различались незначительно (100.0±0.4%).

Прецизионность (сходимость результатов анализа) проверяли путем повторения методики определения на одном сырье, выполненные в течение одного дня и в разные дни. Внутрилабораторную прецизионность проверяли путем замены провизора-аналитика и выполнения анализов на другом жидкостном хроматографе (Agilent 1260, в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G5611A, диодно-матричным детектором G1315D, термостатом колонок G1316C, устройством для автоматического ввода образцов (автосэмплер) G5667A (табл. 3).

Таблица 3
Table.3

**Концентрация арбутина в растворах и экстрактах из листьев бадана (Xcp±ΔX) (n=7, P=0.95)
Concentration of arbutine in solutions and extracts from leaves bergenia (Xcp±ΔX) (n=7, P=0.95)**

Концентрация арбутина, % (внутридневная сходимость результатов анализа), мкг/мл		Концентрация арбутина, % (междневная сходимость результатов анализа), мкг/мл		Концентрация арбутина, % (внутрилабораторная прецизионность), мкг/мл	
PCO арбутина	Экстракт бадана	PCO арбутина	Экстракт бадана	PCO арбутина	Экстракт бадана
501.9±2.0	853.3±5.5	502.7±2.3	854.1±8.2	504.6±1.8	857.8±5.1

Стабильность растворов арбутина (PCO) и экстрактов из листьев бадана проверяли при хранении в течение 24 часов при температуре 21±2°С. Статистически значимых различий зафиксировано не было.

Таким образом, после проведения валидационных процедур, мы предлагаем следующую методику: точную навеску измельченных листьев бадана в соотношении одна часть сырья к восьмиде-

сяти частям экстрагента (вода очищенная) помещают в герметично закрывающийся стеклянный флакон, укупоривают и взвешивают на аналитических весах с точностью до 0.005 г. Далее помещают на кипящую водяную баню и экстрагируют в течение 40 минут, периодически встряхивая. Затем охлаждают и взвешивают, при необходимости доводят до первоначальной массы водой очищенной, перемешивают. Отбирают около 1 мл в пластиковый контейнер и центрифугируют при 5000 g в течение 5 минут. Отбирают 0.50 мл надосадочной жидкости в виалу и прибавляют 0.50 мл воды очищенной, перемешивают на вортекс-шейкере и 10 мкл инжестируют в хроматограф.

Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO): 25.0 мг стандартного образца арбутина растворяют в 25.0 мл воды очищенной.

Расчет количественного содержания арбутина в % проводят по формуле 1:

$$X = \frac{S_1 \times g_2 \times V_1 \times 100}{S_2 \times g_1 \times V_2} \quad (1)$$

Где:

S_1 – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого образца;

S_2 – площадь пика арбутина на хроматограмме PCO;

g_1 – навеска в пересчете на абсолютно сухое сырье, г;

g_2 – масса арбутина в растворе PCO, г;

V_1 – объем воды очищенной, взятой для экстракции арбутина из испытуемого образца, мл;

V_2 – объем воды очищенной, взятой для приготовления PCO, мл.

Апробация методики. Методика апробирована на пяти различных сериях листьев бадана. Результаты приведены в табл. 4.

Таблица 4
Table.4

Результаты количественного определения арбутина в листьях бадана (n=3, P=0.95)
Results of quantitative determination of arbutine in the leaves of bergenia (n=3, P=0.95)

Места заготовки	Определено, %
Листья бадана, заготовлены в Смоленской области, Российская Федерация, июнь 2014 года	16.1±0.3
Листья бадана, заготовлены в Псковской области, Российская Федерация, июнь 2014 года	15.8±0.2
Листья бадана, заготовлены в Витебской области, Республика Беларусь, июль 2014 года	18.2±0.3
Листья бадана, заготовлены в Минской области, Республика Беларусь, июль 2014 года	17.4±0.3
Листья бадана, заготовлены в Гродненской области, Республика Беларусь, июль 2014 года	18.3±0.3

Выводы

1. В ходе исследований экспериментально обоснованы оптимальные условия экстракции арбутина из листьев бадана: экстрагент – вода очищенная; время экстракции 40±10 минут на водяной бане; соотношение сырья и экстрагента 1:80.

2. Разработанная методика валидирована по показателям, рекомендованным Государственной фармакопеей Российской Федерации XIII издания, апробирована на пяти сериях растительного сырья и может быть рекомендована для включения в нормативную документацию по контролю качества листьев бадана толстолитного.

Список литературы References

Государственная фармакопея Российской Федерации, 2015, XIII выпуск, том 1. Валидация аналитических методик OFC.1.1.0012.15 [Электронный ресурс]. <http://193.232.7.107/feml> (5 ноября 2015).

Gosudarstvennaja farmakopeja Rossijskoj Federacii [State pharmacopeia of Russian Federation] XIII vypusk. Validacija analiticheskikh metodik OFS.1.1.0012.15. <http://193.232.7.107/feml> (accessed: 5 November 2015). (in Russian)

Государственная фармакопея Республики Беларусь, 2012. (второе издание), том 1. Молодечно, Победа, 1220.

Gosudarstvennaja Farmakopeja Respubliki Belarus, [State pharmacopeia of Republic of Belarus]. tom.1. Molodechno, Pobeda, 1220. (in Russian)

Моисеев Д.В. 2011. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной методом ВЭЖХ. Вестник фармации. 1 (51):40-45.

- Moiseev D.V. 2011. Opredelenie arbutina v list'jah brusniki obyknovЕННОй metodom VYZH [Determination of arbutine in cowberry leaf by HPLC] Vestnik farmacii. 1 (51):40-45. (in Russian)
- Моисеев Д.В. 2013. Динамика накопления арбутина в бадане толстолистном в период вегетации. Материалы 5-й Международной научно-практической конференции «Фармобразование-2013» Воронеж: 427-429.
- Moiseev D.V. 2013. Dinamika nakoplenija arbutina v badane tolstolistnom v period vegetacii [Dynamics of the accumulation of arbutine in *Bergenia crassifolia* during the vegetation period] Materialy 5 Mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferencii «Farmobrazovanie-2013». Voronezh: 427-429. (in Russian)
- Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. 2002. Фармакогнозия: учебник. 4-е изд. М., Медицина, 656.
- Murav'eva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. 2002. Farmakognozija [Pharmacognosy] 4-e izd. M., Medicina, 656. (in Russian)
- Яковлев Г.П. 2010. Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения: 2-е изд. СПб., СпецЛит, 863.
- Yakovlev G.P. 2010. Farmakognozija: Lekarstvennoe syr'e rastitel'nogo i zhitvnogo proishozhdenija [Pharmacognosy. Medicinal raw materials of plant and animal origin] 2 izd. SPb., SpecLit, 863. (in Russian)
- Рыка А., Bober K., Stolarczyk A. 2007. Densitometric determination of arbutin in cowberry leaves (*Vaccinium Vitis idaeae*). Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research. 63 (5): 395-400.
- Rychlińska I., Nowak S. 2012. Quantitative determination of arbutin and hydroquinone in different plant materials by HPLC. Not Bot Horti Agrobi. 40 (2):109-113.
- Thongchai W., Liawruangrath B., Liawruangrath S. 2007. High-performance liquid chromatography determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts. J. Cosmet. Sci. 58: 35-44.