



И.М. Моргунов 
Н.П. Антонова 
Е.П. Шефер 
С.С. Прохвятилова 
Т.А. Голомазова 

Применение метода ВЭТСХ-денситометрии в количественном определении суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

✉ Моргунов Игорь Михайлович; Morgunov@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

Метод ацидиметрического титрования, применяющийся для количественного определения алкалоидов термопсиса экстракта сухого, имеет ряд недостатков, таких как недостаточная специфичность и субъективность в определении конечной точки титрования. В различных частях производящего растения алкалоиды содержатся в разных соотношениях: в траве термопсиса ланцетного преобладает термопсин, а в семенах — цитизин. Различие в фармакологическом действии цитизина и термопсина обуславливает важность идентификации и количественного определения отдельных алкалоидов в термопсиса экстракте сухом.

Цель работы: разработать и валидировать методику подтверждения подлинности и количественного определения суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с денситометрической оценкой результата анализа.

Материалы и методы: объектами исследования служили образцы двух опытно-промышленных серий термопсиса экстракта сухого, стандартные образцы цитизина и термопсина. Хроматографическое разделение проводили с использованием пластинок для ВЭТСХ Silica Gel 60 F₂₅₄ 20×10 см (Merck), результаты оценивали на денситометре TLC Scanner 4 (CAMAG®) и обрабатывали с помощью программы winCATS.

Результаты: подлинность термопсиса экстракта сухого подтверждена методом спектроденситометрии после ВЭТСХ-разделения. Применение специфического раствора для обработки хроматографических пластинок позволило идентифицировать три доминирующих алкалоида термопсиса (термопсин, цитизин и неидентифицированный алкалоид с $R_f \approx 0,2$), сумма которых составила около 80% от суммы алкалоидов экстракта, и четыре минорных алкалоида. Определено количественное содержание цитизина, термопсина и суммы алкалоидов в пересчете на термопсин.

Выводы: разработана и валидирована методика подтверждения подлинности и количественного определения суммы алкалоидов в термопсиса экстракте сухом, позволяющая сократить время выполнения испытания с 4–5 до 2–2,5 ч.

Ключевые слова: ВЭТСХ-денситометрия; термопсиса экстракт сухой; цитизин; термопсин; алкалоиды

Для цитирования: Моргунов И.М., Антонова Н.П., Шефер Е.П., Прохвятилова С.С., Голомазова Т.А. Применение метода ВЭТСХ-денситометрии в количественном определении суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств.* 2023;13(2):173–183. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-446>

I.M. Morgunov ✉ 
N.P. Antonova 
E.P. Shefer 
S.S. Prokhvatilova 
T.A. Golomazova 

Determination of the Total Alkaloid Content of Thermopsis Dry Extract by HPTLC-Densitometry

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

✉ Igor M. Morgunov; Morgunov@expmed.ru

ABSTRACT

When used to quantify alkaloids in thermopsis dry extract, acidimetric titration has several limitations, including insufficient specificity of the method and arbitrary selection of a titration endpoint. Different parts of the *Thermopsis lanceolata* plant produce alkaloids in different proportions: the herb is rich in thermopsine, whereas the seeds are rich in cytosine. Since thermopsine and cytosine have different pharmacological effects, it is important to identify and quantify individual alkaloids in thermopsis dry extract.

The aim of the study was to develop and validate an analytical procedure for identifying and quantifying total alkaloids in thermopsis dry extract by high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) with densitometric detection.

Materials and methods. The study included samples from two pilot-scale batches of thermopsis dry extract and reference standards for cytosine and thermopsine. The authors used Merck HPTLC Silica Gel 60 F₂₅₄ 20×10 cm plates for chromatographic separation and analysed the results with a CAMAG® TLC Scanner 4 densitometer and the winCATS software.

Results. The authors identified thermopsis dry extract using HPTLC separation followed by spectrodensitometry. The alkaloid-specific solution applied to chromatography plates helped to identify the three most abundant and four minor alkaloids of thermopsis. The most abundant alkaloids were thermopsine, cytosine, and an unidentified alkaloid with a retention factor of approximately 0.2. These three alkaloids accounted for almost 80% of the total alkaloid content of the dry extract. The authors quantified cytosine, thermopsine, and total alkaloids expressed as thermopsine.

Conclusions. The authors developed and validated an analytical procedure for identifying and quantifying total alkaloids in thermopsis dry extract. This procedure offers the possibility of reducing the analysis time from 4–5 hours to 2–2.5 hours.

Key words: HPTLC-densitometry; thermopsis dry extract; cytosine; thermopsine; alkaloids

For citation: Morgunov I.M., Antonova N.P., Shefer E.P., Prokhvatilova S.S., Golomazova T.A. Determination of the total alkaloid content of thermopsis dry extract by HPTLC-densitometry. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(2):173–183. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-446>

Введение

Термопсиса экстракт сухой применяется в медицинской практике в качестве отхаркивающего средства и входит в состав таких препаратов, как «Микстура от кашля для взрослых сухая», «Термопсол®, таблетки от кашля», «Коделак® Бронхо, таблетки», «Коделак® фито, эликсир». Термопсиса ланцетного травы экстракт жидкий в своем составе содержат «Амтерсол® сироп», «Термопсиса сироп с солодкой».

Термопсиса экстракт получают путем экстракции водой из травы термопсиса ланцетного – *Thermopsis lanceolata* R. Br., сем. бобовых – *Fabaceae*, собранной в начале цветения до появления плодов. В траве термопсиса

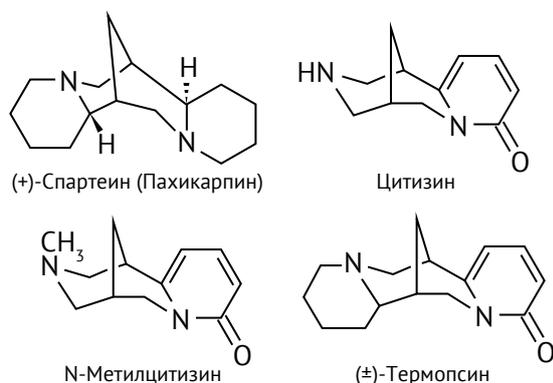
ланцетного преобладает алкалоид хинолизидиновой группы термопсин, обеспечивающий отхаркивающий эффект препаратов. Алкалоиды хинолизидиновой группы раздражают рецепторы желудка, вследствие чего рефлекторно усиливают секрецию бронхиальных желез, что сопровождается уменьшением вязкости мокроты, стимулируют перистальтические сокращения бронхов и повышают активность ресничек мерцательного эпителия слизистой оболочки, способствуя выделению мокроты [1, 2].

Качественное и количественное содержание алкалоидов в термопсисе ланцетном в различных частях растения отличается, так в траве

преобладает термопсин, а в семенах – цитизин. Источником цитизина также служит трава термопсиса другого вида – термопсиса очередно-цветкового.

Алкалоид цитизин входит в состав препаратов, применяемых для облегчения отвыкания от курения, и лекарственных средств, возбуждающих дыхательный центр [3]. Различие в фармакологическом действии алкалоидов обуславливает важность идентификации отдельных алкалоидов в термопсиса экстракте сухом.

К основным алкалоидам хинолизидиновой группы относятся пахикарпин, термопсин, цитизин, метилцитизин, анагирин, термопсидин [4, 5]:



Для количественного определения суммы алкалоидов в термопсиса экстракте сухом согласно зарегистрированным нормативным документам используется метод ацидиметрического титрования по аналогии с указанным в фармакопейной статье «Термопсиса ланцетного трава»¹ с модификациями в части используемых индикаторов. Метод основан на том, что алкалоиды после экстракции неполярными растворителями в виде оснований вступают в реакцию с хлористоводородной кислотой. Данный метод не является специфичным, так как позволяет определить содержание органических оснований в извлечении из препарата, к которым относятся не только алкалоиды, но и различные аминокислоты, биологически активные амины и прочие основания. Идентифицировать отдельные алкалоиды не представляется возможным. В качестве титранта используют 0,05 М раствор хлористоводородной кислоты, который получают разбавлением 1 М или 0,5 М раствора хлористоводородной кислоты, что дополнительно вносит ошибку в результаты количественного определения. В качестве индикатора используют смесь метиленового синего и метилового красного, интервал перехода окраски: от зеленого

до сине-фиолетового. При этом испытуемый раствор имеет желтую окраску, и определение конечной точки титрования очень субъективно, что также вносит ошибку в результаты.

Цель работы – разработать и валидировать методику подтверждения подлинности и количественного определения суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) с денситометрической оценкой результата анализа.

Материалы и методы

Объектами исследования служили образцы двух опытно-промышленных серий (№ 1 и 2) лекарственного средства «Термопсиса экстракт сухой» отечественного производителя со сроком годности до 06.2023 и 03.2023 соответственно. В качестве стандартных образцов (СО) использовали цитизин (98%, TRC, кат. № C998500, CAS 485-35-8) и термопсин (97,55%, WuXi AppTec, CAS 486-90-8).

Экспериментальная часть исследования включала идентификацию алкалоидов в термопсиса экстракте сухом методом ВЭТСХ с денситометрической оценкой и количественное определение суммы алкалоидов в пересчете на термопсин в термопсиса экстракте сухом методом титрования и спектроденситометрии с использованием СО.

Для приготовления испытуемого раствора точную навеску экстракта массой около 1 г помещали в колбу Эрленмейера со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 20 мл хлороформа, 1 мл раствора аммиака 32% и 1 мл воды. Перемешивали 20 мин на орбитальном шейкере. К содержимому колбы добавляли 2 г натрия сульфата безводного и тщательно перемешивали. Содержимое колбы фильтровали через предварительно промытый хлороформом зольный фильтр «черная лента» с 3 г натрия сульфата безводного в круглодонную колбу объемом 250 мл. Колбу ополаскивали хлороформом еще два раза по 10 мл, полученные извлечения фильтровали в ту же круглодонную колбу. Фильтрат выпаривали досуха на ротационном испарителе при 40 °С.

Для количественного определения методом титрования полученный остаток растворяли в 5 мл этанола 95% и добавляли 25 мл воды. В качестве индикатора использовали смесь метиленового синего и метилового красного и титровали 0,05 М раствором хлористоводородной кислоты

¹ РФС.2.5.0096.18 Термопсиса ланцетного трава. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2. М.; 2018.

до сине-фиолетовой окраски. Количество суммы алкалоидов в пересчете на термопсин, соответствующее 1 мл 0,05 М раствора хлористоводородной кислоты, составляло 0,0122 г.

Для идентификации и количественного определения методом ВЭТСХ и спектроденситометрии сухой остаток растворяли в 10 мл метанола. Стандартный раствор готовили, растворяя 25 мг цитизина и 12,5 мг термопсина в 50 мл метанола.

Для обработки хроматограмм использовали раствор обнаруживающего реагента, который готовили следующим образом: к 0,12 г висмута нитрата основного прибавляли 25 мл уксусной кислоты ледяной и тщательно перемешивали. 3 г калия йодида растворяли в 5 мл воды, полученные растворы смешивали и прибавляли 220 мл метанола. При образовании осадка раствор выдерживали на ультразвуковой бане до растворения осадка.

На хроматографическую пластину для ВЭТСХ Silica gel 60 F₂₅₄ 20×10 см (Merck, кат. № 105642) на расстоянии 1 см от нижнего края пластинки наносили по 2, 4, 8, 12, 16, 20 мкл стандартного раствора и 15 мкл испытуемого раствора в трех повторностях по две аппликации в виде полос длиной 8 мм. Пластинку помещали в предварительно насыщенную в течение 1 ч камеру для хроматографии. Подвижная фаза представляла собой смесь: хлороформ–метанол–аммиака раствор 32% в соотношении 20:3:0,5 (об./об.).

После прохождения фронтом подвижной фазы 4 см от линии старта пластинку вынимали и высушивали в вытяжном шкафу до исчезновения следов растворителей. Затем пластинку обрабатывали раствором обнаруживающего реагента методом погружения и высушивали в потоке горячего воздуха в течение 2–3 мин. Сканировали обработанную пластинку на денситометре TLC Scanner 4 (CAMAG®) при длине волны 520 нм и щели «микро 6×0,1 мм». Интегрирование полученных хроматограмм проводили в режиме ручной коррекции базовой линии и обрабатывали с помощью программы winCATS.

Содержание суммы алкалоидов (X , %) с использованием стандартов термопсина и цитизина рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C + T + (T \times (S\sum \text{пиков} - ST - SC) / ST)}{a \times (100 - W)} \times 10000, \quad (1)$$

где C – содержание цитизина в навеске экстракта, рассчитанное с помощью программного обеспечения, мг; T – содержание термопсина в навеске экстракта, рассчитанное с помощью

программного обеспечения, мг; $S\sum \text{пиков}$ – сумма площадей всех пиков на хроматограмме; SC – площадь пика цитизина; ST – площадь пика термопсина; a – навеска экстракта, мг; W – влажность, %.

Расчет содержания цитизина и термопсина в процентах проводили методом абсолютной градуировки по результатам анализа шести различных концентраций стандартного раствора по формуле:

$$X = \frac{A}{a \times (100 - W)} \times 10000, \quad (2)$$

где A содержание определяемого вещества, рассчитанное с помощью программного обеспечения, мг; a – навеска экстракта, мг; W – влажность, %.

Результаты и обсуждение

На хроматограмме испытуемого раствора обнаружено 7 зон адсорбции алкалоидов. Зона адсорбции с $R_f \approx 0,45$ соответствует цитизину, зона адсорбции с $R_f \approx 0,8$ – термопсину (рис. 1). Сканирование пластинки проводили при длине волны 520 нм, что соответствует максимумам поглощения в спектрах зон адсорбции термопсина и цитизина (рис. 2, 3).

При сканировании хроматограмм в УФ-области до обработки раствором обнаруживающего реагента на хроматограмме испытуемого раствора обнаружено порядка 30 зон адсорбции с флуоресценцией синего цвета, при этом установить, к какому классу соединений они относятся, было практически невозможно (рис. 4).

После обработки хроматограммы обнаруживающим реагентом установлено, что термопсин, цитизин и неидентифицированный алкалоид с $R_f \approx 0,2$ являются доминирующими алкалоидами в препарате, сумма площадей их пиков составляет около 80% от суммы площадей всех пиков алкалоидов (табл. 1, рис. 5, 6).

Площадь пика термопсина на хроматограмме составляет около 30%, площадь пика цитизина – около 21,5% от суммы площадей всех пиков, однако при пересчете с учетом интенсивности поглощения данных веществ содержание цитизина в препарате больше, чем содержание термопсина, приблизительно в 1,5 раза (табл. 2, 3).

Различия во взаимодействии цитизина и термопсина с раствором обнаруживающего реагента предположительно связаны с наличием двух третичных аминогрупп в молекуле термопсина и, соответственно, более сильными основными

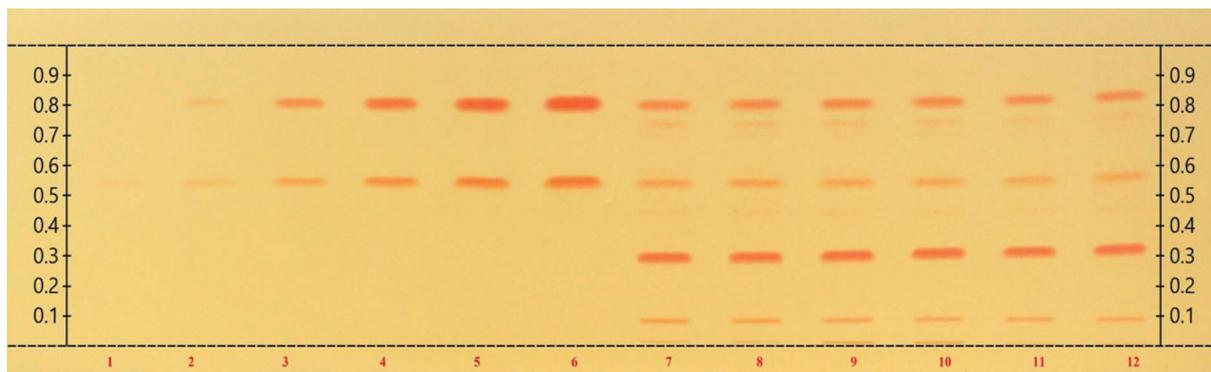


Рис. 1. Хроматограмма после обработки раствором обнаруживающего реагента в видимой области спектра: 1–6 – растворы стандартных образцов (СО) цитизина и термопсина 2, 4, 8, 12, 16 и 20 мкл, соответственно; 7–8 – испытуемый раствор № 1, 15 мкл; 9–10 – испытуемый раствор № 2, 15 мкл; 11–12 – испытуемый раствор № 3, 15 мкл.

Fig. 1. Chromatogram obtained with the detection reagent solution in the visible spectrum: 1–6, solutions of cytosine and thermopsine reference standards (2, 4, 8, 12, 16, and 20 µL, respectively); 7–8, test solution 1 (15 µL); 9–10, test solution 2 (15 µL); 11–12, test solution 3 (15 µL).

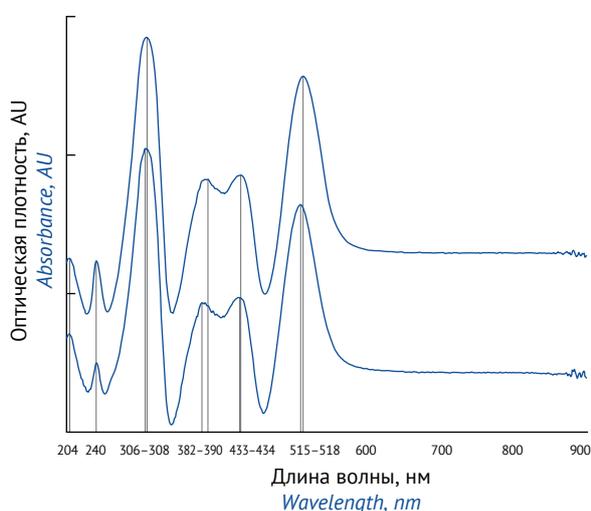


Рис. 2. Спектры зон адсорбции цитизина (вверху спектр стандартного раствора, внизу – испытуемого раствора)

Fig. 2. Spectra of cytosine spots (top: reference solution; bottom: test solution)

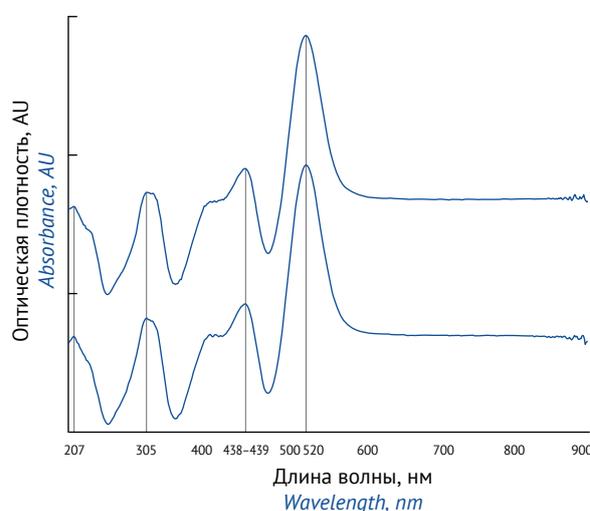


Рис. 3. Спектры зон адсорбции термопсина (вверху спектр стандартного раствора, внизу – испытуемого раствора)

Fig. 3. Spectra of thermopsine spots (top: reference solution; bottom: test solution)

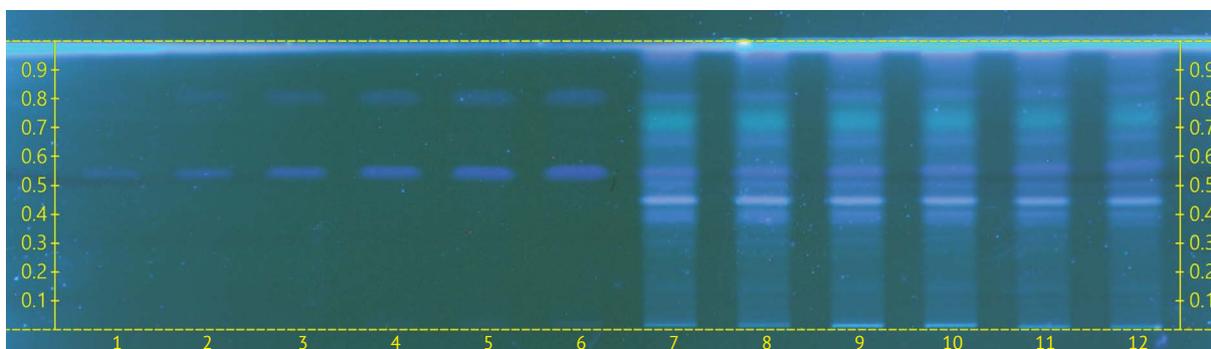


Рис. 4. Хроматограмма до обработки обнаруживающим реагентом, просмотр в УФ-области спектра при длине волны 365 нм: 1–6 – растворы стандартных образцов (СО) цитизина и термопсина 2, 4, 8, 12, 16 и 20 мкл соответственно; 7–8 – испытуемый раствор № 1, 15 мкл; 9–10 – испытуемый раствор № 2, 15 мкл; 11–12 – испытуемый раствор № 3, 15 мкл.

Fig. 4. Chromatogram obtained without the detection reagent solution in the UV spectrum at $\lambda=365$ nm: 1–6, solutions of cytosine and thermopsine reference standards (2, 4, 8, 12, 16, and 20 µL, respectively); 7–8, test solution 1 (15 µL); 9–10, test solution 2 (15 µL); 11–12, test solution 3 (15 µL).

Таблица 1. Площади пиков на хроматограмме испытуемого раствора

Table 1. Peak areas in the test solution chromatogram

R_f	Площадь пика*, % Peak area*, %	Наименование компонента Component name
0,026	9,17	–
0,194	29,05	–
0,355	3,49	–
0,469	21,51	цитизин cytisine
0,666	1,51	–
0,717	5,40	–
0,764	29,87	термопсин thermopsine

Примечание. «–» – неидентифицированное соединение.

* – жирным шрифтом выделены площади пиков преобладающих компонентов.

Note. –, unidentified compound.

* Peak areas of the most abundant components are highlighted in bold.

Таблица 2. Соотношение площадей пиков цитизина и термопсина на хроматограммах стандартного раствора

Table 2. Cytisine-to-thermopsine peak area ratio in the reference solution chromatograms

Объем нанесения, мкл Application volume, μ L	Соотношение площадей пиков цитизин/термопсин Cytisine/thermopsine peak area ratio	Среднее значение соотношения площадей пиков цитизин/термопсин Mean cytisine/thermopsine peak area ratio
4	41,2/58,8	48,6/51,4
8	48,4/51,6	
12	45,3/54,7	
16	45,5/54,5	
20	45,0/55,0	

Примечание. Концентрация цитизина в стандартном растворе – 501,20 мкг/мл, термопсина – 250,40 мкг/мл.

Note. The concentration of cytisine in the reference solution is 501.20 μ g/mL, and that of thermopsine is 250.40 μ g/mL.

свойствами, чем характерно для цитизина, в молекуле которого присутствует одна вторичная аминогруппа и одна третичная аминогруппа. Концентрация цитизина в стандартном растворе в два раза больше, чем концентрация термопсина, при этом в аналитической области измерений площадь пика термопсина практически равна площади пика цитизина. Из этого следует, что расчет суммы алкалоидов в препарате необходимо проводить при использовании двух стандартов.

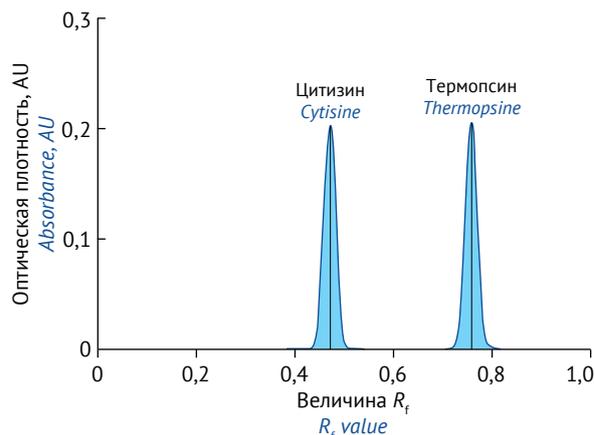


Рис. 5. Хроматограмма стандартного раствора (сканирование при длине волны 520 нм, объем пробы при нанесении на пластинку – 8 мкл)

Fig. 5. Reference solution chromatogram (detection wavelength: 520 nm; application volume: 8 μ L)

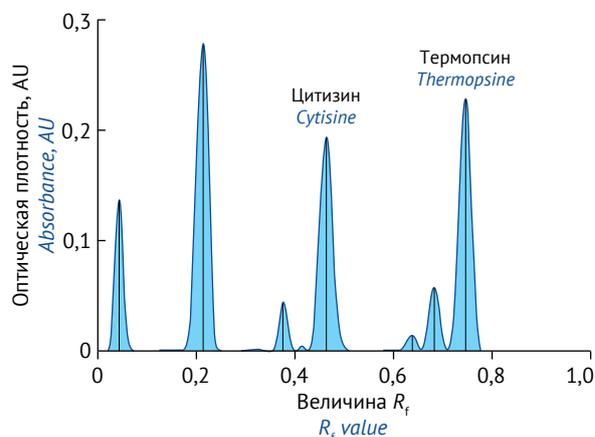


Рис. 6. Хроматограмма испытуемого раствора (сканирование при длине волны 520 нм)

Fig. 6. Test solution chromatogram (detection wavelength: 520 nm)

Ввиду отсутствия данных о взаимодействии неидентифицированных алкалоидов с раствором обнаруживающего реагента невозможно однозначно определить их точную концентрацию. Целесообразнее производить расчет суммы алкалоидов в пересчете на термопсин.

Термопсина экстракт получают из травы термопсиса ланцетного, собранной в начале цветения до появления плодов, поэтому преобладающим в данном виде сырья является алкалоид термопсин, который обеспечивает отхаркивающий эффект препаратов на основе травы термопсиса ланцетного. А преобладающим алкалоидом в семенах травы термопсиса ланцетного является цитизин, который входит в состав препаратов, применяемых для облегчения отвыкания от курения и возбуждающих дыхательный центр. Другим источником цитизина служит трава термопсиса

Таблица 3. Результаты определения содержания алкалоидов в препарате «Термопсиса экстракт сухой» с использованием различных способов расчета

Table 3. Results of quantifying alkaloids in thermopsis dry extract by several calculation methods

Определяемая группа веществ <i>Group of analytes</i>	Результаты анализа Серии 1 (влажность – 3,7%) <i>Results of analysis, batch 1 (Loss on drying: 3.7%)</i>	Среднее значение, X_{cp} <i>Mean value</i>	Результаты анализа Серии 2 (влажность – 2,1%) <i>Results of analysis, batch 2 (Loss on drying: 2.1%)</i>	Среднее значение, X_{cp} <i>Mean value</i>
Титрование <i>Titration</i>				
Сумма алкалоидов в пересчете на термопсин, % <i>Total alkaloids expressed as thermopsine, %</i>	0,980	0,983±0,016 (RSD=1,54%)	0,971	0,984±0,016 (RSD=1,52%)
	0,978		0,981	
	0,990		1,010	
	0,970		0,990	
	1,010		0,985	
	0,970		0,969	
Спектроденситометрия <i>Spectrodensitometry</i>				
Содержание термопсина, % <i>Thermopsine content, %</i>	0,157±0,009	0,147±0,034 (RSD=3,00%)	0,180±0,031	0,171±0,030 (RSD=2,73%)
	0,147±0,018		0,173±0,009	
	0,146±0,023		0,170±0,002	
	0,143±0,012		0,168±0,036	
	0,149±0,019		0,169±0,013	
	0,142±0,010		0,168±0,023	
	0,149±0,005		0,168±0,011	
	0,145±0,005		0,171±0,025	
0,149±0,006	0,179±0,033			
Спектроденситометрия <i>Spectrodensitometry</i>				
Содержание цитизина, % <i>Cytisine content, %</i>	0,232±0,012	0,230±0,0045 (RSD=2,54%)	0,253±0,022	0,244±0,005 (RSD=2,63%)
	0,230±0,016		0,244±0,002	
	0,222±0,027		0,248±0,014	
	0,224±0,020		0,240±0,038	
	0,234±0,020		0,235±0,050	
	0,240±0,027		0,246±0,012	
	0,235±0,016		0,240±0,021	
	0,227±0,004		0,238±0,005	
0,239±0,011	0,253±0,004			
Спектроденситометрия (расчет по стандартному образцу цитизина и термопсина) <i>Spectrodensitometry (calculated using cytosine and thermopsine reference standards)</i>				
Сумма алкалоидов в пересчете на термопсин, % <i>Total alkaloids expressed as thermopsine, %</i>	0,666±0,146	0,685±0,015 (RSD=2,89%)	0,748±0,060	0,726±0,016 (RSD=2,95%)
	0,670±0,032		0,719±0,055	
	0,690±0,133		0,723±0,085	
	0,655±0,011		0,740±0,074	
	0,697±0,019		0,695±0,074	
	0,676±0,045		0,750±0,043	
	0,697±0,143		0,745±0,035	
	0,716±0,111		0,715±0,010	
	0,699±0,098		0,696±0,055	
	0,708±0,084		0,686±0,066	

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. RSD, relative standard deviation.

очередноцветкового. Различие в фармакологическом действии цитизина и термопсина обуславливает важность идентификации и количественного определения отдельных алкалоидов в термопсиса экстракте сухом.

Количественное определение цитизина в термопсиса экстракте сухом может позволить оценить качество сырья травы термопсиса ланцетного, в которой основным алкалоидом является термопсин, и контролировать производственный процесс получения экстракта. Установление норм содержания цитизина требует дальнейшего исследования.

Была проведена валидация разработанной методики, подтверждающая ее пригодность для количественного определения суммы алкалоидов в пересчете на термопсин в термопсиса экстракте сухом. Результаты валидации представлены в *таблице 4*. Для подтверждения специфичности методики использовалась

модельная смесь, состоящая из 23,46 мг цитизина, 15,06 мг термопсина и 9,98 г сахарозы. 1 г модельной смеси подвергали анализу по вышеуказанной методике. Подлинность препарата подтверждали путем визуального осмотра пластины на основании соответствия окраски и величин R_f зон адсорбции на хроматограмме испытуемого раствора зонам адсорбции цитизина и термопсина на хроматограмме стандартного раствора.

Разработанная методика позволяет сократить время анализа при использовании метода титрования для количественного определения суммы алкалоидов в сочетании с тонкослойной хроматографией и качественной реакцией на алкалоиды для определения подлинности с 4–5 до 2–2,5 ч за счет выполнения оценки подлинности и количественного определения суммы алкалоидов одним методом ВЭТСХ-денситометрии.

Таблица 4. Результаты валидации методики определения суммы алкалоидов в пересчете на термопсин

Table 4. Validation results for the analytical procedure for quantifying total alkaloids expressed as thermopsine

Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>			
	Специфичность <i>Specificity</i>			
Присутствие сопутствующих компонентов не влияет непредусмотренным образом на результат анализа <i>Related compounds do not inadvertently affect the test result</i>	1) Спектр зоны адсорбции цитизина испытуемого раствора полностью совпадает по положению максимумов и минимумов поглощения со спектром зоны адсорбции цитизина стандартного раствора. Спектр зоны адсорбции термопсина испытуемого раствора полностью совпадает по положению максимумов и минимумов поглощения со спектром зоны адсорбции термопсина стандартного раствора. <i>The positions of absorption maxima and minima in the spectrum of the cytisine spot of the test solution completely coincide with those of the standard solution.</i> <i>The positions of absorption maxima and minima in the spectrum of the thermopsine spot of the test solution completely coincide with those of the standard solution.</i>			
	2) Истинные значения содержания цитизина (0,234 мг/г) и термопсина (0,151 мг/г) в модельной смеси лежат в пределах границ доверительных интервалов результатов анализа содержания цитизина и термопсина в модельной смеси <i>The true content of cytisine (0.234 mg/g) and thermopsine (0.151 mg/g) in the spiked mixture falls within the confidence limits for the measured content of cytisine and thermopsine in the spiked mixture</i>			
	Навеска модельной смеси, мг <i>Accurately weighed spiked mixture, mg</i>	999,65	1001,14	1001,78
	Содержание цитизина, % <i>Cytisine content, %</i>	0,232	0,237	0,223
	$X_{cp} = 0,23067$ $f = 2$ $t(P, f) = 4,30$ $s^2 = 0,00005$, $s = 0,00709$			
	Доверительный интервал / <i>Confidence interval</i> : $\pm 0,01761$ ($P = 95\%$, $\alpha = 0,05$) Границы доверительного интервала / <i>Confidence limits</i> : 0,21306–0,24828			
	Содержание термопсина, % <i>Thermopsine content, %</i>	0,155	0,145	0,151
$X_{cp} = 0,15033$ $f = 2$ $t(P, f) = 4,30$ $s^2 = 0,00031$, $s = 0,00503$				
Доверительный интервал / <i>Confidence interval</i> : $\pm 0,01252$ ($P = 95\%$, $\alpha = 0,05$) Границы доверительного интервала / <i>Confidence limits</i> : 0,13784–0,16283				

Продолжение таблицы 4

Table 4 (continued)

Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>		
	Линейность <i>Linearity</i>		
Результаты измерений аналитических сигналов 6 проб с различным содержанием определяемого алкалоида обработаны методом наименьших квадратов с использованием линейной модели <i>Measurements of analytical responses from 6 samples containing different test alkaloid levels should be analysed using the least-squares method and the linear model</i> Коэффициент корреляции <i>Correlation coefficient:</i> $r \geq 0,99$	Уравнение прямой для цитизина / <i>Line equation for cytisine:</i> $Y=0,0015x+0,001$ ($r=0,9903$)		
	Нанесено цитизина <i>Cytisine applied</i>		Площадь пика <i>Peak area</i>
	мкг / μg	%	
	1,0016	25	0,00203
	2,0032	50	0,00412
	4,0064	100	0,00730
	6,0096	150	0,01088
	8,0128	200	0,01364
	10,016	250	0,01562
	Уравнение прямой для термопсина / <i>Line equation for thermopsine:</i> $Y=0,0039x-0,0008$ ($r=0,9939$)		
	Нанесено цитизина <i>Cytisine applied</i>		Площадь пика <i>Peak area</i>
	мкг / μg	%	
	0,54148	25	0,00089
	1,08296	50	0,00301
	2,16592	100	0,00811
3,24888	150	0,01219	
4,33184	200	0,01646	
5,4148	250	0,01936	
	Аналитическая область <i>Range</i>		
Методика применима в интервале 80–120% от номинального значения содержания цитизина и термопсина <i>The procedure is applicable in the range from 80 to 120% of the nominal cytisine and thermopsine contents</i>	Соответствует на основании данных по изучению линейности <i>The linearity data confirm that the result conforms to the requirements</i>		
	Правильность <i>Trueness</i>		
Свободный член уравнения меньше своего доверительного интервала <i>The y-intercept of the linear equation is less than its confidence interval</i> $\Delta a = t(0,05, n-2) \times s_a$ $a \leq \Delta a$	На основании данных по изучению линейности <i>Based on the linearity data</i> Расчет для цитизина / <i>Calculations for cytisine:</i> $a=0,001$ $s_a=0,00461$ $t(0,95, n-2)=2,78$ $\Delta a=2,78 \times 0,00461=0,01282$ $a < \Delta a$		
	Расчет для термопсина / <i>Calculations for thermopsine:</i> $a=0,0008$ $s_a=0,00038$ $t(0,95, n-2)=2,78$ $\Delta a=2,78 \times 0,00038=0,00106$ $a < \Delta a$		

Продолжение таблицы 4

Table 4 (continued)

Требования <i>Requirements</i>	Результат <i>Result</i>		
Прецизионность и повторяемость <i>Precision and repeatability</i>			
RSD результатов 9 определений количественного содержания суммы алкалоидов в пересчете на термопсин должно быть не более 3,0% <i>The RSD for 9 determinations of total alkaloid content expressed as thermopsine is ≤3.0%</i>	№ определения <i>Determination No.</i>	Исполнитель 1 <i>Operator 1</i>	Исполнитель 2 <i>Operator 2</i>
	1	0,68	0,71
	2	0,71	0,72
	3	0,68	0,72
	s	0,01732	0,00577
	s ²	0,00030	0,00003
	X _{серия 1} = 0,685 ± 0,015% RSD = 2,89% X _{серия 2} = 0,726 ± 0,016% RSD = 2,95%		
Внутрилабораторная прецизионность <i>Intermediate precision</i>			
Полученное значение критерия Фишера, вычисленное по результатам проведения испытаний разными исполнителями на разном оборудовании, должно быть меньше табличного значения <i>The F-test value calculated from the results obtained by different operators with different equipment is less than the critical value</i> $F_{\text{практ}} = s_1^2 / s_2^2 \leq F_{\text{теор}}$	$F_{\text{практ}} = 0,00030 / 0,00003 = 1,11$ $F_{\text{теор}}(0,05; 2; 2) = 19,00$ $F_{\text{практ}} < F_{\text{теор}}$		

Примечание. X_{ср} – среднее значение определяемой величины; P – доверительная вероятность; f – число степеней свободы; t(0,95; n–2) – коэффициент Стьюдента, где 0,95 – вероятность, F_{практ}, F_{теор}(0,05; 2; 2) – полученный и табличный критерии Фишера соответственно, где 0,05 – уровень значимости, 2 и 2 – число степеней свободы; s² – дисперсия; s – стандартное отклонение; s₁, s₂ – большее и меньшее стандартные отклонения полученных результатов соответственно; a – свободный член линейной зависимости, s_a – стандартное отклонение свободного члена, RSD – относительное стандартное отклонение (%).

Note. X_{ср}, mean of the measured values; X_{серия 1} and X_{серия 2}, mean values for batches 1 and 2; P, confidence level; f, number of degrees of freedom; t, Student's t-test (probability=0.95; n=2); F_{практ} and F_{теор}, calculated and critical Fisher's test values, respectively (significance level=0.05; number of degrees of freedom=2); s², variance; s, standard deviation; s₁ and s₂, standard deviations of test results, the highest and the lowest, respectively; a, y-intercept; s_a, standard deviation of the y-intercept; RSD, relative standard deviation (%).

Выводы

1. Разработана и валидирована методика подтверждения подлинности и количественного определения суммы алкалоидов в термопсиса экстракте сухом методом ВЭТСХ с денситометрической оценкой результатов анализа.

2. Использование стандартных образцов и специфичного реактива для идентификации алкалоидов позволило обнаружить три доминирующих алкалоида термопсиса (термопсин, цитизин и неидентифицированный алкалоид с R_f ≈ 0,2), содержание которых составило около 80% от суммы алкалоидов экстракта, и четыре алкалоида, содержание которых было незначительным.

3. Содержание цитизина имеет важное значение для оценки качества сырья, используемого для производства экстракта термопсиса сухого, предназначенного для производства отхаркивающих препаратов.

4. Одновременное определение подлинности и содержания суммы алкалоидов в термопсиса экстракте сухом с использованием предложенной методики ВЭТСХ-денситометрии позволяет сократить время выполнения испытания с 4–5 до 2–2,5 ч.

В Федеральную службу по интеллектуальной собственности подана заявка № 2022132871 от 15.12.2022 на выдачу патента Российской Федерации на изобретение «Способ определения алкалоидов в экстракте термопсиса».

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Косарев ВВ, Бабанов СА. Отхаркивающие препараты. *Медицинская сестра*. 2011;(5):40–5. Kosarev VV, Babanov SA. Expectorants. *Nurse*. 2011;(5):40–5 (In Russ.). EDN: [OBUTMN](#)
2. Ложкин ЮГ, Андреева ДМ, Давыдова ВН. Отхаркивающие средства растительного происхождения. *Фармация*. 2013;(2):52–6. Lozhkin YuG, Andreeva DM, Davydova VN. Herbal expectorants. *Pharmacy*. 2013;(2):52–6 (In Russ.). EDN: [PXKGVJ](#)
3. Быков ВА, ред. Атлас лекарственных растений России. М.: ВИЛАР; 2006. Bykov VA, ed. Atlas of medicinal plants of Russia. Moscow: VILAR; 2006 (In Russ.).
4. Цыпышева ИП, Галкин ЕГ, Ерастов АС, Каримова ОА, Байкова ИП, Рахимов РГ и др. Растительные источники хинолизидиновых алкалоидов на территории Республики Башкортостан. I. Алкалоиды *Thermopsis schischkinii* и *Thermopsis lanceolata* ssp. *Sibirica* (Fabaceae) в условиях интродукции. *Химия растительного сырья*. 2012;(4):181–6. Tsyypysheva IP, Galkin EG, Erastov AS, Karimova OA, Baikova IP, Rakhimov RG, et al. The search of quinolizidine alkaloids plant sources in the territory of the Republic of Bashkortostan. I. Alkaloids of *Thermopsis schischkinii* and *Thermopsis lanceolata* ssp. *Sibirica* (Fabaceae) under conditions of cultivation. *Chemistry of Plant Raw Material*. 2012;(4):181–6 (In Russ.). EDN: [PWEAZD](#)
5. Панова ЕП, Владимировна ОВ, Куриленко МИ, Дряглина ЛП. Судебно-химическое определение тропикамида. В кн.: Ардашкин АП, ред. *Вопросы судебной медицины, медицинского права и биоэтики*. Самара: Офорт; 2011. С. 159–69. Panova EP, Vladimirova OV, Kurylenko MI, Dryaglina LP. Forensic chemical determination of tropicamide. In: Ardashkin AP, ed. *Issues of forensic medicine, medical law and bioethics*. Samara: Ofort; 2011. P. 159–69 (In Russ.).

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: И.М. Моргунов – идея работы, выполнение экспериментальной части исследований по количественному определению суммы алкалоидов термопсиса экстракта сухого, написание текста рукописи; Н.П. Антонова – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ; Е.П. Шефер – разработка дизайна валидационного исследования и обработка его результатов; С.С. Прохвятилова – сбор, анализ и обобщение данных литературы; Т.А. Голомазова – выполнение экспериментальной части исследований.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121021800098-4).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Igor M. Morgunov elaborated the study idea, conducted the experiments for quantitative determination of total alkaloids in thermopsis dry extract, and drafted the manuscript. Nataliya P. Antonova consulted the research team on individual steps of experimental work. Elena P. Shefer designed the method validation study and processed its results. Svetlana S. Prokhvatilova collected, analysed, and consolidated literature data. Tatiana A. Golomazova conducted experiments.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00052-23-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121021800098-4).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Моргунов Игорь Михайлович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3907-3456>
Morgunov@expmed.ru

Антонова Наталия Петровна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>
nantonova@expmed.ru

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>
shefer@expmed.ru

Прохвятилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>
prokhvatilova@expmed.ru

Голомазова Татьяна Александровна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>
golomazovata@expmed.ru

Поступила 05.04.2022

После доработки 23.06.2022

Принята к публикации 21.11.2022

Online first 14.04.2023

Igor M. Morgunov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3907-3456>
Morgunov@expmed.ru

Natalia P. Antonova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>
nantonova@expmed.ru

Elena P. Shefer, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>
shefer@expmed.ru

Svetlana S. Prokhvatilova, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>
prokhvatilova@expmed.ru

Tatiana A. Golomazova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>
golomazovata@expmed.ru

Received 5 April 2022

Revised 23 June 2022

Accepted 21 November 2022

Online first 14 April 2023