

УДК 615.072

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-3-276-288>

EDN DNWEEB



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Количественное определение 8-метоксипсоралена в мягкой лекарственной форме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

А. Алсайд, А.А. Прежедромирская✉, Е.А. Шняк, С.А. Кедик

МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119454 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: a.a.pregedromirskaya@ipt.ru.com

Аннотация

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения 8-метоксипсоралена в мягкой лекарственной форме в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания и Фармакопеи Евразийского экономического союза.

Методы. Количественное определение 8-метоксипсоралена проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе «Chromaster 5000» (Hitachi, Япония) с диодно-матричным детектором. Хроматографирование выполняли на колонке Kromasil EternityXT-5-C18, 5 мкм, 250 × 4.6 мм в изократическом режиме с подвижной фазой ацетонитрил/вода в соотношении 50 : 50% (об/об). Скорость потока составляла 1.0 мл/мин, длина волны детектирования — 250 нм.

Результаты. Установлено, что экстракция активного вещества из геля под действием ультразвука при температуре 40°C в течение 15 мин с использованием ацетонитрила является наиболее оптимальным условием для извлечения 8-метоксипсоралена. Наилучшее пиковое разрешение 8-метоксипсоралена было достигнуто при анализе геля на длине волны 250 нм с помощью обращенно-фазового сорбента с октадецильной фазой (C₁₈), привитой к силикагелю. Использование в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрил/вода в объемном соотношении 50 : 50% позволило обеспечить минимальное время хроматографирования при сохранении оптимального разрешения. По данным валидационных процедур установлено, что методика специфична, линейна ($R^2 > 0.997$) и воспроизводима (относительное стандартное отклонение составило $\leq 3.0\%$). Точность аналитической методики составила от 98.26% до 101.02%, а значения пределов обнаружения и количественного определения — 0.006 и 0.020 мкг/мл соответственно. Разработанная методика количественного определения показала свою устойчивость при варьировании как температуры колонки, так и скорости потока на $\pm 5\%$.

Выводы. Методика количественного определения 8-метоксипсоралена была эффективно реализована с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии и обладает рядом преимуществ по сравнению с ранее описанными методиками. Эти преимущества заключаются в сокращении времени анализа, увеличении чувствительности и эффективности, что позволяет применять разработанную методику для оценки количественного содержания 8-метоксипсоралена в мягкой лекарственной форме — геле при лечении псориаза.

Ключевые слова

8-метоксипсорален, метоксален, 8-МОП, мягкая лекарственная форма, гель, количественное определение, высокоэффективная жидкостная хроматография, валидация

Поступила: 31.10.2024
Доработана: 15.01.2025
Принята в печать: 03.04.2025

Для цитирования

Алсайд А., Преждедомирская А.А., Шняк Е.А., Кедик С.А. Количественное определение 8-метоксипсоралена в мягкой лекарственной форме методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Тонкие химические технологии*. 2025;20(3):276–288. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-3-276-288>

RESEARCH ARTICLE

Quantitative determination of 8-methoxypsoralene in mild dosage form by high-performance liquid chromatography

Adnan Alsayed, Anastasiya A. Prezhedromirskaya✉, Elizaveta A. Shnyak, Stanislav A. Kedik

MIREA – Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119454 Russia

✉ Corresponding author, e-mail: a.a.pregedromirskaya@ipt.ru

Abstract

Objectives. To develop and validate a method for the quantitative determination of 8-methoxypsoralen in a soft dosage form in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, 15th edition, and the Pharmacopoeia of the Eurasian Economic Union.

Methods. Quantitative determination of 8-methoxypsoralen was performed by high-performance liquid chromatography on a Chromaster 5000 (Hitachi, Japan) with a diode array detector. Chromatography was performed on a Kromasil EternityXT-5-C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm column in isocratic mode with a mobile phase of acetonitrile/water in a ratio of 50 : 50% (v/v). The flow rate was 1.0 mL/min, while the detection wavelength was 250 nm.

Results. The optimal condition for the extraction of 8-methoxypsoralen was found to be ultrasonic gel extraction at 40°C for 15 min using acetonitrile. The best peak resolution of 8-methoxypsoralen was achieved during gel analysis at 250 nm using a reversed-phase sorbent with an octadecyl phase (C18) grafted onto silica gel. The acetonitrile/water mixture was used as a mobile phase in a volume ratio of 50 : 50% to minimize chromatography time while maintaining optimal resolution. From the validation procedures, it was confirmed that the method is specific, linear ($R^2 > 0.997$) and reproducible (relative standard deviation was $\leq 3.0\%$). The accuracy of the analytical method was from 98.26% to 101.02%, while the values of the detection and quantitative determination limits were 0.006 and 0.020 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The developed quantitative determination method demonstrated its stability when varying as the column temperature and flow rate by $\pm 5\%$.

Conclusions. As effectively implemented using the high-performance liquid chromatography method, the method for quantitative determination of 8-methoxypsoralen has a number of advantages over the previously described methods, including reduced analysis time, as well as increased sensitivity and effectiveness, which makes it possible to apply the developed method in assessing the quantitative content of 8-methoxypsoralen in a soft dosage form—gel for the treatment of psoriasis.

Keywords

8-methoxypsoralen, methoxalen, 8-MOP, mild dosage form, gel, quantitative determination, high-performance liquid chromatography, validation

Submitted: 31.10.2024

Revised: 15.01.2025

Accepted: 03.04.2025

For citation

Alsayed A., Prezhedromirskaya A.A., Shnyak E.A., Kedik S.A. Quantitative determination of 8-methoxypsoralene in mild dosage form by high-performance liquid chromatography. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2025;20(3):276–288. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-3-276-288>

ВВЕДЕНИЕ

Псоралены — это природные фуранокумарины, которые содержатся в таких лекарственных растениях, как псоралея лецинолистная (*Psoralea corylifolia* L.), фикус карийский (*Ficus carica* L.) и фикус черешковый (*Ficus petiolaris* L.), амми большая (*Ammi majus* L.) и борщевик Сосновского (*Heracleum sosnowskyi* L.). Они нашли широкое применение в фотохимиотерапии (англ. Psoralen UltraViolet A (PUVA)), которая заключается в использовании псораленов в качестве фотосенсибилизатора в сочетании с ультрафиолетовым (УФ) излучением в области длин волн 320–400 нм [1]. Показания к фототерапии включают эпидермальные заболевания, такие как atopический дерматит [2], псориаз [3], витилиго [4], фотодерматозы, грибковидный микоз [5] и заболевания, обусловленные глубоким поражением кожных покровов (например, склеродермия).

Наиболее часто используемым в этом подходе фотосенсибилизатором является 8-метоксипсорален (8-МОП), который считается одним из лучших генераторов синглетного кислорода и супероксидных радикалов среди псораленов [6]. 8-МОП активируется УФ-излучением с образованием пиримидиновых соединений внутри клеток (рис. 1). Одна молекула псоралена сначала интеркалирует в двойную цепь ДНК; затем при УФ-облучении поглощается один фотон света, за которым следует связывание основания тимина и поглощение дополнительного фотона света, связывание другого основания тимина и т.д. Сшивка ДНК–псорален ингибирует репликацию ДНК и вызывает остановку клеточного цикла [7]. Это вызывает ряд антипролиферативных, антиангиогенных, апоптотических и иммуносупрессивных эффектов [8].

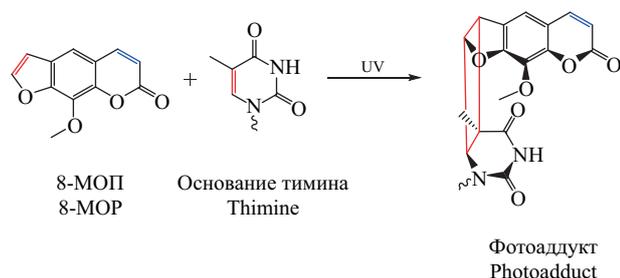


Рис. 1. Структурная формула 8-МОП и его фотоприсоединение к ДНК

Fig. 1. Chemical structure of 8-MOP and its photoaddition to DNA

В ходе исследований, в которых сравнивалась эффективность методов лечения, было обнаружено, что пероральный прием PUVA-раствора более эффективен, чем парентеральный прием [9]. Однако

при этом возможно появление побочных эффектов со стороны желудочно-кишечного тракта, психических расстройств, поражение зрительного нерва, а также повышается риск возникновения меланомы и плоскоклеточного рака [10]. Кроме того, 8-МОП практически нерастворим в воде и, соответственно, демонстрирует неравномерную абсорбцию из желудочно-кишечного тракта, включая межсубъектную изменчивость концентрации в плазме [11]. Следовательно, предложенная местная терапия 8-МОП является более эффективным подходом к повышению биодоступности препарата.

Для обеспечения необходимого уровня резорбции 8-МОП ранее были получены и исследованы различные системы доставки, такие как нiosомы [12], наноэмульсии [13], микроэмульсии [14] и твердые липидные наночастицы [15], способствующие улучшению трансдермального проникновения 8-МОП. В качестве носителя для наносистемы с 8-МОП для местного применения могут использоваться традиционные лекарственные формы, такие как мази, кремы и гели.

Наряду с необходимостью исследований по подбору систем доставки препарата, важное значение имеет разработка и валидация аналитических методик, позволяющих обнаруживать и количественно определять содержание 8-МОП в мягких лекарственных формах. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), оснащенная спектрофотометрическим детектором, например, в виде детектора с диодной матрицей (Diode Array Detector (DAD)), является одним из наиболее часто используемых методов количественного определения благодаря своей универсальности и простоте использования [16, 17].

ВЭЖХ, а именно ее обращенно-фазовая вариация, является наиболее простым и чувствительным методом количественной оценки 8-МОП, исходя из особенностей его строения и физико-химических свойств. В литературе описаны различные параметры инструментального анализа 8-МОП. Пицанти и др. использовали хроматограф с флуоресцентным детектором при длинах волн 317 и 445 нм. Анализ представлял собой изократическое элюирование на колонке X Terra RP18 (3.5 мкм, 4.6 × 100 мм, Waters, США). В качестве подвижной фазы использовали воду, метанол и ацетонитрил в объемном соотношении 40 : 40 : 20. Махмуд и др. проводили детектирование с помощью УФ-детектора для определения содержания 8-МОП [18]. Исследователями были подобраны условия определения 8-МОП на колонке ACE® C18 (5 мкм, 4.6 × 150 мм, Advanced Chromatography Technologies, Великобритания) в изократическом режиме элюирования с подвижной фазой метанол/вода в объемном соотношении 60 : 40. Детектирование проводили при длине волны 300 нм. Агеев и др. предложили

методику с применением спектрофотометрического детектора [19]. В этом подходе использовали колонку Symmetry Shield C18-RP (5 мкм, 250 × 4.6 мм, Waters, США) с подвижной фазой, состоящей из фосфатного буфера с pH 5.6 и ацетонитрила в объемном соотношении 50 : 50, а обнаружение проводилось при длине волны 285 нм. Куликов и др. модифицировали ранее описанную методику и в качестве подвижной фазы применяли систему ацетонитрил/вода в объемном соотношении 50 : 50 [20]. Баррадас и др. использовали хроматограф с УФ-детектором и колонкой NovaPak C18 (150 × 3.9 мм, Waters, США) [13]. В качестве подвижной фазы выступала вода и метанол в соотношении 65 : 35. Детектирование происходило при длине волны 300 нм.

Данные методики обладают рядом недостатков: использование солевых буферов в подвижной фазе может привести к повышению рабочего давления оборудования и, соответственно, дополнительным усилиям по поддержанию работоспособности прибора. Также недостатком является использование метанола, который относится к группе особо опасных ядов и находится на строгом контроле и учете. По этой причине разработка новых аналитических методик определения 8-МОП до сих пор является актуальной задачей¹.

Таким образом, цель настоящего исследования заключается в разработке и валидации новой, более

точной, воспроизводимой, селективной, устойчивой, высокочувствительной методики определения количественного содержания 8-МОП в мягкой лекарственной форме — геле, используемом в терапии псориаза. При этом аналитическая методика и валидационные процедуры должны быть проведены в соответствии с руководящими принципами надлежащей производственной практики, с соблюдением рекомендаций правил производства и контроля качества лекарственных средств² и Государственной фармакопеи Российской Федерации XV издания (ГФ РФ XV)³.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и материалы

В работе по определению количественного содержания 8-МОП в мягкой лекарственной форме была использована субстанция 8-МОП (*Henan Tianfu Chemical Co.*, Китай), а также следующие реактивы: ацетонитрил (квалификация ос.ч., *Криохром*, Россия), вода для хроматографии (деионизированная вода с электропроводностью >0.18 МОм/м).

В качестве объекта исследования выступал лабораторный образец в виде геля с 8-МОП (далее — геля), состав которого представлен в табл. 1.

Таблица 1. Состав геля с 8-МОП

Table 1. Composition of gel with 8-MOP

Компоненты Components	Производитель Manufacturer	Концентрация, мас. %/мас. Concentration, wt %/wt
8-Метоксипсорален 8-Methoxypsoralen	<i>Henan Tianfu Chemical Co.</i> , Китай <i>Henan Tianfu Chemical Co.</i> , China	0.67
Гвоздичное масло Clove oil	ООО «Натуральные масла», Россия <i>Naturalnye masla</i> , Russia	7.95
Pluronic F68	<i>Sigma-Aldrich</i> , США <i>Sigma-Aldrich</i> , USA	1.06
Гидроксиэтилцеллюлоза 250 ННХ Hydroxyethyl cellulose 250 ННХ	Natrosol™ 250 G PHARM, <i>Ashland</i> , США Natrosol™ 250 G PHARM, <i>Ashland</i> , USA	1.4
Вода очищенная (ФС.2.2.0020) Purified water (РА.2.2.0020)	—	88.92

¹ https://regulation.eaeunion.org/upload/iblock/4ec/jsw9jphfi1xvwlf9vt4otsb8y2lz5322/ria_30062017_mdock.pdf/. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

² <https://meganorm.ru/Data2/1/4293828/4293828749.pdf/>. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

³ <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/1/1-1/validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

Оборудование

Для пробоподготовки использовали электронные аналитические весы Pioneer PA214C (Китай).

Приготовление воды для хроматографии проводили с помощью деионизатора воды Водолей-М (Химэлектроника НПП, Россия).

Пробоподготовку исследуемых образцов осуществляли с помощью ультразвуковой ванны (Санфир, Россия).

Исследование проводили с помощью хроматографа «Chromaster 5000» (Hitachi, Япония), оснащенного универсальным насосным модулем PUMP Chromaster 5160, детектором на диодной матрице 5430 Diode Array, термостатом колонок 5310 Column Oven и автоматическим устройством дозирования — автосамплером 5260 Autosampler.

Контроль и обработку данных осуществляли с применением программного обеспечения «МультиХром» версии 3.4⁴.

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента»⁵ с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2016.

Хроматографические условия

Условия хроматографического анализа и требования пригодности хроматографической системы представлены в табл. 2.

Методика пробоподготовки

Раствор исходного стандартного образца 8-МОП (0.67 мг/мл)

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 67.0 мг (точное взвешивание) субстанции 8-МОП, растворяли в ацетонитриле, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали.

Раствор стандартного образца 8-МОП (0.067 мг/мл)

В мерную колбу вместимостью 10 мл отбирали 1.0 мл исходного раствора стандартного образца 8-МОП, растворяли в ацетонитриле, доводили объем до метки тем же растворителем и перемешивали. Полученный раствор стандартного образца фильтровали с помощью 33-мм шприцевого фильтра

Таблица 2. Хроматографические параметры

Table 2. Chromatographic parameters

Параметр Parameter	Значение Value
Колонка Column	Kromasil EternityXT-5-C18, 5 µm, 250 × 4.6 mm, (Nouryon, № X05CLA25)
Режим элюирования Elution	Изократический Isocratic
Подвижная фаза Mobile phase	Ацетонитрил : вода (50 : 50% об/об) Acetonitrile : water (50 : 50% v/v)
Скорость потока Flow rate	1.0 мл/мин 1.0 mL/min
Температура колонки Temperature of column	25°C
Длина волны детектирования Detection wavelength	250 нм 250 nm
Объем пробы Injection volume	20 мкл 20 µL
Время хроматографирования Run time	10 мин 10 min
Пригодность системы System suitability requirements	
Число теоретических тарелок Number of theoretical plates (N)	Не менее 5000 At least 5000
Относительное стандартное отклонение Relative standard deviation (RSD)	Не менее 3.0% At least 3.0%
Фактор симметрии Asymmetry Factor (As)	0.8 < As < 1.5

Millipore Millex-HN Nylon 0.45 мкм (Merck Millipore, Германия) и переносили в хроматографическую вialу.

Раствор геля (10 мг/мл)

В мерную колбу вместимостью 100 мл помещали 1.0 г (точное взвешивание) геля, добавляли 85 мл ацетонитрила и после обработки ультразвуком в течение 30 мин доводили объем раствора до метки ацетонитрилом. Полученный раствор фильтровали с помощью 33-мм шприцевого фильтра Millipore Millex-HN Nylon 0.45 мкм и переносили в хроматографическую вialу.

⁴ <https://multichrom.ru/documentation/manuals/>. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

⁵ <https://pharmacopoeia.ru/wp-content/uploads/2016/11/OFS.1.1.0013.15-Statisticheskaya-obrabotka-rezultatov-eksperimenta.pdf>. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

Ход анализа

Для определения количественного содержания 8-МОП в геле проводили последовательный хроматографический анализ рабочего раствора стандартного образца 8-МОП (не менее 5 раз) и раствора геля, инъекцию которого выполняли в трехкратной повторности.

Расчет

Содержание 8-МОП ($C_{8\text{-МОП}}$, мг/г) в мягкой лекарственной форме определяли по формуле (1).

$$\begin{aligned} C_{8\text{-МОП}} &= \frac{S_{\text{р.г.}} \cdot a_{8\text{-МОП}} \cdot V_{\text{ст.р.}} \cdot 100 \cdot P}{S_{8\text{-МОП}} \cdot 100 \cdot 10 \cdot a_{\text{геля}} \cdot 100} = \\ &= \frac{S_{\text{р.г.}} \cdot a_{8\text{-МОП}} \cdot 1 \cdot 100 \cdot P}{S_{8\text{-МОП}} \cdot 100 \cdot 10 \cdot a_{\text{геля}} \cdot 100} = \\ &= \frac{S_{\text{р.г.}} \cdot a_{8\text{-МОП}} \cdot P}{S_{8\text{-МОП}} \cdot a_{\text{геля}} \cdot 1000}, \end{aligned} \quad (1)$$

где $S_{8\text{-МОП}}$, $S_{\text{р.г.}}$ — среднее значение площадей пика 8-МОП на хроматограммах раствора стандартного образца 8-МОП и раствора геля соответственно; $a_{8\text{-МОП}}$ — навеска стандартного образца 8-МОП, которую использовали для приготовления исходного раствора стандартного образца 8-МОП, мг; $V_{\text{ст.р.}}$ — аликвота исходного раствора стандартного образца 8-МОП, использованная для конечного разбавления, мл; $a_{\text{геля}}$ — навеска геля, г; P — содержание основного вещества в стандартном образце, %.

Валидация методики

Специфичность

Специфичность методики определения количественного содержания 8-МОП в геле была доказана путем сравнения хроматограмм, полученных при анализе растворителя (ацетонитрила), раствора стандартного образца 8-МОП и раствора геля.

Линейность и аналитическая область

Линейность и аналитическая область методики определения количественного содержания 8-МОП была установлена с использованием растворов стандартного образца 8-МОП с уровнем концентрации 80%, 90%, 100%, 110% и 120% от номинальной загрузки. Приготовление растворов выполнялось путем разбавления исходного раствора с концентрацией 0.67 мг/мл. Анализ проводился в трехкратной повторности. По полученным результатам построен график зависимости площади пика 8-МОП от концентрации. Используя математическую зависимость,

рассчитана линейная регрессия и определен коэффициент корреляции (R^2).

Предел обнаружения и предел количественного определения

Как и рекомендуется ГФ РФ XV, предел обнаружения (ПО) и предел количественного определения (ПКО) определены по отношению высоты аналитического сигнала к уровню шума. Эти параметры определены с помощью уравнений (2) и (3) соответственно:

$$\text{ПО} = \frac{3 \cdot h}{H} \cdot C, \quad (2)$$

$$\text{ПКО} = \frac{10 \cdot h}{H} \cdot C, \quad (3)$$

где h — размах фонового шума, H — высота пика 8-МОП, C — концентрация раствора 8-МОП.

Правильность

Оценка правильности методики проведена методом добавок путем анализа 9 индивидуально приготовленных растворов стандартного образца 8-МОП с уровнем концентрации 80%, 100%, 120% от номинальной загрузки в трех повторах каждый. Приготовление растворов выполнялось путем разбавления исходного раствора (концентрация 0.67 мг/мл).

По результатам анализа рассчитан фактор отклика (ФО) по формуле (4).

$$\text{ФО} = \frac{\text{экспериментальное значение}}{\text{реальное значение}} \cdot 100\%. \quad (4)$$

На основании девяти рассчитанных значений фактора отклика определено относительное стандартное отклонение RSD и доверительный интервал с помощью уравнений (5) и (6) соответственно.

$$\text{RSD} = \frac{s}{x_{\text{cp}}} \cdot 100\%, \quad (5)$$

где s — стандартное отклонение серии измерений, x_{cp} — среднее значение изменяемой переменной.

$$\Delta x = \frac{t(P, f) \cdot s}{\sqrt{n}}, \quad (6)$$

где $t(P, f)$ — табличное значение критерия Стьюдента при P (доверительная вероятность) = 95%, f (число степеней свободы) = 8; s — стандартное отклонение серии измерений; n — число измерений.

Прецизионность (повторяемость)

Для оценки прецизионности (повторяемости) методики использован вариант, при котором готовили шесть растворов стандартного образца 8-МОП

с уровнем концентрации 100% от номинальной загрузки (методика приготовления описана в разделе «Линейность»).

По результатам измерений рассчитано относительное стандартное отклонение площадей пика 8-МОП по формуле (5).

Внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность

Для оценки внутрилабораторной прецизионности методики готовили по шесть растворов стандартного образца 8-МОП с уровнем концентрации 100% от номинальной загрузки (методика приготовления описана в разделе «Линейность»). Два химика проводили анализ приготовленных растворов посредством полной аналитической процедуры от подготовки образцов до получения результатов в разные дни.

По результатам измерений каждой из двух аналитических сессий рассчитано относительное стандартное отклонение площадей пика 8-МОП по формуле (5). Рассчитан критерий Фишера (F) для двух аналитических сессий по формуле (7).

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}, \quad (7)$$

где s^2 — дисперсия первой и второй серии измерений.

Устойчивость

Для оценки устойчивости готовили раствор стандартного образца 8-МОП с уровнем концентрации 100% от номинальной загрузки (методика приготовления описана в разделе «Линейность»). Проведен хроматографический анализ раствора при температурах колонки, отличающихся на $\pm 5\%$ от температуры, заявленной в методике, т.е. при температурах 23.5 и 26.5°C соответственно. Скорость потока также варьировали на $\pm 5\%$ от величины, заявленной в методике.

По результатам измерений рассчитано относительное стандартное отклонение площадей пика 8-МОП при различных условиях хроматографирования по формуле (5).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики количественного определения

Несмотря на множество уже разработанных и апробированных методик определения количественного содержания 8-МОП, в рамках проведенных ранее исследований не были приведены доказательства воспроизводимости и производительности данных подходов во время рутинного лабораторного анализа.

При разработке методики количественного определения 8-МОП в мягкой лекарственной форме методом ВЭЖХ применены несколько вариантов хроматографических колонок, отличающихся по виду наполнителя. В ходе выбора неподвижной фазы учтена низкая растворимость детектируемого вещества в водных средах, которая указывает на предпочтительное использование сорбента с октадецильной фазой (C_{18}), привитой к силикагелю [21]. Свойства неподвижной фазы могут меняться со временем в процессе использования или просто хранения [22], поэтому в процессе разработки использованы две колонки со схожими характеристиками неподвижной фазы: колонка Luna C18(2) 5 мкм, 250 × 4.6 мм (Phenomenex, США) и Kromasil EternityXT-5-C18, 5 мкм, 250 × 4.6 мм. При оценке пригодности хроматографической системы эффективность колонки Luna C18(2) составила 1400 теоретических тарелок, что не соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. Колонка Kromasil EternityXT-5-C18 показала более высокую эффективность (15000 теоретических тарелок) при прочих одинаковых условиях и, соответственно, выбрана основной для аналитической методики определения количественного содержания 8-МОП.

Далее оценено влияние введения в подвижную фазу ацетонитрила и метанола в качестве органического модификатора. Использование ацетонитрила привело к оптимальному разрешению за короткий период времени (менее 10 мин), в то время как применение метанола в качестве составляющего подвижной фазы вызвало изменение асимметрии пика детектируемого вещества, что не соответствует требованиям пригодности хроматографической системы. В ходе дальнейших исследований осуществлено варьирование объемного содержания ацетонитрила в воде для хроматографии в диапазоне 20–50%, т.к. при более низком содержании воды силанольные группы недостаточно диссоциируют [23]. Элюенты с более высоким содержанием воды (более 50%) вызывают «обезвоживание» неподвижной фазы [24]. В этих условиях образуется углеводородная пленка — дисперсионные взаимодействия между алкильными группами неподвижной фазы становятся сильнее, чем при взаимодействии с элюентом, что, в действительности, блокирует взаимодействие силовых групп с 8-МОП. Оптимальная чувствительность и разрешение достигнуты при соотношении ацетонитрил/вода 50 : 50% (об/об) и скорости потока подвижной фазы 1.0 мл/мин.

Оценка электронного спектра поглощения 8-МОП (рис. 2) с помощью DAD, показала, что максимальный отклик наблюдается при поглощении излучения с длиной волны 250 нм.

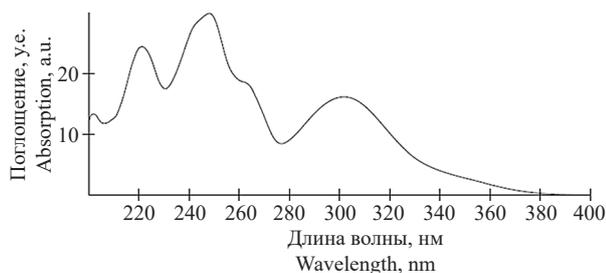


Рис. 2. Спектральный анализ 8-МОП

Fig. 2. Spectral analysis of 8-MOP

Валидация методики

Валидацию методики проводили в соответствии с ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»⁶ и документом «Руководство по валидации аналитических методик»⁷ по следующим характеристикам: специфичность, ПО, ПКО, линейность, аналитическая область, правильность, повторяемость (сходимость), внутрилабораторная (промежуточная) прецизионность.

Специфичность

Для оценки специфичности методики определения количественного содержания 8-МОП проводили анализ следующих модельных образцов: растворителя (ацетонитрила), раствора стандартного образца 8-МОП и раствора геля.

Ниже представлены хроматограммы растворителя (рис. 3), раствора стандартного образца 8-МОП (рис. 4) и раствора геля (рис. 5).

На хроматограмме холостого образца (растворителя) отсутствуют пики со временем удерживания, соответствующим времени удерживания 8-МОП, которые могли бы препятствовать определению аналита. Время удерживания 8-МОП на хроматограмме раствора стандартного образца (рис. 4) идентично времени удерживания пика аналита на хроматограмме раствора геля (рис. 5). Таким образом, экспериментально доказано, что наличие сопутствующих компонентов и примесей не влияет на результат анализа, и методика является специфичной.

ПО и ПКО

ПО 8-МОП составил 0.006 мкг/мл, ПКО составил 0.02 мкг/мл, что позволяет проводить качественную и количественную оценку состава образцов с низким содержанием аналита.

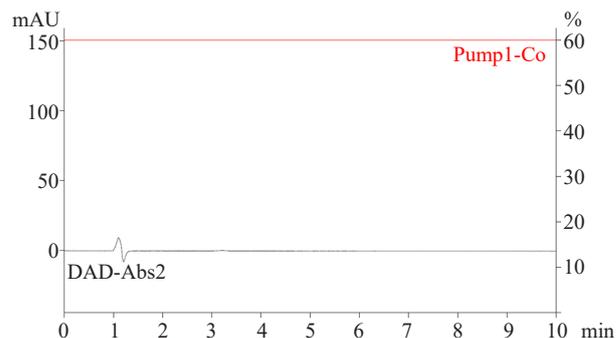


Рис. 3. Хроматограмма растворителя

Fig. 3. Chromatogram of solvent

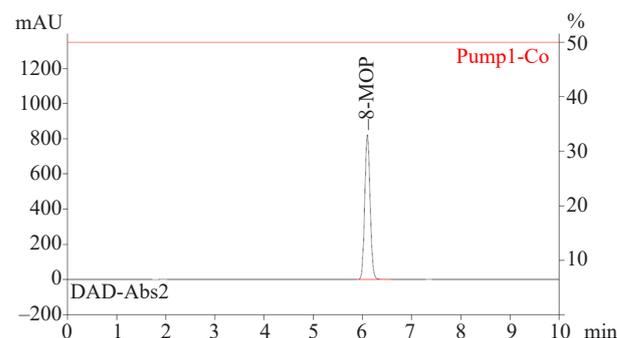


Рис. 4. Хроматограмма раствора стандартного образца 8-МОП (0.067 мг/мл)

Fig. 4. Chromatogram of reference standard 8-MOP solution (0.067 mg/mL)

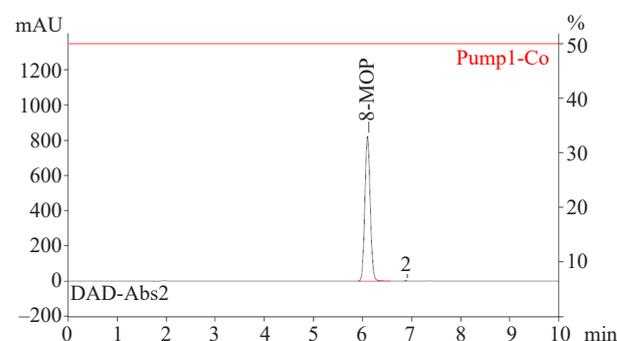


Рис. 5. Хроматограмма раствора геля (10 мг/мл)

Fig. 5. Chromatogram of gel solution (10 mg/mL)

Линейность и аналитическая область

Для подтверждения линейности разработанной методики проводили хроматографирование растворов стандартного образца 8-МОП с уровнями концентрации 80%, 90%, 100%, 110% и 120% от номинального

⁶ <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0012-15-validatsiya-analiticheskikh-metodik/>. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

⁷ https://regulation.eaeunion.org/upload/iblock/4ec/jsw9jphfi1xvwlF9vt4otsb8y2lz5322/ria_30062017_mdod.pdf/. Дата обращения 11.03.2025 г. / Accessed March 11, 2025.

значения концентрации 8-МОП в растворе стандартного образца (табл. 3). Растворы каждого концентрационного уровня были проанализированы в трехкратной повторности.

Таблица 3. Параметры линейности

Table 3. Linearity parameters

Концентрация, % Concentration, %	Концентрация 8-МОП, мг/мл Concentration of 8-MOP, mg/mL	Площадь пика, ед. измерения площади Peak area, mAU·s
80	5.36	2732.56
	5.36	2712.03
	5.36	2756.31
90	6.03	3074.36
	6.03	3098.33
	6.03	3058.87
100	6.7	3436.12
	6.7	3415.33
	6.7	3485.13
110	7.37	3757.21
	7.37	3788.99
	7.37	3741.22
120	1.2	4098.22
	1.2	4134.12
	1.2	4107.84
Угол наклона Slope		514.15
Отрезок, отсекаемый прямой на оси y Segment cut off by a straight line on the y axis		-18.364
Коэффициент корреляции (R^2) Linear correlation (R^2)		0.9979

На основе полученных результатов построен градуировочный график зависимости площади пика 8-МОП от концентрации 8-МОП в растворах стандартного образца (рис. 6). С помощью математической зависимости рассчитана линейная регрессия. Коэффициент корреляции составил 0.9979, что указывает на линейную взаимосвязь концентраций и значений площади пика 8-МОП.

Правильность

Для подтверждения правильности методики проанализированы девять растворов: три раствора с уровнем концентрации 100% от номинального значения концентрации 8-МОП в растворе стандартного

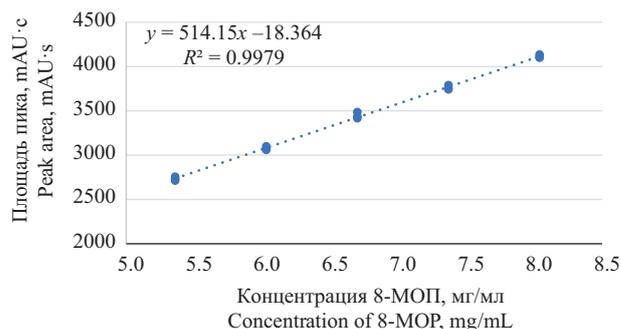


Рис. 6. Линейная калибровочная кривая

Fig. 6. Linear calibration curve

образца и по три раствора с уровнем концентраций, ограничивающих линейный диапазон методики, т.е. 80% и 120% от номинального значения концентрации 8-МОП в растворе стандартного образца, соответственно (табл. 4).

Среднее значение параметра открываемости методики, по которому проводилась оценка соответствия между результатами, полученными с помощью данной аналитической методики, и величиной, принимаемой за истинное, составило 99.42%. Все значения фактора отклика находятся в диапазоне 95–105%, соответствуют пределам, требуемым в ГФ РФ XV.

Прецизионность (повторяемость)

Внутрилабораторная прецизионность методики количественного определения 8-МОП определена путем анализа шести аналогичных растворов стандартного образца 8-МОП в одинаковой концентрации, но в разные дни и двумя химиками (табл. 5).

Оценку прецизионности проводили по результатам обработки экспериментальных данных, полученных в течение двух аналитических сессий, путем расчета относительного стандартного отклонения найденных концентраций. Относительное стандартное отклонение площади пика 8-МОП для каждой аналитической сессии, проведенной в разные дни, разными химиками, составило $\leq 3.0\%$. Оценку статистической эквивалентности результатов, полученных в рамках двух аналитических сессий результатов, проводили путем расчета критерия Фишера (F -тест). Значение критерия Фишера меньше табличного значения критерия Фишера $F(95, 5, 5) = 99.01$, что свидетельствует о незначимом различии результатов двух аналитических сессий с доверительной вероятностью 95%. Таким образом, проведенные валидационные исследования позволили доказать, что методика обеспечивает получение сопоставимых результатов под влиянием дополнительных случайных факторов.

Таблица 4. Параметры правильности

Table 4. Accuracy parameters

Концентрация, % Concentration, %	Теоретическая концентрация, мг/мл Amount taken, mg/mL	Площадь пика, ед. измерения площади Peak area, mAU·s	Практическая концентрация, мг/мл Amount found, mg/mL	Фактор отклика, % Response, %
80	5.36	2732.56	5.31	99.01
80	5.36	2712.03	5.27	98.26
80	5.36	2756.31	5.35	99.87
100	6.7	3436.12	6.67	99.60
100	6.7	3415.33	6.63	99.00
100	6.7	3485.13	6.77	101.02
120	8.04	4098.22	7.96	98.99
120	8.04	4134.12	8.03	99.86
120	8.04	4107.84	7.98	99.22
Статистические характеристики Statistical characteristics			Результаты Results	Критерии приемлемости Eligibility criteria
Среднее значение, % Average, %			99.42	95–105
Относительное стандартное отклонение, % RSD, %			0.79	≤3.0
Верхняя граница доверительного интервала ($P = 95\%$), % The upper limit of the confidence interval ($P = 95\%$), %			101.02	100
Нижняя граница доверительного интервала ($P = 95\%$), % The lower limit of the confidence interval ($P = 95\%$), %			98.26	

Таблица 5. Параметры прецизионности

Table 5. Precision parameters

№ No.	Химик 1 Chemist 1		Химик 2 Chemist 2	
	Площадь пика, ед. измерения площади Peak area, mAU·s	Найденная концентрация, мг/мл Found concentration, mg/mL	Площадь пика, ед. измерения площади Peak area, mAU·s	Найденная концентрация, мг/мл Found concentration, mg/mL
1	3426.24	6.65	3455.36	6.71
2	3355.69	6.52	3498.33	6.79
3	3512.67	6.82	3412.85	6.63
4	3478.98	6.76	3512.65	6.82
5	3504.22	6.80	3459.36	6.72
6	3400.25	6.60	3425.22	6.65
Относительное стандартное отклонение, % RSD, %		1.81	1.13	
Критерий Фишера $F(95; 5; 5)$ Fisher's criterion $F(95; 5; 5)$			2.54	

Устойчивость

Для оценки устойчивости методики количественного определения 8-МОП хроматографировали раствор стандартного образца, варьируя температуру колонки на $\pm 5\%$ от температуры, заявленной в методике, т.е. при температуре 23.5 и 26.5°C соответственно. Отклонение от заявленной в методике скорости потока элюента составило $\pm 5\%$ (табл. 6).

Таблица 6. Параметры устойчивости

Table 6. Robustness parameters

Температура колонки, °C Column temperature, °C	Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min	Площадь пика, ед. измерения площади Peak area, mAU·s
23.5	1.0	3456.51
		3524.12
		3489.22
25.0	1.0	3512.36
		3497.36
		3524.98
26.5	1.0	3552.14
		3547.56
		3485.22
25.0	0.95	3458.69
		3541.22
		3567.54
25.0	1.05	3478.29
		3500.27
		3466.88
Относительное стандартное отклонение, % RSD, %		1.01

Изменения скорости потока и значений температуры колонки на $\pm 5\%$ не оказывают существенного влияния на полученные результаты. Относительное стандартное отклонение площади пика 8-МОП

на хроматограммах раствора стандартного образца менее 3.0%, что соответствует требованиям пригодности хроматографической системы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методика количественного определения 8-МОП методом ВЭЖХ обладает рядом весомых преимуществ перед большинством ранее описанных методик. Использование ацетонитрила вместо метанола в качестве органического модификатора подвижной фазы позволяет работать в смеси ацетонитрил/вода при длине волны, соответствующей максимальному отклику детектора при поглощении излучения веществом. Элюирование аналита в присутствии ацетонитрила происходит раньше, чем при наличии метанола в подвижной фазе — это значительно сокращает время анализа, что является важнейшим фактором для проведения рутинного анализа. В отличие от уже имеющихся методик, в подвижной фазе не были использованы солевые буферы, которые могут увеличивать рабочее давление и требуют значительных усилий по поддержанию работоспособности прибора.

Данная методика была валидирована в соответствии с руководящими принципами, изложенными в ГФ РФ XV, что доказывает ее точность, прецизионность, селективность и надежность. Учитывая чувствительность методики, ее эффективность и соответствие всем параметрам валидности, она является надежной платформой для количественного определения 8-МОП в готовой лекарственной форме.

Вклад авторов

Все авторы принимали активное участие в обсуждении, анализе и разработке эксперимента, обработке полученных результатов, написании текста статьи и ее обсуждении.

Authors' contribution

All the authors took an active part in the discussion, analysis, and development of the experiment, processing the results, writing the text of the article and discussing it.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Bishnoi A., Parsad D. Phototherapy for vitiligo: A narrative review on the clinical and molecular aspects, and recent literature. *Photoderm. Photoimm. Photomed.* 2024;40(3):12968. <https://doi.org/10.1111/phpp.12968>
- Molla A. A Comprehensive Review of Phototherapy in Atopic Dermatitis: Mechanisms, Modalities, and Clinical Efficacy. *Cureus.* 2024;16(3):e56890. <https://doi.org/10.7759/cureus.56890>
- Barros N., Sbroglio L., Buffara M., Baka J., Pessoa A., Azulay-Abulafia L. Phototherapy. *An. Bras. Dermatol.* 2021;96(4):397–407. <https://doi.org/10.1016/j.abd.2021.03.001>
- Welniak A., Białczyk A., Kamińska B., Czajkowski R. Phototherapy in the management of vitiligo – an updated narrative review. *Eur. J. Clin. Exp. Med.* 2024;22(3):668–676. <https://doi.org/10.15584/ejcem.2024.3.26>

- Zengarini C., Baruffaldi G., Piraccini B.M., Bardazzi F., Mussi M., Stancic B., Pileri A. Nb-UVB and PUVA therapy in treating early stages of Mycosis Fungoides: A single-center cross-sectional study. *Photoderm. Photoimm. Photomed.* 2023;39(5):435–440. <https://doi.org/10.1111/phpp.12873>
- Serrano-Pérez J.J., González-Luque R., Merchán M., et al. The family of furocoumarins: Looking for the best photosensitizer for phototherapy. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 2008;199(1):34–41. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2008.04.013>
- Diekmann J., Theves I., Thom K.A., Gilch P. Tracing the Photoaddition of Pharmaceutical Psoralens to DNA. *Molecules.* 2020;25(22):5242. <https://doi.org/10.3390/molecules25225242>
- Vieyra-García P., Wolf P. A deep dive into UV-based phototherapy: Mechanisms of action and emerging molecular targets in inflammation and cancer. *Pharmacol. Ther.* 2021;222:107784. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107784>
- Schalla W., Schaefer H., Kammerau B., Zesch A. Pharmacokinetics of 8-methoxypsoralen (8-MOP) after oral and local application. *J. Invest. Dermatol.* 1976;66:258–259.
- Lapolla W., Yentzer B.A., Bagel J., Halvorson C.R., Feldman S.R. A review of phototherapy protocols for psoriasis treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;64(5):936–949. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2009.12.054>
- Hönigsman H., Szeimies R., Knobler R. Chapter 238. Photochemotherapy and Photodynamic Therapy. In: Goldsmith L.A., Katz S.I., Gilchrist B.A., Paller A.S., Leffell D.J., Wolff K. (Eds.). *Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine*. 8th Edition. TMcGraw-Hill Companies; 2012.
- Kassem A.A., Abd El-Alim S.H., Asfour M.H. Enhancement of 8-methoxypsoralen topical delivery via nanosized niosomal vesicles: formulation development, *in vitro* and *in vivo* evaluation of skin deposition. *Int. J. Pharm.* 2017;517(1–2): 256–268. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.12.018>
- Barradas T.N., Senna J.P., Cardoso S.A., de Holanda e Silva K.G., Mansur C.R.E. Formulation characterization and *in vitro* drug release of hydrogel-thickened nanoemulsions for topical delivery of 8-methoxypsoralen. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2018;92:245–253. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.049>
- Wu J.Y., Li Y.J., Liu T.T., et al. Microemulsions vs chitosan derivative-coated microemulsions for dermal delivery of 8-methoxypsoralen. *Int. J. Nanomed.* 2019;14:2327–2340. <https://doi.org/10.2147/IJN.S191940>
- Pitzanti G., Rosa A., Nieddu M., et al. Transcutol® P containing SLNs for improving 8-methoxypsoralen skin delivery. *Pharmaceutics.* 2020;12(10):973. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100973>
- Chew Y.L., Khor M.A., Lim Y.Y. Choices of Chromatographic Methods as Stability Indicating Assays for Pharmaceutical Products: A Review. *Heliyon.* 2021;7(3):e06553. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06553>
- Araujo P. Key Aspects of Analytical Method Validation and Linearity Evaluation. *J. Chromatogr. B. Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 2009;877(23):2224–2234. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2008.09.030>
- Mahmoud D., ElMeshad A., Fadel M., Tawfik A., Ramez S. Photodynamic therapy fortified with topical oleyl alcohol-based transthesosomal 8-methoxypsoralen for ameliorating vitiligo: Optimization and clinical study. *Int. J. Pharm.* 2022;614:121459. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.121459>
- Агеев В.П., Шляпкина В.И., Куликов О.А., Заборовский А.В., Тарарина Л.А. Качественный и количественный анализ основных производных псоралена сока борщевика Сосновского. *Фармация.* 2022;71(3):10–17. <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-03-02> [Ageev V.P., Shlyapkina V.I., Kulikov O.A., Zaborovskiy A.V., Tararina L.A. Qualitative and quantitative analysis of the main psoralen derivatives in the juice of Sosnovsky's hogweed. *Farmatsiya = Pharmacy.* 2022;71(3):10–17 (in Russ.). <https://doi.org/10.29296/25419218-2022-03-02>]
- Kulikov O., Ageev V., Brodovskaya E., Shlyapkina V., Petrov P., Zharkov M., Yakobson D., Maev I., Sukhorukov G., Pyataev N. Evaluation of photocytotoxicity liposomal form of furanocoumarins Sosnovsky's hogweed. *Chem. Biol. Interact.* 2022;357:109880. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2022.109880>
- Ahmed A., Skinley K., Zhang H. Column technology for liquid chromatography. In: Fanali S., Haddad P.R., Poole C., Lloyd D.K. (Eds.). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Volume 1 in *Handbooks in Separation Science*. 2023. P. 37–60. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99968-7.00007-2>
- Bachhav H., Shirsath G., Badhe S., Kume D., Sonawane S. AI-driven data analysis for identification of impurities in HPLC chromatograms & artificial intelligent system for HPLC column selection and method development. *World J. Pharmac. Res.* 2024;13(13)238–263.
- García-Alvarez-Coque M., Torres-Lapasió J., Ruiz-Angel M., Navarro-Huerta J. Secondary chemical equilibria in reversed-phase liquid chromatography. In: Fanali S., Haddad P.R., Poole C., Lloyd D.K. (Eds.). *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. Volume 1 in *Handbooks in Separation Science*. 2023. P. 121–143. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99968-7.00012-6>
- Žuvela P., Skoczylas M., Jay Liu J., Bączek T., Kaliszan R., Wong M.W., Buszewski B. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem. Rev.* 2019;119(6):3674–3729. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.8b00246>

Об авторах

Алсайед Аднан, инженер-технолог, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: Adnanalsayed00@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0004-8265-934X>

Прежедромирская Анастасия Александровна, инженер, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: a.a.pregedromirskaya@ipt.ru.com. <https://orcid.org/0009-0001-5985-3900>

Шняк Елизавета Александровна, к.фарм.н., доцент, кафедра биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: elizaweta__@mail.ru. ResearcherID H-9402-2013, SPIN-код РИНЦ 7112-7197, <https://orcid.org/0000-0001-8560-7060>

Кедик Станислав Анатольевич, д.т.н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии и промышленной фармации, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: doctorkedik@yandex.ru. Scopus Author ID 7801632547, <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>

About the Authors

Adnan Alsayed, Process Engineer, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: Adnanalsayed00@gmail.com. <https://orcid.org/0009-0004-8265-934X>

Anastasiya A. Prezhedromirskaya, Engineer, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: a.a.pregedromirskaya@ipt.ru.com. <https://orcid.org/0009-0001-5985-3900>

Elizaveta A. Shnyak, Can. Sci. (Pharm.), Associate Professor, Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: elizaveta__@mail.ru. ResearcherID H-9402-2013, RSCI SPIN-code 7112-7197, <https://orcid.org/0000-0001-8560-7060>

Stanislav A. Kedik, Dr. Sci. (Eng.), Professor, Head of the Department of Biotechnology and Industrial Pharmacy, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119454, Russia). E-mail: doctorkedik@yandex.ru. Scopus Author ID 7801632547, <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>