

Оригинальная статья / Research article

UDK 615.074

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638>

Разработка и валидация методики количественного определения полипrenoлов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии

Н. С. Попов¹, А. А. Антипина²✉, С. В. Савинцев³, В. Ю. Балабаньян⁴

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России). 170100, Россия, г. Тверь, ул. Советская, д. 4

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (МГУ имени М. В. Ломоносова). 119991, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1

³ Индивидуальный предприниматель Савинцев Сергей Владимирович. Россия, г. Москва

⁴ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГАУ ВО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России). 117997, Россия, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

✉ Контактное лицо: Антипина Анастасия Андреевна. E-mail: antipina_aa@rambler.ru

ORCID: Н. С. Попов – <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>; А. А. Антипина – <https://orcid.org/0000-0002-8970-3495>;

С. В. Савинцев – <https://orcid.org/0009-0000-5639-5548>; В. Ю. Балабаньян – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>.

Статья поступила: 03.11.2023

Статья принята в печать: 19.04.2024

Статья опубликована: 19.04.2024

Резюме

Введение. Полипrenoлы представляют собой класс длинноцепочечных изопреноидных спиртов природного происхождения. Полипrenoлы являются природными биорегуляторами, принимающими непосредственное участие в синтезе гликопротеинов клеточных мембран, обладают выраженной гепатопротекторной активностью, а также иными видами фармакологического действия, что обуславливает интерес к данным веществам как к перспективному лекарственному средству. Определение суммы полипrenoлов в экстракционных препаратах является нетривиальной задачей, требующей разработки и внедрения точных и воспроизводимых аналитических методик, которые впоследствии будут использованы в стандартизации.

Цель. Разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики идентификации и количественного определения полипrenoлов.

Материалы и методы. Хроматографическое разделение полипrenoлов выполняли с применением высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США), элюирование проводили смесью метанола, *n*-гексана, пропанола-2, водного раствора аммония ацетата в градиентном режиме. Детектором выступал масс-спектрометр типа «тройной квадруполь» AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур), регистрацию полипrenoлов осуществляли по определенным аддуктам.

Результаты и обсуждение. В ходе эксперимента разработаны условия хроматографического разделения и детектирования полипrenoлов. Разработанная методика валидирована по следующим характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения, линейности, правильности, прецизионности, диапазону применения, устойчивости.

Заключение. Практическая значимость проделанной работы заключается в возможности применения разработанной методики в целях установления содержания полипrenoлов в лекарственных препаратах или фармацевтических субстанциях. С помощью разработанной методики было установлено содержание полипrenoлов в субстанции, полученной из гинкго двулопастного (*Ginkgo biloba* L.) и ели обыкновенной (*Picea abies* L.).

Ключевые слова: полипrenoлы, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, ВЭЖХ-МС/МС, валидация

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Н. С. Попов разрабатывал и валидировал методику определения полипrenoлов. А. А. Антипина получала субстанцию полипrenoлов из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. и валидировала методику их определения. С. В. Савинцев получал субстанцию полипrenoлов из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. В. Ю. Балабаньян был ответственен за организационные вопросы, касающиеся исследования. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Для цитирования: Попов Н. С., Антипина А. А., Савинцев С. В., Балабаньян В. Ю. Разработка и валидация методики количественного определения полипrenoлов с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2024;13(2):133–141. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638>

Development and validation of the chromatography-mass spectrometry technique for polyprenols quantitative assessment

Nikita S. Popov¹, Anastasiia A. Antipina²✉, Sergey V. Savintsev³, Vadim Y. Balabanyan⁴

¹ Tver State Medical University. 4, Sovetskaya str., Tver, 70100, Russia

² Lomonosov Moscow State University. 1, Leninskie Gory str., Moscow, 119991, Russia

³ Individual entrepreneur Sergey V. Savintsev. Moscow, Russia

⁴ N. I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov RNRMU). 1, Ostrovityanova str., Moscow, 117997, Russia

✉ Corresponding author: Anastasiia A. Antipina. E-mail: antipina_aa@rambler.ru

ORCID: Nikita S. Popov – <https://orcid.org/0000-0002-1792-7414>; Anastasiia A. Antipina – <https://orcid.org/0000-0002-8970-3495>;

Sergey V. Savintsev – <https://orcid.org/0009-0000-5639-5548>; Vadim Yu. Balabanyan – <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>.

Received: 03.11.2023

Accepted: 19.04.2024

Published: 19.04.2024

© Попов Н. С., Антипина А. А., Савинцев С. В., Балабаньян В. Ю., 2024

© Popov N. S., Antipina A. A., Savintsev S. V., Balabanyan V. Yu., 2024

Abstract

Introduction. Polyphenols are known as a class of natural long-chain isoprenoid alcohols, which are natural bioregulators that directly participate in the synthesis of cell membrane glycoproteins. Their hepatoprotective activity is proven, as well other types of their pharmacological effects are known, which is the reason of significant interest in these substances as a promising medicinal product. It is non-trivial task to determine the sum of polyphenols in extracts as include design and implementation of accurate reproducible analytical methods, which will subsequently be used in standardization.

Aim. Development and validation of the chromatographic-mass spectrometric technique for polyphenols identification and their quantitative assessment.

Materials and methods. Chromatographic separation of polyphenols was performed by using an HPLC Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США); with the mixture of methanol, *n*-hexane, propanol-2, and aqueous ammonium acetate solution as eluent in gradient mode. An AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Singapore) triple quadrupole mass spectrometer was used as a detector, with the registration of polyphenols adducts.

Results and discussion. The conditions for chromatographic separation and detection of polyphenols were identified. The developed technique was validated for the following characteristics: specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, accuracy, precision, range of application, and stability.

Conclusion. It was determined the content of polyphenols in the substance received from *Ginkgo biloba* L. and *Picea abies* L. The developed technique can be used in the future to assess the content of polyphenols in drug products or pharmaceutical substances.

Keywords: polyphenols, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, HPLC-MS/MS, validation

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Nikita S. Popov developed and validated the technique of polyphenols determination. Anastasiia A. Antipina obtained polyphenols substance from *Picea abies* L. and *Ginkgo biloba* L. and validated the technique of their determination. Sergey V. Savintsev obtained polyphenols substance from *Picea abies* L. and *Ginkgo biloba* L., Vadim Y. Balabanyan was responsible for the organization of the study. All authors participated in discussing the results and writing the text of the article.

For citation: Popov N. S., Antipina A. A., Savintsev S. V., Balabanyan V. Yu. Development and validation of the chromatography-mass spectrometry technique for polyphenols quantitative assessment. *Drug development & registration*. 2024;13(2):133–141. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-2-1638>

ВВЕДЕНИЕ

Полипrenoлы представляют собой класс природных длинноцепочечных изопреноидных спиртов с общей формулой $\text{H}-(\text{C}_5\text{H}_8)_n-\text{H}$, где n – число изопреновых единиц, соединенных в положении «голова – хвост», с гидроксильной группой на одном конце и атомом водорода на другом [1]. Полипrenoлы являются природными биорегуляторами, принимающими непосредственное участие в синтезе гликопротеинов клеточных мембран, обладают выраженной гепатопротекторной активностью, а также иными видами фармакологического действия, что обуславливает интерес к данным веществам как к перспективному лекарственному средству [2]. Так, известно, что полипrenoлы оказывают нейропротекторный [3, 4], гепатопротекторный [5, 6] и гипOLIПИдеМИческий [5, 7] эффект. Кроме того, полипrenoлы обладают выраженной антиоксидантной [2, 8, 9] активностью. Возможны иные виды фармакологического действия [10–12]. Мицеллы из производных полипrenoлов могут быть рассмотрены в качестве системы доставки лекарственных средств [13]. Основными источниками

получения субстанции полипrenoлов являются гинкго двулопастный (*Ginkgo biloba* L.) и хвойные деревья, такие как пихта сибирская (*Abies sibirica* L.), ель обыкновенная (*Picea abies* L.), сосна сибирская (*Pinus sibirica* L.), сосна обыкновенная (*Pinus sylvestris* L.) [1]. Готовые извлечения из растительного сырья представляют собой сложные смеси гомологов полипrenoлов и сопутствующих веществ, что требует внедрения особых подходов к стандартизации полученных продуктов. В настоящее время основными методами идентификации и количественного определения полипrenoлов являются тонкослойная хроматография и высокоэффективная жидкостная хроматография с фотометрическим детектированием (ВЭЖХ-УФ). Применение ВЭЖХ-УФ требует осуществления сложной процедуры пробоподготовки, включающей удаление мешающих компонентов и дериватизацию, например, с антрацен-9-карбоновой кислотой или фенилхлорформиаом с целью повышения чувствительности анализа. Кроме того, в силу физико-химических свойств полипrenoлов одной из трудностей анализа остается полное разделение хроматографических пи-

ков гомологичных веществ [2, 14–17]. Применение масс-спектрометров в качестве детекторов при проведении хроматографического анализа в большинстве случаев решает проблему селективности. Однако масс-спектрометрическая детекция полипrenoлов имеет ряд особенностей: во-первых, данные вещества не образуют стабильных и характерных ионов-продуктов, что делает невозможным использование мониторинга множественных реакций по причине низкого ионного тока; во-вторых, из-за низкой способности к ионизации детектирование полипrenoлов возможно только по определенным аддуктам [17–19]. Существенной проблемой при разработке методик количественного определения полипrenoлов является отсутствие коммерческих аналитических стандартов на отдельные вещества [16]. Доступные продукты содержат комбинации полипrenoлов с обозначением общей концентрации гомологов из определенного диапазона без указания соотношения компонентов. Отсутствие данных о зависимости площади хроматографического пика каждого гомолога от его индивидуальной концентрации оставляет открытым вопрос правильного построения общей калибровочной зависимости. Использование с этой целью суммы площадей отдельных хроматографических пиков всех определяемых гомологов [16] требует дополнительных обоснований. Отдельной проблемой хроматографического анализа полипrenoлов является выбор внутреннего стандарта (IS). Таким образом, количественное определение суммы полипrenoлов в экстракционных препаратах является нетривиальной задачей, требующей разработки и внедрения точных и воспроизводимых аналитических методик.

Цель исследования: разработка и валидация хромато-масс-спектрометрической методики идентификации и количественного определения полипренолов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение полипренолов выполняли с помощью высокоэффективного жидкостного хроматографа Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, США), оснащенного четырехканальным

градиентным насосом (G7111B) со встроенным блоком дегазации, автосамплером (G7129A), термостатом колонок (G1316A). В роли детектора выступал tandemный масс-спектрометр типа «тройной квадруполь» AB Sciex QTrap® 3200MD (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур). Для обработки первичных данных хроматографического анализа применяли программное обеспечение (ПО) AB Sciex Analyst 1.3.6, статистический анализ результатов осуществляли посредством использования ПО StatPlus (AnalystSoft Inc., США).

При разработке аналитической методики применяли следующее оборудование: весы аналитические ВЛ-124В (ООО «НПП «Госметр», Россия), шейкер орбитальный OS-20 (Biosan, Латвия), вортекс V-1 plus (Biosan, Латвия), автоматические пипетки переменного объема Eppendorf Research® plus (Eppendorf AG, Германия), термостатируемый шейкер TS-100C (Biosan, Латвия). Хранение анализируемых образцов и стандартных растворов осуществляли в морозильных шкафах LGT 3725 и GGv 5010 (LIEBHERR, Австрия) соответственно. Деионизированную воду получали с помощью лабораторной системы очистки воды Milli-Q (Millipore, Франция).

Для приготовления анализируемых растворов и подвижной фазы использовали стеклянные мерные колбы и цилиндры различного объема (класс точности 1). Хроматографическое разделение полипренолов выполняли на аналитической колонке InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм (Agilent Technologies, США) в сочетании с предколонкой ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм (Agilent Technologies, США).

Реактивы и растворы

Для разработки методики использовали стандартный раствор полипренолов C70 – C100 с суммарной концентрацией 10 мг/мл в гексане (Larodan AB, Швеция). В качестве внутреннего стандарта использовали ретинилпальмитат (АО «Ретиноиды», Россия) (рисунок 1).

Для приготовления растворов и проведения хроматографического анализа использовали метанол (ООО ТД «ХИММЕД», Россия), пропанол-2 (PanReac AppliChem, Испания), *n*-гексан (PanReac AppliChem, Испания), аммония ацетат (Merck KGaA, Германия).

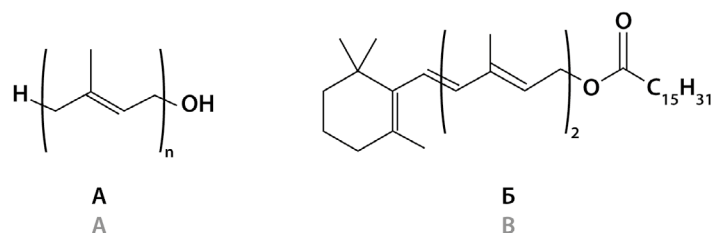


Рисунок 1. Общая структурная формула полипrenoлов (А), где $n = 14-20$, и ретинилпальмитата (Б) (внутренний стандарт)

Figure 1. General structural formula of polyprenols (A), where $n = 14-20$, and retinyl palmitate (B) (internal standard)

Объекты исследования

Количественное содержание полипrenoлов определяли в субстанции, полученной методом экстракции органическими растворителями с последующей очисткой посредством колоночной хроматографии из *Picea abies* L. и *Ginkgo biloba* L. в лаборатории индивидуального предпринимателя С. В. Савинцева.

Приготовление калибровочных растворов и подвижной фазы

В качестве подвижной фазы с малой элюирующей силой (элюент А) использовали 2 мМ раствор аммония ацетата в 98%-м метаноле, приготовленный по следующей методике: в мерную колбу вместимостью 1000 мл вносили 20 мл водного раствора аммония ацетата с концентрацией 100 мМ, после чего доводили до метки метанолом. В роли подвижной фазы с большой элюирующей силой (элюент В) использовали комбинированный раствор, приготовленный путем смешивания в мерной колбе объемом 1000 мл 450 мл пропанола-2, 450 мл *n*-гексана, 20 мл 100 мМ водного раствора аммония ацетата и доведения объема до метки метанолом. Срок хранения элюентов составлял 30 суток.

Калибровочные растворы с суммарной концентрацией полипrenoлов (C70 – C100) 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 15 000, 20 000 и 25 000 нг/мл готовили из исходного стандартного раствора посредством растворения в элюенте А. Раствор внутреннего стандарта (ретинилпальмитат) готовили на метаноле с концентрацией 20 000 нг/мл. Полученные растворы хранили при температуре –28 °С и использовали по мере необходимости для анализа.

Пробоподготовка испытуемого образца

100 мг (точная навеска) субстанции полипrenoлов отвешивали на аналитических весах в пробирку Эппендорфа объемом 2 мл, добавляли 1 мл *n*-гексана, перемешивали на вортексе в течение 15 с, после чего полученный раствор переносили в мерную колбу объемом 50 мл. Затем пробирку Эппендорфа промывали *n*-гексаном, раствор также переносили в колбу. Общий объем *n*-гексана составил 5 мл. Содержимое колбы доводили до метки пропанолом-2. Полученный раствор разбавляли в 100 раз элюентом А, 100 мкл переносили в полиэтиленовые вставки в хроматографические виалы, добавляли 10 мкл раствора внутреннего стандарта, тщательно перемешивали и использовали для последующего хроматографического анализа.

Условия проведения анализа методом ВЭЖХ-МС/МС

В таблице 2 приведены условия хроматографического разделения и масс-спектрометрического детектирования полипrenoлов, которые были подобраны с учетом их физико-химических свойств.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Подбор оптимальных условий масс-спектрометрического детектирования аналитов и внутреннего стандарта выполняли посредством прямого ввода в масс-спектрометр комбинированного раствора полипrenoлов 500 нг/мл в смеси пропанола-2, *n*-гексана и 2 мМ водного раствора аммония ацетата (18:1:1) и раствора ретинилпальмитата в 2 мМ растворе аммония ацетата на 98%-м метаноле со скоростью 10 мкл/мин. Анализируемые вещества подвергали положительной ионизации электрораспылением.

Так как полипrenoлы плохо образуют протонированные молекулярные ионы, их детекцию осуществляли по соответствующим аддуктам ($[M + NH_4]^+$; $[M + H]^+ - CH_3$) [16]. Детектирование аналитов в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) не позволяет достичь необходимого уровня чувствительности из-за слабого ионного тока ионов-продуктов полипrenoлов. Вследствие этого полипrenoлы определяли по ионному току молекулярных аддуктов в режиме SIM. В таблице 1 приведены оптимальные параметры детектирования, подобранные для достижения максимального уровня чувствительности. На рисунке 2 отображен масс-спектр первого порядка аддуктов полипrenoлов и внутреннего стандарта.

С учетом выраженных гидрофобных свойств полипrenoлов в ходе проведения эксперимента были подобраны оптимальные условия хроматографического анализа, включая использование в качестве подвижной фазы с высокой элюирующей силой комбинации растворителей (гексан, изопропанол и метанол). Применение распространенных в обращенно-фазовой ВЭЖХ компонентов подвижной фазы, таких как ацетонитрил и метанол, не позволило достичь элюирования полипrenoлов из колонки с октадецилсиликагелевым сорбентом в течение 40 минут при скорости потока до 1 мл/мин. Таким образом, по результатам эксперимента были разработаны состав подвижной фазы и оптимальный режим градиентного элюирования, указанные в таблице 2. Пример общей хроматограммы стандартного образца полипrenoлов 14–20) с суммарной концентрацией 20 000 нг/мл представлен на рисунке 3.

Валидация методики

Валидацию методики количественного определения полипrenoлов в субстанции методом ВЭЖХ-МС/МС проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.10012 «Валидация аналитических методик» Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания и Руководства по валидации аналитических методик ЕАЭС от 17.07.2018 г. по следующим характеристикам: специфичности, пределу обнаружения, пределу количественного определения (ПКО), линейности, правильности, прецизионности, диапазон применения, устойчивости.

Таблица 1. Параметры масс-спектрометрического детектирования полипренолов и ретинилпальмитата (IS)

Table 1. Parameters for polyprenols and retinyl palmitate (IS) mass spectrometric detection

Источник ионов Ion source		Turbo Ion Spray		
Режим ионизации Ionization mode		Положительный Positive		
Температура источника ионов, °C Ion source temperature, °C		300		
Напряжение ионизации, В Ionization voltage, V		5500		
Давление газа-завесы, psi/кПа Curtain gas pressure, psi/kPa		10/69		
Давление газа-распылителя, psi/кПа Spray gas pressure, psi/kPa		30/207		
Давление газа-нагревателя, psi / кПа Heater gas pressure, psi/kPa		40/276		
Потенциал на входе в ячейку соударений (EP), В Potential at the entrance to the impact cell (EP), V		10		
Аналит Analyte	m/z	Dwell, мс Dwell ms	DP, V	CEP, eV
Полипренол-14 (C70) Polyprenol-14 (C70)	989,0 954,3	100	68 90	54 53
Полипренол-15 (C75) Polyprenol-15 (C75)	1057,1 1022,6	100	68 95	57 56
Полипренол-16 (C80) Polyprenol-16 (C80)	1125,2 1090,5	100	77 70	61 59
Полипренол-17 (C85) Polyprenol-17 (C85)	1193,2 1159,2	100	84 70	64 62
Полипренол-18 (C90) Polyprenol-18 (C90)	1261,3 1227,3	100	88 70	66 65
Полипренол-19 (C95) Polyprenol-19 (C95)	1329,3 1295,1	100	92 70	69 67
Полипренол-20 (C100) Polyprenol-20 (C100)	1397,4 1363,6	100	94 70	72 70
Ретинилпальмитат (IS) Retinyl palmitate (IS)	525,5	100	160	30

Специфичность

Специфичность методики подтверждали путем сравнительного анализа хроматограмм растворителя, стандартного раствора полипренолов, раствора испытуемой субстанции полипренолов, в том числе с добавлением IS и без него.

По результатам анализа установлено, что на хроматограммах растворителя отсутствуют пики, по времени удерживания соответствующие полипренолам и IS (рисунок 4 А). Кроме того, выявлено отсутствие пика IS на хроматограммах стандартного раствора (рисунок 4 Б) и испытуемых образцов субстанции полипренолов (рисунок 4 Г).

Предел обнаружения

Для разрабатываемой методики установлено значение предела обнаружения 100 нг/мл. При этом соотношение «сигнал/шум» на хроматограммах для отдельных гомологов полипренолов составило не менее 4,5:1.

Линейность

По причине отсутствия доступных аналитических стандартов с известным содержанием каждого гомолога полипренолов требуется доказательство возможности использования суммы площадей хроматографических пиков всех анализируемых веществ для построения калибровочной зависимости. Так как с увеличением концентрации стандартных растворов прирост хроматографического сигнала для разных веществ может быть неравномерным, требуется провести сравнительный анализ калибровочной зависимости по каждому отдельному гомологу полипренолов.

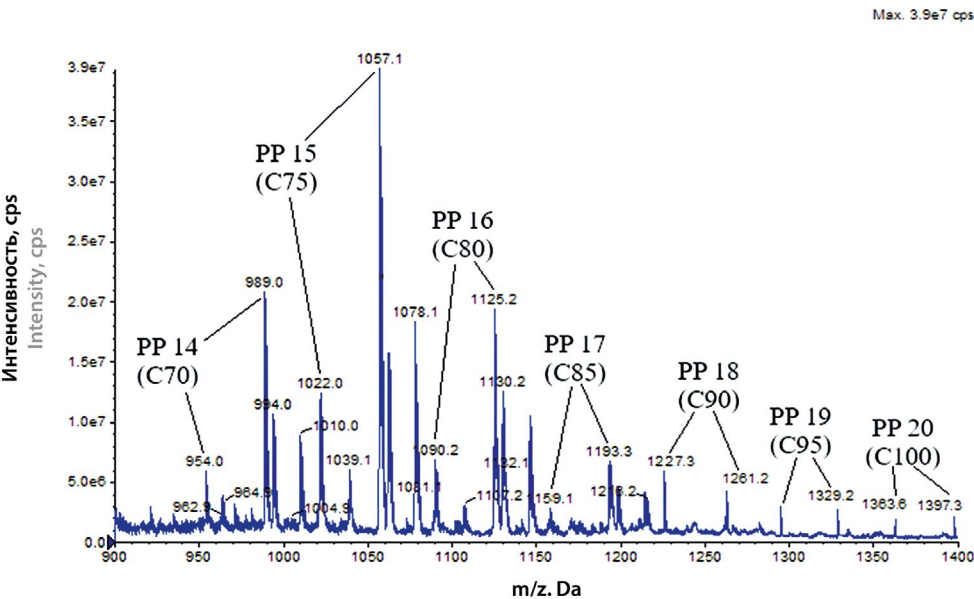


Рисунок 2. Масс-спектр первого порядка (MS) аддуктов полипренолов в режиме регистрации положительных ионов

Figure 2. First-order mass spectrum (MS) of polyprenol adducts in positive ion mode

По результатам анализа установлено, что относительное стандартное отклонение (CV) значений угловых коэффициентов наклона кривых не превышает 15 % (таблица 3), что делает возможным построение калибровочной зависимости общей площади всех пиков аналитов от суммарной концентрации полипренолов в стандартном растворе.

Таблица 2. Хроматографические параметры определения полипренолов

Table 2. Chromatographic parameters of polyphenols determination

Элюент А Eluent A	98 % метанола + 2 % водного раствора аммония ацетата 100 мМ 98 % methanol + 2 % aqueous ammonium acetate solution 100 mM			
Элюент В Eluent B	45 % пропанола-2 + 45 % <i>n</i> -гексана + 8 % метанола + 2 % водного раствора аммония ацетата 100 мМ 45 % propanol-2 + 45 % <i>n</i> -hexane + 8 % methanol + 2 % aqueous ammonium acetate solution 100 mM			
Хроматографическая колонка Chromatographic column	InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4,6 × 100 мм, 2,7 мкм InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 4.6 × 100 mm, 2.7 μm			
Защитная колонка Guard Cartridge	ZORBAX Eclipse Plus C18, 4,6 × 12,5 мм, 5 мкм ZORBAX Eclipse Plus C18, 4.6×12.5 mm, 5 μm			
Программа градиента Gradient program	Время, мин Time, min	Скорость потока, мкл/мин Flow rate, μl/min	% А	% В
	0,0	400	100	0
	7,0		0	100
	11,0		0	100
	11,01		100	0
	16,0		100	0
Промывка иглы инжектора Injector needle flushing	Смесь пропанола-2 и <i>n</i> -гексана 9:1, 5 с Mixture of propanol-2 and <i>n</i> -hexane 9:1, 5 s			
Температура колонки, °C Column temperature, °C	30			
Объем ввода, мкл Injection volume, μl	10			
Время удерживания, мин Retention time, min	Полипренол-14 (C70) Polyprenol-14 (C70)		10,6	
	Полипренол-15 (C75) Polyprenol-15 (C75)		10,8	
	Полипренол-16 (C80) Polyprenol-16 (C80)		11,0	
	Полипренол-17 (C85) Polyprenol-17 (C85)		11,2	
	Полипренол-18 (C90) Polyprenol-18 (C90)		11,3	
	Полипренол-19 (C95) Polyprenol-19 (C95)		11,5	
	Полипренол-20 (C100) Polyprenol-20 (C100)		11,6	
	Ретинилацетат (IS) Retinyl palmitate (IS)		3,5	

Таблица 3. Значения угловых коэффициентов уравнений регрессии зависимости площадей хроматографических пиков отдельных полипренолов от их суммарной концентрации

Table 3. Values of the angular coefficients of the regression equations of the dependence of the areas of chromatographic peaks of individual polyphenols on their total concentration

Аналит Analyte	Угловой коэффициент уравнения регрессии Angular coefficient of regression equation	Коэффициент корреляции, <i>r</i> Correlation coefficient, <i>r</i>
Полипренол-14 (C70) Polyphenol-14 (C70)	38,4	0,9996
Полипренол-15 (C75) Polyphenol-15 (C75)	43,8	0,9988
Полипренол-16 (C80) Polyphenol-16 (C80)	39,4	0,9992
Полипренол-17 (C85) Polyphenol-17 (C85)	45,2	0,9974
Полипренол-18 (C90) Polyphenol-18 (C90)	38,1	0,9968
Полипренол-19 (C95) Polyphenol-19 (C95)	34,5	0,9992
Полипренол-20 (C100) Polyphenol-20 (C100)	29,4	0,9963
Среднее значение Mean value	38.4	
Стандартное отклонение Standard deviation	5,4	
CV, %	14,0	

Линейность методики устанавливали по результатам хроматографического анализа 8 калибровочных растворов с суммарной концентрацией полипренолов 500, 1000, 2500, 5000, 10 000, 15 000, 20 000 и 25 000 нг/мл в трех повторях. Градуировку проводили по отношению суммы площадей пиков полипренолов к площади пика IS. Калибровочная зависимость нормированной на IS суммарной площади пиков аналитов от их общей концентрации представлена в виде уравнения линейной регрессии $y = 0,0004x + 0,2005$ (рисунок 5). Коэффициент корреляции (*r*) составил 0,9996, что соответствует установленным требованиям (не менее 0,9900).

Правильность

По причине отсутствия свободного от полипренолов плацебо опытные образцы для определения правильности методики были приготовлены на 98%-м метаноле с суммарной концентрацией 2000, 6000, 12 000, 18 000 и 24 000 нг/мл. По результатам хроматографического анализа рассчитывали содержание суммы полипренолов в опытных образцах. Правильность определяли по значениям открываемости в процентах. Каждый опытный образец был проанализирован в трех повторях.

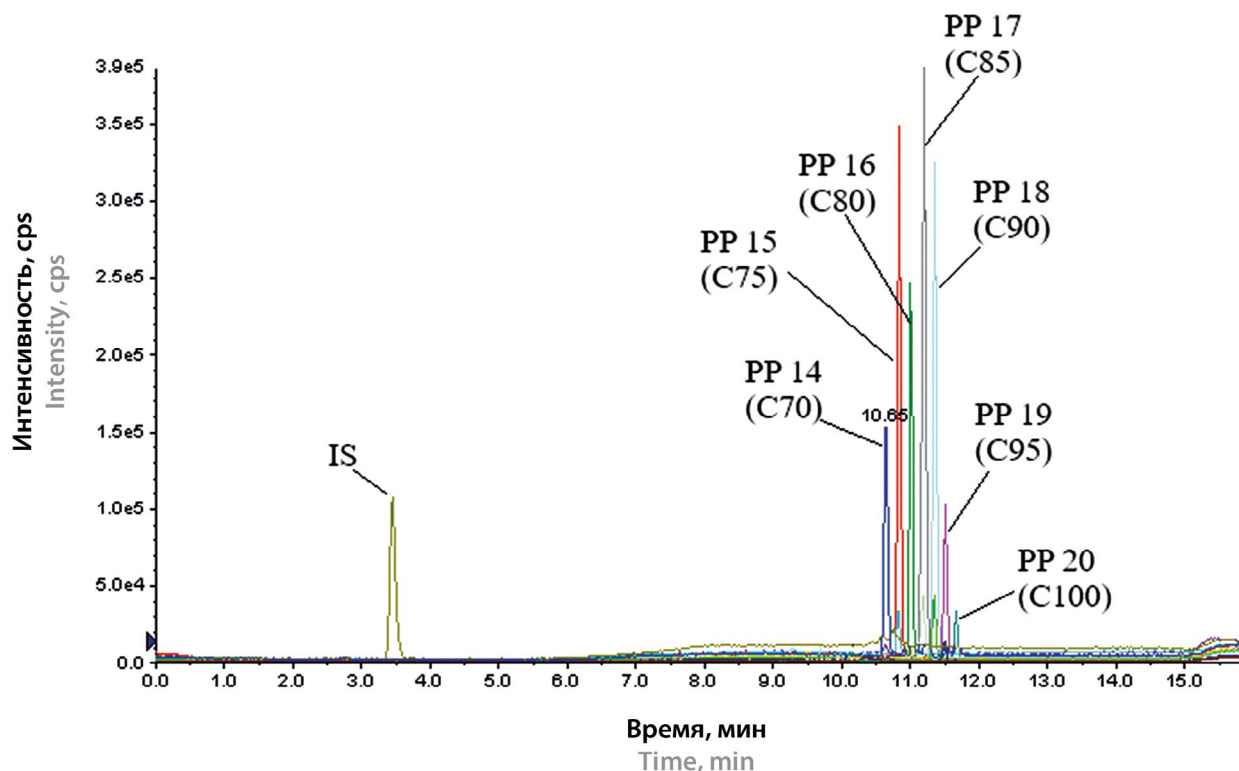


Рисунок 3. Общая хроматограмма стандартного образца полифенолов (14–20) с суммарной концентрацией 20 000 нг/мл

Figure 3. General chromatogram of a standard sample of polyphenols (14–20) with a total concentration of 20 000 ng/ml

Полученные результаты отвечают критериям приемлемости. Среднее относительное значение суммарного содержания полифенолов в опытных образцах находится в пределах доверительного интервала для средних значений открываемости).

Результаты оценки правильности определения полифенолов:

- Среднее значение открытия Z , % – 99,11.
- Дисперсия (S^2) – 9,58.
- Стандартное отклонение (σ) – 3,09.
- Коэффициент вариации (CV), % – 3,12.
- Стандартная ошибка среднего (SEM) – 0,80.
- Число степеней свободы, f – 14.
- Критическое значение t -критерия Стьюдента ($p = 0,05$) – 2,14.
- Доверительный интервал ($\pm \Delta Z$), % – 1,57.
- Нижняя граница доверительного интервала, % – 97,55.
- Верхняя граница доверительного интервала, % – 100,68.

Прецизионность

В соответствии с требованиями ОФС.1.10012 прецизионность методики оценивали по показателю повторяемости (сходимости) (таблица 4). С этой целью проводили анализ содержания полифено-

лов в 6 образцах субстанции, полученной из *Ginkgo biloba* L. Пробоподготовку образцов осуществляли по вышеописанной методике, после чего каждый раствор анализировали по 3 раза, затем были рассчитаны величины средней концентрации полифенолов в образце, а также дисперсия. Для оценки однородности распределения дисперсий использовали критерий Кохрена. Было установлено, что рассчитанное значение критерия не превышало критическое ($p = 0,95$; $f = 17$).

Диапазон применения

Исходя из полученных результатов оценки линейности, правильности и прецизионности, сделан вывод, что аналитическая область разработанной методики составляет от 0,5 (ПКО) до 25 мкг/мл, что соответствует содержанию полифенолов (C70 – C100) в субстанции в диапазоне от 2,5 до 125 %.

Устойчивость

Валидируемая методика не содержит параметров, на которые могут оказывать влияние неконтролируемые отклонения в условиях анализа или окружающей среды. При замене хроматографической колонки следует проводить верификацию методики по параметру «прецизионность».

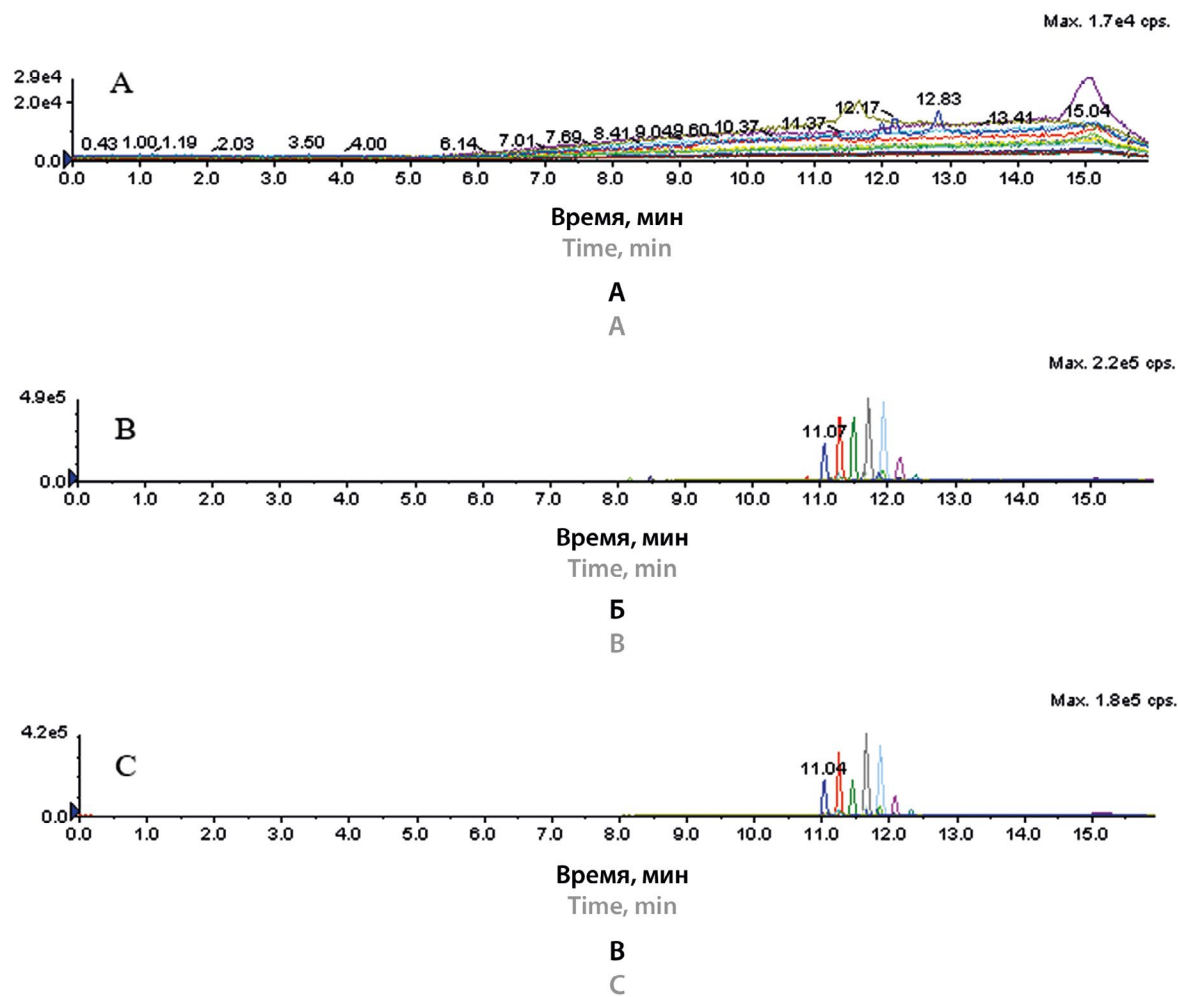


Рисунок 4. Хроматограммы растворителя (А), образца субстанции (Б) и стандартного раствора (В) полипренолов
Figure 4. Chromatograms of solvent (A), sample substance (B) and standard solution (C) of polyphenols

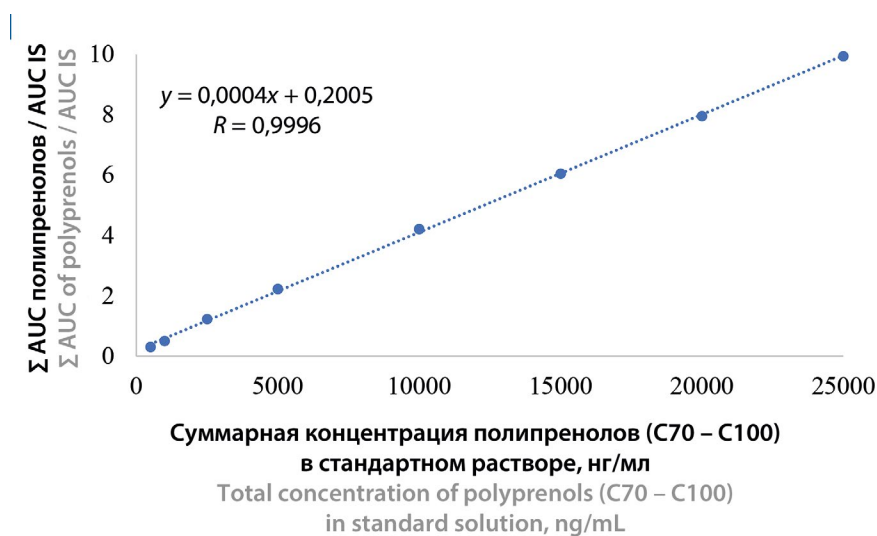


Рисунок 5. Калибровочный график зависимости нормированной на IS суммарной площади пиков (AUC) полипренолов (C70 – C100) от их общей концентрации в стандартном растворе
Figure 5. Calibration plot of the IS-normalized total peak area (AUC) of polyphenols (C70 – C100) versus their total concentration in the standard solution

Таблица 4. Результаты оценки сходимости при количественном определении полипrenoлов
Table 4. Results of convergence assessment in polypprenols quantification

Образец Sample	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Σ AUC полипrenoлов / AUC IS Σ AUC of polypprenols / AUC IS	6,40	6,35	6,24	5,90	6,40	6,17
	6,23	6,36	6,39	6,08	6,21	6,33
	6,43	6,36	6,37	6,22	6,48	6,24
Установленная концентрация в образце, нг/мл Determined concentration in sample, ng/ml	15493	15369	15088	14254	15497	14919
	15079	15387	15463	14691	15013	15317
	15568	15402	15430	15052	15702	15094
Содержание полипrenoлов (C70 – C100) в субстанции, % Content of polypprenols (C70 – C100) in the substance, %	77,47	76,85	75,44	71,27	77,49	74,60
	75,39	76,94	77,32	73,46	75,07	76,59
	77,84	77,01	77,15	75,26	78,51	75,47
Среднее значение, % Mean value, %	76,90	76,93	76,64	73,33	77,02	75,55
Дисперсия Dispersion	1,74	0,01	1,08	4,00	3,12	1,00

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения полипrenoлов с применением ВЭЖХ-МС/МС. Практическая значимость проделанной работы заключается в возможности применения разработанной методики в целях установления содержания отдельных гомологов полипrenoлов (C70 – C100) в лекарственных препаратах или фармацевтических субстанциях. Так, с помощью данной методики было выявлено, что в субстанции полипrenoлов, полученной из *Ginkgo biloba* L., фракция C70 – C100 составляет в среднем 76 %. По результатам анализа субстанции, полученной из *Picea abies* L., установлено, что она состоит из полипrenoлов C70 – C100 в среднем на 95 %. Диапазон применения разработанной методики составляет от 2,5 до 125 %.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Vanaga I., Gubernator J., Nakurte I., Kletnieks U., Muceniece R., Jansone B. Identification of *Abies sibirica* L. polypprenols and characterisation of polypprenol-containing liposomes. *Molecules*. 2020;25(8):1801. DOI: 10.3390/molecules25081801.

2. Antipina A. A., Balabaniyan V. Yu., Approaches to producing, purifying, and standardizing polypprenols. *Farmaciya (Pharmacy)*. 2021;70(6):15–19. DOI: 10.29296/25419218-2021-06-03. (In Russ.)

3. Khodanovich M. Y., Pishchelko A. O., Glazacheva V. Y., Pan E. S., Krutenkova E. P., Trusov V. B., Yarnykh V. L. Plant polypprenols reduce demyelination and recover impaired oligodendrogenesis and neurogenesis in the cuprizone murine model of multiple sclerosis. *Phytotherapy Research*. 2019;33(5):1363–1373. DOI: 10.1002/ptr.6327.

4. Liu L., Wang Y., Zhang J., Wang S. Advances in the chemical constituents and chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaf, extract, and phytopharmaceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;193:113704. DOI: 10.1016/j.jpba.2020.113704.

5. Vyshlov E. V., Tsou E. I., Sultanov V. S., Trusov V. B., Ryabov V. V. Hypolipidemic and hepatoprotective effects of a polypprenol-containing drug in patients with acute coronary syndrome. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2018;165:319–321. DOI: 10.1007/s10517-018-4159-x.

6. Yang L., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Li H.-T. Hepatoprotective effects of polypprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *Fitoterapia*. 2011;82(6):834–840. DOI: 10.1016/j.fitote.2011.04.009.

7. Tsoi E. I., Vyshlov E. V., Ryabov V. V. Positive effect of polypprenol-containing drug on anxiety, depression and cognitive

disorders in patients with acute coronary syndrome. *European Heart Journal*. *Acute Cardiovascular Care*. 2021;10(1):107. DOI: 10.1093/ehjacc/zuab020.107.

8. Boateng I. D. Polypprenols in *Ginkgo biloba*; a review of their chemistry (synthesis of polypprenols and their derivatives), extraction, purification, and bioactivities. *Food Chemistry*. 2023;136006. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136006.

9. Boateng I. D., Soetanto D. A., Li F., Yang X.-M., Li Y.-Y. Separation and purification of polypprenols from *Ginkgo biloba* L. leaves by bulk ionic liquid membrane and optimizing parameters. *Industrial Crops and Products*. 2021;70:113828. DOI: 10.1016/j.indcrop.2021.113828.

10. Mamatkulova N. M., Mukarramov N. I., Sasmakov S. A., Khidirova N. K. Polypprenols from *Ficus carica* Leaves and their Biological Activity. *Chemistry of Natural Compounds*. 2022;58(4):726–727. DOI: 10.1007/s10600-022-03777-9.

11. Tao R., Wang C.-Z., Ye J.-Z., Zhou H., Chen H.-X., Zhang C.-W. Antibacterial, cytotoxic and genotoxic activity of nitrogenated and haloal derivatives of C₅₀–C₆₀ and C₇₀–C₁₂₀ polypprenol homologs. *Lipids in Health and Disease*. 2016;15(1):175. DOI: 10.1186/s12944-016-0345-x.

12. Zhang C.-W., Li M.-F., Tao R., Peng M.-J., Wang Z.-H., Qi Z.-W., Xue X.-Y., Wang C.-Z. Physicochemical property and antibacterial activity of formulation containing polypprenol extracted from *Ginkgo biloba* leaves. *Industrial Crops and Products*. 2020;147:112213. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112213.

13. Yuan H., Zhang C., Zhou P., Yang X., Tao R., Ye J., Wang C. Preparation of polypprenol/poly (β-amino ester)/galactose targeted micelle carrier for enhancing cancer therapy. *Arabian Journal of Chemistry*. 2023;16(5):104679. DOI: 10.1016/j.arabjc.2023.104679.

14. Zhang C.-W., Wang C.-Z., Tao R., Ye J.-Z. Separation of polypprenols from *Ginkgo biloba* leaves by a nano silica-based adsorbent containing silver ions. *Journal of Chromatography A*. 2019;1590:58–64. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.01.047.

15. Řezanka T., Votruba J. Chromatography of long chain alcohols (polypprenols) from animal and plant sources. *Journal of Chromatography A*. 2001;936(1–2):95–110. DOI: 10.1016/S0021-9673(01)01152-9.

16. Yu J., Wang Y., Qian H., Zhao Y., Liu B., Fu C. Polypprenols from the needles of *Taxus chinensis* var. *mairei*. *Fitoterapia*. 2012;83(5):831–837. DOI: 10.1016/j.fitote.2012.01.007.

17. Gharwalová L., Palyzová A., Marešová H., Kolouchová I., Kyseľová L., Řezanka T. Identification of homologous polypprenols from thermophilic bacteria. *Microorganisms*. 2021;9(6):1168. DOI: 10.3390/microorganisms9061168.

18. D’Alexandri F. L., Gozzo F. C., Eberlin M. N., Katzin A. M. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of polyisoprenoid alcohols via Li⁺ cationization. *Analytical biochemistry*. 2006;355(2):189–200. DOI: 10.1016/j.ab.2006.06.014.

19. Kania M., Skorupinska-Tudek K., Swiezewska E., Danikiewicz W. Atmospheric pressure photoionization mass spectrometry as a valuable method for the identification of polyisoprenoid alcohols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2012;26(15):1705–1710. DOI: 10.1002/rcm.6280.