



Т.А. Голомазова 
Н.П. Антонова 
Н.Е. Семенова 
Е.П. Шефер 
С.С. Прохвятилова 

Разработка и валидация методики определения конваллятоксина в лекарственных препаратах, содержащих сердечные гликозиды ландыша

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

✉ Голомазова Татьяна Александровна; golomazovata@expmed.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Надлежащий контроль содержания сердечных гликозидов в лекарственных препаратах на основе ландыша необходим для обеспечения безопасности их применения. В Российской Федерации фармакопейными методами количественного анализа сердечных гликозидов ландыша являются биологический и спектрофотометрический. Необходимо использовать более точные и селективные физико-химические методы анализа сердечных гликозидов, например метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения сердечных гликозидов (конваллятоксина) в лекарственных растительных препаратах на основе ландыша методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В качестве объектов исследования были использованы: «Ландыша настойка», «Зеленина капли», «Валокормид», «Карниланд®», «Экстракт ландыша — стандартный образец». Количественное определение сердечных гликозидов проводили методами ВЭЖХ и спектрофотометрии в сравнении со стандартным образцом конваллятоксина. Для пробоподготовки использовали методику, описанную в ФС.3.4.0003.18. «Ландыша травы настойка». Хроматографическое разделение смеси сердечных гликозидов проводили на колонке Luna 5µm C18(2) в градиентном режиме элюирования смесью 0,1% раствора ортофосфорной кислоты и ацетонитрила. В процессе анализа использовали автосемплер с охлаждением проб до 5 °С.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Результаты оценки специфичности, внутрилабораторной прецизионности, линейности (коэффициент корреляции 0,99985), правильности (98–102%), повторяемости (относительное стандартное отклонение содержания конваллятоксина — 1,61%) методики соответствуют критериям приемлемости. Методика пригодна для количественного определения конваллятоксина в лекарственных препаратах на основе ландыша, так как позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты.

ВЫВОДЫ. Разработана высокочувствительная и селективная ВЭЖХ-методика количественного определения конваллятоксина в лекарственных растительных препаратах на основе ландыша. Содержание конваллятоксина в субстанции-жидкости «Ландыша настойка» составило от 0,012 до 0,018 мг/мл, в лекарственных препаратах «Зеленина капли» — от 0,004 до 0,013 мг/мл, «Карниланд®» и «Валокормид» — от 0,005 до 0,007 мг/мл, в экстракте ландыша — стандартном образце — 0,029 мг/мл.

Ключевые слова: сердечные гликозиды; конваллятоксин; высокоэффективная жидкостная хроматография; ВЭЖХ; трава ландыша; лекарственные растительные препараты; капли Зеленина

Для цитирования: Голомазова Т.А., Антонова Н.П., Семенова Н.Е., Шефер Е.П., Прохвятилова С.С. Разработка и валидация методики определения конваллятоксина в лекарственных препаратах, содержащих сердечные гликозиды ландыша. *Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2024;14(5):580–589. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00026-24-01 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 124022200096-0).

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Tatyana A. Golomazova 
Natalia P. Antonova 
Natalia E. Semenova 
Elena P. Shefer 
Svetlana S. Prokhvatilova 

Development and Validation of an Analytical Procedure for Determining Convallatoxin in Medicinal Products Containing Cardiac Glycosides of Lily of the Valley

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

✉ Tatyana A. Golomazova; golomazovata@expmed.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. The safe use of lily-of-the-valley medicinal products requires adequately controlling the content of cardiac glycosides. The State Pharmacopoeia of the Russian Federation stipulates that the content of cardiac glycosides in lily-of-the-valley medicinal products should be quantified using bioassays and spectrophotometry. However, the determination of cardiac glycosides needs more accurate and selective physicochemical methods, such as high-performance liquid chromatography (HPLC).

AIM. This study aimed to develop and validate an HPLC analytical procedure for the quantitative determination of cardiac glycosides (convallatoxin) in lily-of-the-valley herbal medicinal products.

MATERIALS AND METHODS. The study examined the Lily-of-the-Valley Tincture, Zelenin Drops, Valocormid, Carniland®, and Lily-of-the-Valley Extract Reference Standard samples. The content of cardiac glycosides was determined by comparison with a reference standard for convallatoxin by HPLC and spectrophotometry. The samples were prepared as outlined in Monograph 3.4.0003.18 Lily-of-the-Valley Herb Tincture of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation. Mixed cardiac glycosides were separated on a Luna 5 µm C18(2) column by gradient elution with 0.1% orthophosphoric acid in water and acetonitrile. The analysis was performed using an autoinjector with sample cooling to 5 °C.

RESULTS. The developed analytical procedure met the acceptance criteria for specificity, intermediate precision, linearity (correlation coefficient of 0.99985), and repeatability (relative standard deviation of convallatoxin measurements of 1.61%). The analytical procedure is suitable for the quantitative determination of convallatoxin in lily-of-the-valley herbal medicinal products because it produces reliable and repeatable results.

CONCLUSIONS. The authors developed a highly sensitive and selective HPLC analytical procedure for the quantitative determination of convallatoxin in lily-of-the-valley herbal medicinal products. The content of convallatoxin ranged from 0.012 to 0.018 mg/mL in the liquid active substance Lily-of-the-Valley Tincture, from 0.004 to 0.013 mg/mL in the medicinal product Zelenin Drops, and from 0.005 to 0.007 mg/mL in the medicinal products Carniland® and Valocormid. For the Lily-of-the-Valley Extract Reference Standard, the content of convallatoxin amounted to 0.029 mg/mL.

Keywords: cardiac glycosides; convallatoxin; high-performance liquid chromatography; HPLC; lily-of-the-valley herb; herbal medicinal products; Zelenin Drops

For citation: Golomazova T.A., Antonova N.P., Semenova N.E., Shefer E.P., Prokhvatilova S.S. Development and validation of an analytical procedure for determining convallatoxin in medicinal products containing cardiac glycosides of lily of the valley. *Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2024;14(5):580–589. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589>

Funding. This study was conducted by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products as part of the applied research funded under State Assignment No. 056-00026-24-01 (R&D Registry No. 124022200096-0).

Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечные гликозиды (СГ) представляют собой группу биологически активных веществ (БАВ), обладающих в терапевтических дозах кардиотоническим и антиаритмическим действием. Они представляют собой вторичные метаболиты растений, в частности рода *Convallaria* (ландыш). Из травы, листьев и цветов ландыша майского — *C. majalis* L., ландыша закавказского — *C. transcaucasica* Utkin ex Grossh. и ландыша Кейске — *C. keiskei* Mig. выделяют сердечный гликозид конваллятоксин¹.

Механизм действия таких СГ, как конваллятоксин, основан на их способности ингибировать активность натрий-калиевой АТФ-азы, что влияет на ионообменные процессы в сердечной мышце и вызывает изменение внутримиеокардиального кальциевого обмена и силы сокращения сердца. Это приводит к повышению сократительной способности сердца, регуляции сердечного ритма и улучшению гемодинамики. Препараты СГ применяются для лечения сердечной недостаточности разной этиологии [1–5]. На российском фармацевтическом рынке СГ представлены одно- и многокомпонентными препаратами.

Из травы ландыша получают настойку, которая входит в состав комплексных лекарственных растительных препаратов (ЛРП)² в сочетании с другими компонентами природного и синтетического происхождения [6]: настойками пустырника, валерианы, белладонны, жидкими экстрактами боярышника, крапивы, нитроглицерина, ментолом, ментилизовалератом, натрия бромидом. Надлежащий контроль содержания СГ необходим для обеспечения безопасного использования препаратов на основе ландыша. Совместно присутствующие компоненты могут оказывать влияние на количественное определение СГ ландыша в комплексных ЛРП.

Согласно требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)³ для коли-

чественной оценки СГ ландыша применяют два метода: биологический и спектрофотометрический. Спектрофотометрический метод основан на способности СГ образовывать хромогенный комплекс при взаимодействии с пикриновой кислотой. Методика характеризуется высокой трудоемкостью и низкой селективностью. Метод биологической стандартизации является арбитражным и основан на способности СГ в токсических дозах вызывать систолическую остановку сердца у лягушек различных видов⁴. Данный метод позволяет установить только силу действия СГ, а не их точное содержание. Проведение испытаний на животных связано с рядом этических проблем. В международной практике проведение научных исследований без участия животных поддерживается положением Директивы Европейского парламента и Совета Европейского союза «О защите животных, использующихся в научных целях» № 2010/63/ЕС. Кроме того, биологические методы не всегда обеспечивают желаемую воспроизводимость и точность результатов (ошибка анализа составляет от 20 до 25%) и требуют специфических навыков для выполнения экспериментов с животными.

Учитывая недостатки применяемых методов [6, 7], необходимо использовать более точные и селективные физико-химические методы анализа СГ. Например, метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), который позволяет разделять и идентифицировать индивидуальные соединения в многокомпонентных ЛС.

Цель работы — разработка и валидация методики количественного определения сердечных гликозидов (конваллятоксина) в лекарственных растительных препаратах на основе ландыша методом ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. Субстанция-жидкость «Ландыша настойка» (серии 010822 и 050423)

¹ ФС.3.4.0003.18 Ландыша травы настойка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

² Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru>

³ ФС.3.4.0003.18 Ландыша травы настойка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁴ ОФС.1.2.4.0009.15 Биологические методы оценки активности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, содержащих сердечные гликозиды. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

и лекарственные препараты: «Зеленина капли» (серии 010423, 10323, 010622, 10422, 050623, 30823 и 20823), «Валокормид» (серия 30922), «Карниланд®» (серии 10224 и 10621), «Экстракт ландыша — стандартный образец» (ФС 42-2486-87), стандартный образец (СО) конваллятоксина (Sigma-Aldrich, кат. № С9140, содержание основного вещества 92,0%). Для приготовления раствора плацебо использовали субстанции-жидкости: «Боярышника настойка», «Красавки настойка», «Валерианы настойка», «Пустырника настойка».

Реактивы. Ацетонитрил (квалификация «для ВЭЖХ», Carlo Erba Reagents), хлороформ («для жидкостной хроматографии», Merck), спирт этиловый (96%, Гатчинский спиртовой завод), свинца (II) ацетат тригидрат (Merck), полиамид («для колоночной хроматографии», Sigma-Aldrich), фосфорная кислота (85,9%, Honeywell), пикриновая кислота (Sigma-Aldrich), натрия сульфат безводный (Merck), натрия гидроксид (Merck), натрия бромид («для ИК-спектроскопии», Merck), левоментол (99,6%, Sigma-Aldrich).

Оборудование. Жидкостный хроматограф Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies) с диодно-матричным детектором, хроматографическая колонка Luna C18(2) 250 мм × 4,6 мм × 5 мкм (Phenomenex), электронные весы XPE205DR (Mettler Toledo), система очистки воды Milli-Q Integral 5 (Millipore), шейкер орбитальный KS 501 digital (IKA), испаритель ротационный с баней Rotavapor R-200 (BUCHI lab), спектрофотометр Cary 100 (Varian), ванна ультразвуковая (УЗ) ГРАД-95-35 (ООО «НТК Солтек»).

Пробоподготовку проводили в соответствии с ФС.3.4.0003.18. «Ландыша настойка», как указано в разделе «Количественное определение» (спектрофотометрический метод). Для приготовления испытуемого раствора 5,0 мл субстанции-жидкости «Ландыша настойка» / экстракта ландыша — стандартного образца, помещали в круглодонную колбу, прибавляли 5 мл воды очищенной и упаривали на роторном испарителе до объема около 7 мл. Объем раствора доводили водой очищенной до 10 мл, прибавляли 1 мл 10% раствора свинца ацетата и тщательно перемешивали. Раствор фильтровали в делительную воронку через смоченный водой бумажный складчатый фильтр «черная лента» (ООО «МЕЛИОР XXI»). Фильтр промывали 5 мл воды. В делительную воронку прибавляли 30 мл смеси этиловый спирт 96% — хлороформ (2:8) и взбалтывали на орбитальном шейкере в течение 5 мин. После расслаивания нижний хлороформный

слой фильтровали в колбу для отгона через бумажный фильтр с 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа. Операцию извлечения спирто-хлороформной смесью повторяли еще 2 раза, используя по 30 мл смеси того же состава, и фильтровали хлороформные извлечения в ту же колбу. Фильтр с натрия сульфатом безводным промывали 10 мл спирто-хлороформной смеси, промывную жидкость собирали в ту же колбу.

12,5 мл лекарственного препарата «Зеленина капли» / «Валокормид» / «Карниланд®» помещали в круглодонную колбу и упаривали до объема 5 мл на роторном испарителе. К полученному раствору добавляли 1,5 мл 10% раствора свинца ацетата. Объем раствора доводили до первоначального объема (12,5 мл) водой очищенной и фильтровали через бумажный складчатый фильтр «черная лента», смоченный водой, в делительную воронку. Фильтр промывали 5 мл воды. В делительную воронку прибавляли 30 мл смеси этиловый спирт 96% — хлороформ (2:8) и взбалтывали на орбитальном шейкере в течение 5 мин. После расслаивания нижний хлороформный слой фильтровали через бумажный фильтр с 3 г натрия сульфата безводного, смоченного 5 мл хлороформа, в колбу для отгона. Операцию извлечения спирто-хлороформной смесью повторяли еще 2 раза, используя по 30 мл смеси того же состава, и фильтровали хлороформные извлечения в ту же колбу. Фильтр с натрия сульфатом безводным промывали 10 мл спирто-хлороформной смеси, промывную жидкость собирали в ту же колбу.

Каждый из полученных фильтратов упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 45 °С досуха. Сухие остатки растворяли в 10 мл этилового спирта 25%. Растворы переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Колбы для отгона промывали дважды по 5 мл тем же спиртом, растворы переносили в ту же мерную колбу. Объем растворов в мерных колбах доводили тем же спиртом до метки и перемешивали. Фильтровали полученные растворы через мембранный фильтр из регенерированной целлюлозы.

Приготовление стандартного раствора конваллятоксина. Для приготовления стандартного раствора 10 мг СО конваллятоксина помещали в мерную колбу объемом 10 мл, прибавляли 5 мл 70% этилового спирта, помещали на 5 мин на УЗ-баню при температуре не выше 20 °С, доводили объем раствора тем же растворителем до метки, перемешивали. 1,0 мл полученного раствора переносили в мерную колбу объемом

Таблица 1. Программа градиентного элюирования для количественного определения конваллятоксина в лекарственном растительном препарате

Table 1. Gradient elution programme for the quantitative determination of convallatoxin in herbal medicinal products

Время, мин Time, min	Подвижная фаза А, % Mobile phase A, %	Подвижная фаза Б, % Mobile phase B, %
0	80	20
15	80	20
25	70	30
28	5	95
32	5	95
33	80	20
40	80	20

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. Подвижная фаза А – 0,1% раствор ортофосфорной кислоты в воде, подвижная фаза Б – ацетонитрил.
Note. Mobile phase A: 0.1% orthophosphoric acid in water; mobile phase B: acetonitrile.

10 мл, доводили объем раствора 25% этиловым спиртом до метки, перемешивали.

Идентификацию и количественное определение конваллятоксина в лекарственных растительных препаратах на основе ландыша проводили методом ВЭЖХ в условиях градиентного элюирования (табл. 1) на обращенно-фазовой колонке Luna 5µm C18(2).

Детектирование проводили при длине волны 220 нм. Скорость потока составляла 1 мл/мин, температура колонки – 25 °С, температура термостата автосемплера – 5 °С, объем вводимой пробы – 20 мкл. Время удерживания конваллятоксина в описанных условиях составило 24 мин (рис. 1). Хроматограммы испытуемых растворов препаратов «Валокормид» и «Карниланд®» были аналогичны хроматограммам испытуемого раствора препарата «Зеленина капли». Хроматограмма экстракта ландыша аналогична хроматограммам испытуемого раствора субстанции-жидкости «Ландыша настойка» (рис. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для подтверждения специфичности методики была проведена оценка спектральной чистоты пиков конваллятоксина на хроматограммах растворов стандартного и испытуемого образцов; коэффициент подобия (Similarity Factor, SF) составил 999,91.

Спектры основных пиков на хроматограммах испытуемого и стандартного растворов идентичны и имеют максимум поглощения при 220 ± 2 нм (рис. 2). Времена удерживания конваллятоксина на хроматограммах раствора СО конваллятоксина и испытуемых образцов ЛРП совпадают, пик конваллятоксина на хроматограммах подвижной фазы и растворителя отсутствует. Для подтверждения специфичности методики для анализа многокомпонентных препаратов ландыша

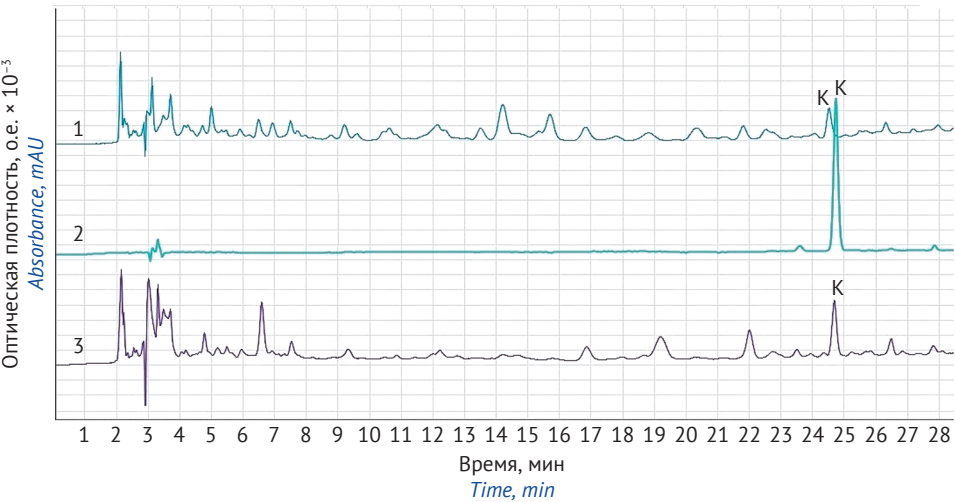


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 1. Типичные хроматограммы для количественного определения конваллятоксина в лекарственных растительных препаратах: 1 – испытуемый раствор «Зеленина капли»; 2 – стандартный образец конваллятоксина; 3 – испытуемый раствор «Ландыша настойка»; К – пик конваллятоксина. Условия анализа: колонка Luna C18(2) 250 мм × 4,6 мм × 5 мкм, градиентное элюирование смесью 0,1% раствора ортофосфорной кислоты и ацетонитрила, скорость потока – 1 мл/мин, детектирование при 220 нм

Fig. 1. Typical chromatograms for the quantitative determination of convallatoxin in herbal medicinal products: 1, Zelenin Drops test solution; 2, convallatoxin reference standard solution; 3, Lily-of-the-Valley Tincture test solution; K, peak of convallatoxin. Analytical conditions: Luna C18(2) 250 mm × 4,6 mm × 5 µm column, gradient elution with 0.1% orthophosphoric acid in water and acetonitrile, flow rate of 1 mL/min, detection at 220 nm

были приготовлены растворы плацебо, содержащие настойку пустырника, настойку валерианы, настойку боярышника, левоментол и натрия бромид. На хроматограммах растворов плацебо пики со временем удерживания, совпадающим со временем удерживания пика конваллятоксина, отсутствовали.

В процессе исследования была проведена очистка испытуемого раствора с применением полиамида для колоночной хроматографии. Для этого 20 мл испытуемого раствора пропустили через колонку диаметром 1 см с 1,2 г полиамида. Полученные хроматограммы испытуемых растворов до и после очистки были идентичны. Таким образом, дополнительная хроматографическая очистка испытуемых растворов от сопутствующих веществ с использованием полиамида была признана нецелесообразной.

Выбор хроматографических условий количественного определения конваллятоксина был проведен на основании данных литературы [8–10]. Результаты анализа, полученные в этих условиях, представлены в таблице 2. Однако условия хроматографирования, описанные в методиках [8, 10], не позволили достичь эффективного разделения веществ. Значения коэффициента разделения (R_s) составили 1,41 и 1,19 соответственно. Это привело к перекрытию пиков на хроматограммах и затруднило корректное интегрирование и количественный

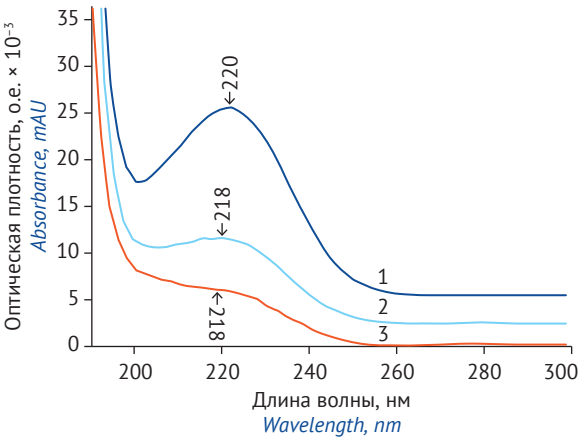


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Спектры поглощения: 1 – раствор стандартного образца конваллятоксина; 2 – испытуемый раствор «Ландыша настойка»; 3 – испытуемый раствор «Зеленина капли»

Fig. 2. Absorption spectra: 1, convallatoxin reference standard solution; 2, Lily-of-the-Valley Tincture test solution; 3, Zelenin Drops test solution

анализ конваллятоксина, а также не позволило установить точное содержание конваллятоксина в многокомпонентных препаратах ландыша. Также при анализе по методикам [8–10] спектральная чистота пика конваллятоксина была во всех случаях недостаточной. SF по методике 1 составил 923,89; по методике 2 – 864,62; по методике 3 – 972,25. При значениях

Таблица 2. Количественное определение конваллятоксина в субстанции-жидкости «Ландыша настойка» и экстракте ландыша – стандартном образце с использованием различных ВЭЖХ-методик

Table 2. Quantitative determination of convallatoxin in the liquid active substance Lily-of-the-Valley Tincture and in the Lily-of-the-Valley Extract Reference Standard using various HPLC-based procedures

Номер и наименование образцов <i>Sample number and name</i>	Результат определения конваллятоксина, мг/мл <i>Convallatoxin quantification result, mg/mL</i>			
	Разработанная методика <i>Developed analytical procedure</i>	Методика 1 <i>Analytical procedure 1</i>	Методика 2 <i>Analytical procedure 2</i>	Методика 3 <i>Analytical procedure 3</i>
1. Ландыша настойка субстанция-жидкость, серия 050423 <i>Lily-of-the-Valley Tincture, liquid active substance, batch 050423</i>	0,01824 <i>RSD=0,18%</i>	0,01956 <i>RSD=3,30%</i>	0,01620 <i>RSD=2,57%</i>	0,01719 <i>RSD=3,20%</i>
2. Ландыша настойка субстанция-жидкость, серия 010822 <i>Lily-of-the-Valley Tincture, liquid active substance, batch 010822</i>	0,01153 <i>RSD=0,67%</i>	0,01307 <i>RSD=3,22%</i>	0,00816 <i>RSD=2,67%</i>	0,00915 <i>RSD=4,16%</i>
3. Экстракт ландыша – стандартный образец <i>Lily-of-the-Valley Extract Reference Standard</i>	0,02947 <i>RSD=0,31%</i>	0,03816 <i>RSD=2,98%</i>	0,02785 <i>RSD=3,08%</i>	0,02516 <i>RSD=3,74%</i>

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.
Условия анализа по методике 1 приведены в источнике [8], по методике 2 – в источнике [9], по методике 3 – в источнике [10].
Note. RSD , relative standard deviation.
The testing conditions for analytical procedure 1 are specified in [8], those for analytical procedure 2 are given in [9], and those for analytical procedure 3 are described in [10].

$SF < 990$ различие между спектрами считается значимым [11], то есть пик не является спектрально чистым.

На следующем этапе исследований были подобраны оптимальный состав и значение pH подвижной фазы, а также использован градиентный режим элюирования, позволяющий полностью разделить пики ($R_s \sim 4,40$). Эти факторы помогли достичь наилучшего хроматографического разделения и повысить эффективность метода.

Далее были проведены сравнительные исследования по определению конваллятоксина в многокомпонентных препаратах ландыша методом спектрофотометрии в видимой области спектра⁵, включенной в большинство зарегистрированных нормативных документов, и с использованием разработанной ВЭЖХ-методики (табл. 3). Было установлено, что результаты количественного определения СГ методом спектрофотометрии с использованием значения удельного показателя поглощения конваллятоксина – 170 при длине волны 495 нм оказываются завышенными в 10–13 раз, а с использованием стандартного образца конваллятоксина – в 5–7 раз по сравнению с результатами, полученными методом ВЭЖХ. Такая разница результатов обусловлена тем, что при использовании спектрофотометрической методики рассчитывается сумма СГ в пересчете на конваллятоксин, а при использовании методики ВЭЖХ – содержание индивидуально-

го вещества – конваллятоксина. На полученных спектрах поглощения испытуемых растворов (рис. 3) отсутствовал четко выраженный максимум поглощения. Таким образом, можно говорить о большей селективности ВЭЖХ-методики по сравнению со спектрофотометрической.

Для оценки пригодности хроматографической системы была использована хроматограмма СО конваллятоксина и вычислены:

- значение фактора асимметрии пика конваллятоксина – 1,07;
- относительное стандартное отклонение площади пика конваллятоксина для 6 определений – 0,21%.

Содержание конваллятоксина (X , мг/мл) в субстанции-жидкости «Ландыша настойка», препаратах «Зеленина капли» и «Валокормид» вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S \times C_0 \times P \times 25}{S_0 \times V \times 100}, \quad (1)$$

где S – площадь пика конваллятоксина на хроматограмме испытуемого раствора; S_0 – площадь пика конваллятоксина на хроматограмме стандартного раствора; P – содержание конваллятоксина в стандартном образце, %; V – объем испытуемого образца (Ландыша настойка – 5 мл, «Зеленина капли» / «Валокормид» / «Кардиланд®» – 12,5 мл); C_0 – концентрация конваллятоксина в растворе стандартного образца, мг/мл.

С использованием разработанной ВЭЖХ-методики были получены следующие результаты содержания конваллятоксина: в субстанции-жидкости «Ландыша настойка» от 0,012 до 0,018 мг/мл, в лекарственных препаратах «Зеленина капли» от 0,004 до 0,013 мг/мл, «Кардиланд®», «Валокормид» от 0,005 до 0,007 мг/мл, в экстракте ландыша – стандартном образце 0,029 мг/мл.

Валидация⁶ разработанной аналитической методики проводилась по критериям: специфичность, линейность, внутрилабораторная прецизионность, правильность, повторяемость, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО).

ПО и ПКО были рассчитаны по величине стандартного отклонения сигнала и угловому коэффициенту графика линейной зависимости аналитического сигнала от концентрации определяемого вещества в анализируемой пробе по уравнениям:

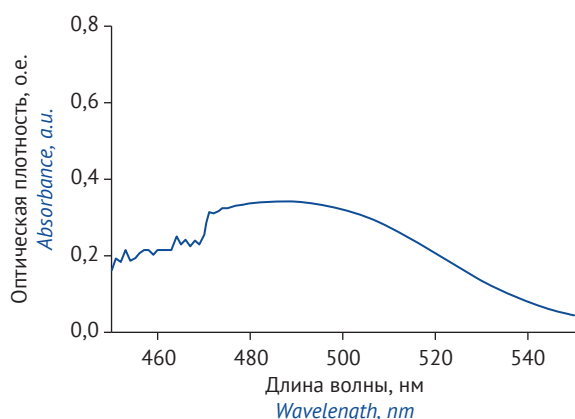


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Спектр поглощения продуктов взаимодействия сердечных гликозидов ландыша с пикриновой кислотой в препаратах ландыша

Fig. 3. Absorption spectra of reaction products of cardiac glycosides and picric acid in lily-of-the-valley medicinal products

⁵ ФС.3.4.0003.18 Ландыша травы настойка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁶ ОФС.1.1.0012 Валидация аналитических методик. Государственная фармакопея Российской Федерации. XV изд. М.; 2023.

Таблица 3. Количественное определение сердечных гликозидов (СГ) в многокомпонентных препаратах ландыша методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ; разработанная методика) и спектрофотометрии⁷ (СФМ)

Table 3. Quantitative determination of cardiac glycosides (CGs) in multicomponent medicinal products of lily of the valley by the developed analytical procedure based on high-performance liquid chromatography (HPLC) and by spectrophotometry⁷

Наименование препарата и серия образца <i>Medicinal product name and sample batch</i>	Результат определения, мг/мл, <i>Result, mg/mL</i>			Требования к количественному содержанию СГ <i>CG content requirements</i>
	ВЭЖХ (конваллятоксин) <i>HPLC (convallatoxin)</i>	СФМ (по удельному показателю поглощения конваллятоксина) <i>Spectrophotometry (specific absorbance of convallatoxin)</i>	СФМ (с использованием стандартного образца) <i>Spectrophotometry (reference standard for convallatoxin)</i>	
Зеленина капли, серия 030823 <i>Zelenin Drops, batch 030823</i>	0,00413 <i>RSD=2,64%</i>	0,05398 <i>RSD=0,88%</i>	0,03256 <i>RSD=0,88%</i>	Сумма СГ в пересчете на конваллятоксин от 0,040 до 0,060 мг/мл (метод СФМ) <i>Total CGs expressed as convallatoxin: 0.040–0.060 mg/mL (spectrophotometry)</i>
Зеленина капли, серия 050623 <i>Zelenin Drops, batch 050623</i>	0,00490 <i>RSD=0,56%</i>	0,05811 <i>RSD=1,13%</i>	0,03506 <i>RSD=1,13%</i>	
Зеленина капли, серия 10323 <i>Zelenin Drops, batch 10323</i>	0,01123 <i>RSD=0,79%</i>	0,11386 <i>RSD=1,32%</i>	0,06868 <i>RSD=1,32%</i>	
Зеленина капли, серия 20823 <i>Zelenin Drops, batch 20823</i>	0,01028 <i>RSD=1,42%</i>	0,06736 <i>RSD=0,66%</i>	0,04063 <i>RSD=0,66%</i>	
Зеленина капли, серия 010622 <i>Zelenin Drops, batch 010622</i>	0,01138 <i>RSD=1,63%</i>	0,06531 <i>RSD=0,44%</i>	0,04019 <i>RSD=0,44%</i>	
Зеленина, капли, серия 010423 <i>Zelenin Drops, batch 010423</i>	0,01280 <i>RSD=2,58%</i>	0,11454 <i>RSD=1,42%</i>	0,06910 <i>RSD=1,42%</i>	
Зеленина, капли, серия 10422 <i>Zelenin Drops, batch 10422</i>	0,00593 <i>RSD=1,03%</i>	0,06554 <i>RSD=0,67%</i>	0,03994 <i>RSD=0,67%</i>	Содержание СГ не нормируется <i>CG content not standardised</i>
Карниланд®, серия 10621 <i>Carniland®, batch 10621</i>	0,00480 <i>RSD=1,89%</i>	0,04551 <i>RSD=0,55%</i>	0,02745 <i>RSD=0,55%</i>	
Карниланд®, серия 10224 <i>Carniland®, batch 10224</i>	0,00614 <i>RSD=0,60%</i>	0,04217 <i>RSD=1,07%</i>	0,02544 <i>RSD=1,07%</i>	Сумма СГ в пересчете на конваллятоксин от 0,034 до 0,045 мг/мл (метод СФМ) <i>Total CGs expressed as convallatoxin: 0.034–0.045 mg/mL (spectrophotometry)</i>
Валокормид, серия 30922 <i>Valocormid, batch 30922</i>	0,00710 <i>RSD=0,92%</i>	0,08718 <i>RSD=2,45%</i>	0,05259 <i>RSD=2,45%</i>	

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

Примечание. RSD – относительное стандартное отклонение.

Note. RSD, relative standard deviation.

$$ПО = 3,3 \times \frac{s}{b}, \quad (2)$$

$$ПКО = 10 \times \frac{s}{b}, \quad (3)$$

где *s* – стандартное отклонение аналитического сигнала; *b* – коэффициент чувствительности, представляющий собой отношение аналитического сигнала к определяемой величине (тангенс угла наклона калибровочной кривой). Результаты определения ПО и ПКО

конваллятоксина методом ВЭЖХ представлены в *таблице 4*, опубликованной на сайте журнала⁸.

ПО и ПКО методики составили 0,018 и 0,055 мкг/мл соответственно. Результаты валидационных исследований аналитической методики количественного определения конваллятоксина в субстанции-жидкости «Ландыша настойка» представлены в *таблице 5*, опубликованной на сайте журнала⁹. Полученные данные подтверждают соответствие методики критериям приемлемости.

⁷ ФС.3.4.0003.18 Ландыша травы настойка. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4. М.; 2018.

⁸ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table4>

⁹ <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table5>

Разработанная методика количественного определения конваллятоксина в препаратах ландыша позволяет получать достоверные, воспроизводимые результаты.

ВЫВОДЫ

1. Разработана высокочувствительная (ПКО 0,055 мкг/мл) и селективная методика количественного определения сердечного гликозида – конваллятоксина в лекарственных растительных препаратах на основе ландыша методом ВЭЖХ.
2. Результаты оценки специфичности, внутрилабораторной прецизионности, линейности (коэффициент корреляции 0,99985), правильности (98–102%), повторяемости (относительное

стандартное отклонение содержания конваллятоксина – 1,61%) методики соответствуют критериям приемлемости. Методика пригодна для количественного определения конваллятоксина в лекарственных препаратах на основе ландыша, так как позволяет получать достоверные и воспроизводимые результаты.

3. С использованием разработанной ВЭЖХ-методики определено содержание конваллятоксина в субстанции-жидкости «Ландыша настойка» (0,012–0,018 мг/мл), в лекарственных препаратах «Зеленина капли» (0,004–0,013 мг/мл), «Карниланд®» и «Валокормид» (0,005–0,007 мг/мл), в экстракте ландыша – стандартном образце 0,029 мг/мл.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Haviv H, Karlsh SJD. P-Type pumps: Na⁺,K⁺-ATPase. Lennarz WJ, Lane MD. *Encyclopedia of biological chemistry*. Academic Press; 2013.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00198-5>
2. Wang HJ, Evans RM. Timed use of cardiac glycoside protects the heart. *Nat Cardiovasc Res*. 2022;1(11):973–5.
<https://doi.org/10.1038/s44161-022-00158-x>
3. Kanji S, MacLean RD. Cardiac glycoside toxicity: more than 200 years and counting. *Crit Care Clin*. 2012;28(4):527–35.
<https://doi.org/10.1016/j.ccc.2012.07.005>
4. Гуревич МА, Гаврилин АА. Сердечные гликозиды в современной клинической практике. *Альманах клинической медицины*. 2014;(35):101–5.
Gurevich MA, Gavrilin AA. Cardiac glycosides in up-to-date clinical practice. *Almanac of Clinical Medicine*. 2014;(35):101–5 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18786/2072-0505-2014-35-101-105>
5. Дукельская НК, Гармашова ИВ, Давыдова МВ. Сравнительный анализ препаратов сердечных гликозидов, используемых в современной фармакотерапии. *Известия Российской военно-медицинской академии*. 2020;39(53–4):82–5.
Dukelskaya NK, Garmashova IV, Davydova MV. Comparative analysis of the products of cardiac glycosides used in modern pharmacotherapy. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2020;39(53–4):82–5 (In Russ.).
EDN: [SNCHYH](https://doi.org/10.18786/2072-0505-2014-35-101-105)
6. Евдокимова ОВ, Бекетова АВ, Наумова ОА, Клинкова ИВ, Шемерянкина ТБ, Ладыгина ЛА, Бущик КС. Современные методы идентификации и количественного определения сердечных гликозидов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(4):567–77.
Evdokimova OV, Beketova AV, Naumova OA, Klinkova IV, Shemeryankina TB, Ladygina LA, Bushchik KS. Modern methods for identification and quantification of cardiac glycosides. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(4):567–77 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-13-4-567-577>
7. Круглов ДС, Кошкарёва КЕ. Количественное определение конваллятоксина в растительном сырье, содержащем кардиостероиды, методом фотометрии. *Сибирский медицинский вестник*. 2019;(4):34–7.
Kruglov DS, Koshkareva KE. Quantitative estimation of convallatoxin in plant raw material containing cardioteroids by photometry. *Sibirskij Medicinskij Vestnik*. 2019;(4):34–7 (In Russ.).
EDN: [LHXXYU](https://doi.org/10.1007/s10886-018-1040-3)
8. Züst T, Petschenka G, Hastings AP, Agrawal AA. Toxicity of milkweed leaves and latex: chromatographic quantification versus biological activity of cardenolides in 16 *Asclepias* species. *J Chem Ecol*. 2019;45(1):50–60.
<https://doi.org/10.1007/s10886-018-1040-3>
9. Agrawal P, Akhade M, Laddha K, Narkhede S, Mirgal A, Salunke C. Quantification of convallatoxin in *Antiaris toxicaria* Leusch seeds by RP-HPLC. *Anal Chem Lett*. 2014;4(3):172–7.
<https://doi.org/10.1080/22297928.2014.925821>
10. Pellati F, Bruni R, Bellardi MG, Bertaccini A, Benvenuti S. Optimization and validation of a high-performance liquid chromatography method for the analysis of cardiac glycosides in *Digitalis lanata*. *J Chromatogr A*. 2009;1216(15):3260–9.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.02.042>
11. Эпштейн НА. Валидация хроматографических методов: контроль чистоты пиков и специфичности методик с использованием диодно-матричных детекторов (обзор). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):129–36.
Epshtein NA. Validation of chromatographic methods: checking the peak purity and the specificity of methods with diode array detectors (review). *Drug Development & Registration*. 2020;9(3):129–36 (In Russ.).
<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-3-129-136>

Дополнительная информация. На сайте журнала «Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств» размещены таблицы 4, 5.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table5>

Additional information. Tables 4 and 5 are published on the website of *Regulatory Research and Medicine Evaluation*.
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table4>
<https://doi.org/10.30895/1991-2919-2024-14-5-580-589-table5>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: Т.А. Голомазова — выполнение экспериментальной части исследований, написание текста рукописи; Н.П. Антонова — идея, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; Н.Е. Семенова — обобщение результатов исследования и интерпретация результатов; Е.П. Шефер — разработка дизайна валидационного исследования и обработка его результатов, критический пересмотр текста рукописи; С.С. Прохвятилова — сбор, анализ и обобщение данных литературы.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. Tatyana A. Golomazova conducted experiments and drafted the manuscript. Natalia P. Antonova conceived the study idea, designed the study, provided consultations on individual stages of the experimental work, and approved the final version of the manuscript for publication. Natalia E. Semenova summarised and interpreted the study results. Elena P. Shefer designed the validation study, analysed its results, and critically revised the manuscript. Svetlana S. Prokhvatilova collected, analysed, and summarised literature data.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Голомазова Татьяна Александровна / Tatyana A. Golomazova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9917-9367>

Антонова Наталия Петровна, канд. биол. наук / Natalia P. Antonova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

Семенова Наталья Евгеньевна / Natalia E. Semenova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6787-0647>

Шефер Елена Павловна, канд. фарм. наук / Elena P. Shefer, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

Прохвятилова Светлана Степановна, канд. фарм. наук / Svetlana S. Prokhvatilova, Cand. Sci. (Pharm.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

Поступила 06.08.2024

После доработки 09.09.2024

Принята к публикации 21.10.2024

Received 6 August 2024

Revised 9 September 2024

Accepted 21 October 2024