

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ УСЛОВИЙ ЭКСТРАКЦИИ АНТРАГЛИКОЗИДОВ КРУШИНЫ ЛОМКОЙ КОРЫ, РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИХ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

© Романюк А.А.¹, Моисеев Д.В.²**Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (ВГМУ)**

Республика Беларусь, 210009, Витебская область, г. Витебск, пр-т. Фрунзе, д. 27

ООО «Компания «ДЕКО»»

Российская Федерация, 171130, Тверская область, пос. Зеленогорский, ул. Советская, д. 6А

Цель: оптимизация условий экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры, разработка и валидация методики их количественного определения с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась крушины ломкой кора разных производителей. Работу выполняли на жидкостном хроматографе Agilent 1100 в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов G1313A. Хроматографический анализ осуществляли на обращенно-фазовой колонке Zorbax SB-C18 (4,6×250 мм, 5 мкм) в градиентном режиме элюирования подвижной фазы, состоящей из ацетонитрила и воды высокоочищенной, доведенной кислотой ортофосфорной до pH 2.

Результаты. В результате исследования определены оптимальные условия хроматографического разделения антрагликозидов крушины ломкой коры. Установлены оптимальные условия их экстракции: измельченность растительного сырья – 250 мкм, экстрагент – спирт этиловый 40 %, температура экстракции – 80 °С, продолжительность экстракции – 90 минут, соотношение сырья и экстрагента – 1:50.

Доказано, что разработанная методика количественного определения антрагликозидов крушины ломкой коры является специфичной, линейной, правильной, точной и робастной. Установлена стабильность раствора стандартного образца глюкофрангулина А и полученного экстракта.

Заключение. Разработана специфичная методика количественного определения антрагликозидов крушины ломкой коры, которая может быть использована при контроле качества данного вида лекарственного растительного сырья.

Ключевые слова: крушины ломкой кора; антрагликозиды; высокоэффективная жидкостная хроматография; глюкофрангулин А; франгулин А.

Романюк Анна Андреевна – магистр фарм. наук, ст. преподаватель кафедры организации и экономики фармации с курсом ФПК и ПК, ВГМУ, г. Витебск. ORCID iD: 0000-0001-6907-2983. E-mail: annarkdy@gmail.com (автор, ответственный за переписку)

Моисеев Дмитрий Владимирович – д-р фарм. наук, доцент, заместитель генерального директора по качеству, ООО «Компания «ДЕКО»», пос. Зеленогорский. ORCID iD: 0000-0002-1241-832X. E-mail: ussr80@yandex.ru

Лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты широко применяют для лечения симптомов функционального нарушения кишечника. Популярными из них являются лекарственные средства на основе антрагликозидов [1].

Среди растений, содержащих антрагликозиды, несомненный интерес представляет крушина ломкая (*Frangula alnus* Mill.) [2]. Помимо антраценпроизводных, растение содержит эфирные масла, сахара и танины [3, 4].

Ранее нами был проанализирован ассортимент зарегистрированного в Республике Беларусь, Российской Федерации и Республике Казахстан лекарственного растительного сырья – крушины ломкой коры, а также ассортимент лекарственных растительных препаратов на его основе (таблетки, сборы) и установлено, что большинство их них применяют в качестве слабительных лекарственных средств [5]. Также

комплекс биологически активных веществ растения проявляет антимикробное, противогрибковое, антиоксидантное действие [6-11].

В Государственной фармакопее Республики Беларусь, Государственной фармакопее Российской Федерации, Государственной фармакопее Республики Казахстан и Европейской фармакопее при стандартизации крушины ломкой коры для количественного определения используют спектрофотометрические методики. Их недостатками являются трудоемкая пробоподготовка, многостадийность, а также недостаточно высокая специфичность и точность [12-15].

Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) практически лишен перечисленных недостатков и является наиболее достоверным для определения биологически активных веществ крушины ломкой коры.

Цель настоящего исследования – оптимизировать условия экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры, разработать и валидировать методику их количественного определения с использованием метода ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования являлись три серии крушины ломкой коры разных производителей (ООО «НПК Биотест», серия 730617 и серия 140218, ООО «Калина», серия 010519, Республика Беларусь).

Работу выполняли с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1100 («Agilent Technologies», США) в комплекте с системой подачи и дегазации на четыре растворителя G1311A, диодно-матричным детектором G1315B, термостатом колонок G1316A, устройством для автоматического ввода образцов G1313A. Для сбора данных, обработки хроматограмм, а также спектров поглощения использовали программу Agilent ChemStation for LC 3D.

Для исследования применяли хроматографическую колонку Zorbax SB-C18 (4,6×250 мм, 5 мкм, «Agilent Technologies», США). В качестве подвижной фазы использовали ацетонитрил для жидкостной хроматографии, воду высокоочищенную и кислоту ортофосфорную. Хроматографирование проводили в градиентном режиме элюирования подвижной фазы, скоростью которой составляла 1,0 мл/мин. Температура колонки – 50°C. Детектирование осуществляли при длине волны 435 нм.

В работе использовали стандартные образцы антраценпроизводных: глюкофрангулин А (CAS [21133-53-9], «Phytolab», Германия), франгулин А (CAS [521-62-0], «Carl Roth», Германия), эмодин (CAS [518-82-1], «Cayman Chemical», США), хризофанол (CAS [481-74-3], «Cayman Chemical», США), фисцион (CAS [521-61-9], «Cayman Chemical», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного хроматографического анализа извлечения из крушины ломкой коры при сравнении времен удерживания и спектральных характеристик исследуемых пиков и пиков стандартных образцов идентифицированы антраценпроизводные глюкофрангулин А, франгулин А, эмодин, хризофанол и фисцион. На рисунке 1 представлена хроматограмма извлечения из крушины ломкой коры и хроматограмма смеси растворов стандартных образцов идентифицированных веществ, спек-

тры поглощения в ультрафиолетовой области которых представлены на рисунке 2.

Глюкофрангулин А и франгулин А являются антрагликозидами, эмодин, хризофанол, фисцион – агликонами антраценпроизводных. Установлено, что доминирующим антрагликозидом крушины ломкой коры является глюкофрангулин А.

Вещества, соответствующие хроматографическим пикам 6–9, согласно спектральным характеристикам, отнесены к гликозидам антраценпроизводных, остальные вещества на хроматограмме по спектрам в ультрафиолетовой области и в соответствии с данными литературы – к флавоноидам.

Таким образом, для количественного определения учитываются хроматографические пики антрагликозидов 1, 2 и 6–9, поскольку основной фармакологический эффект крушины ломкой коры связан с их действием.

В спектрофотометрических методиках количественного определения антрагликозидов, представленных в Государственной фармакопее Республики Беларусь, Государственной фармакопее Российской Федерации, Государственной фармакопее Республики Казахстан и Европейской фармакопее, при пробоподготовке используют раствор хлорида железа (III) для окисления восстановленных форм антраценпроизводных [12–15]. Однако после проведения сравнительного хроматографического анализа извлечения из крушины ломкой коры до добавления данного реактива и после, установлено, что их качественный и количественный состав остается одинаковым. Это может быть связано с тем, что восстановленные формы антраценпроизводных весьма нестабильны и окисляются на этапе экстракции при нагревании, поэтому в разработке методики количественного определения данного реактив не использовали.

В ходе исследования нами подобраны оптимальные условия хроматографического определения антрагликозидов крушины ломкой коры. Для разделения их пиков используется градиентный режим элюирования подвижной фазы. В таблице 1 приведен профиль ее градиента. При этом подвижная фаза А – вода высокоочищенная, доведенная кислотой ортофосфорной до pH 2; подвижная фаза В – ацетонитрил.

Таким образом, хроматографическое разделение осуществляется за 20 минут. Температура колонки составляет 50°C, скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. В качестве длины волны детектирования выбрано значение 435 нм.

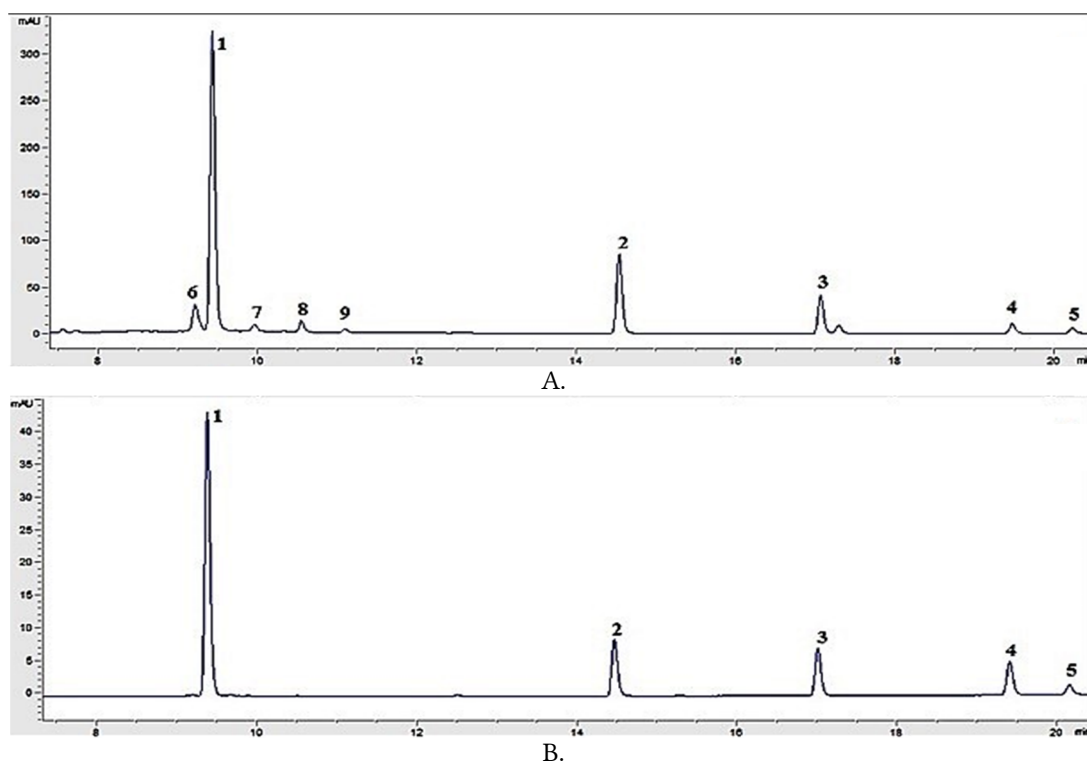


Рис. 1. Хроматограмма извлечения из крушины ломкой коры (А) и хроматограмма смеси растворов стандартных образцов антраценпроизводных (В) при длине волны 435 нм (1 – глюкофрангулин А, 2 – франгулин А, 3 – эмодин, 4 – хризофанол, 5 – фисцион, 6–9 – антрагликозиды)

Fig. 1. Chromatogram of extraction from alder buckthorn bark (A) and chromatogram of a mixture of solutions of standard samples of anthracene derivatives (B) at a wavelength of 435 nm (1 – glucofrangulin A, 2 – frangulin A, 3 – emodin, 4 – chrysophanol, 5 – physcione, 6–9 – anthraglycosides)

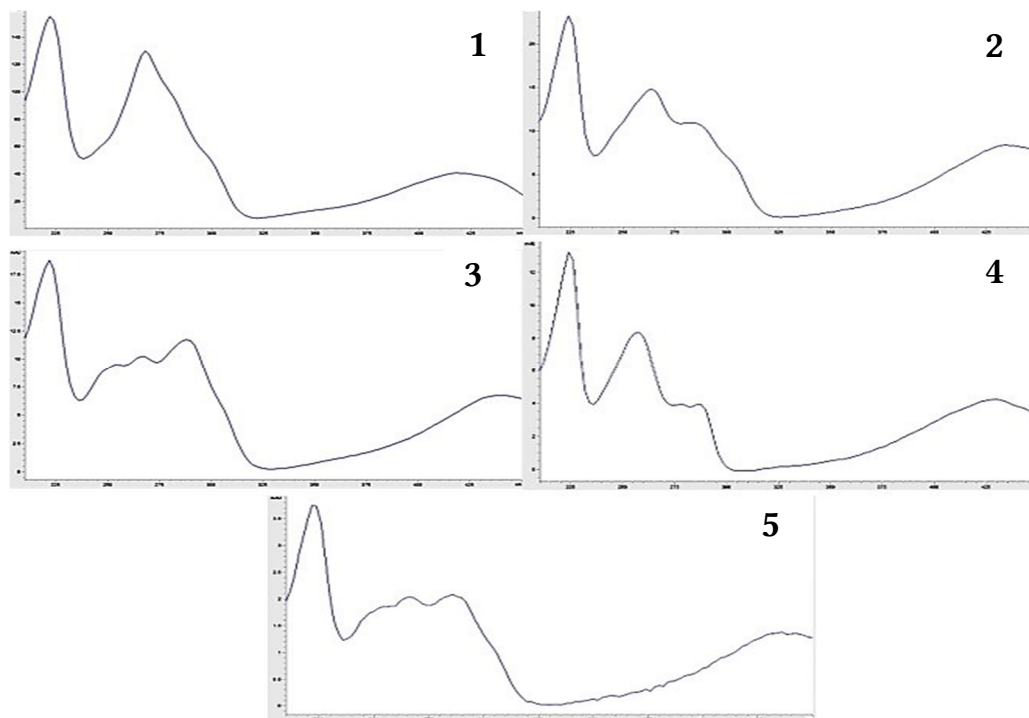


Рис. 2. Спектры поглощения в ультрафиолетовой области идентифицированных антраценпроизводных (1 – глюкофрангулин А, 2 – франгулин А, 3 – эмодин, 4 – хризофанол, 5 – фисцион)

Fig. 2. Absorption spectra in the ultraviolet region of the identified anthracene derivatives (1 – glucofrangulin A, 2 – frangulin A, 3 – emodin, 4 – chrysophanol, 5 – physcione)

Таблица 1

Table 1

Профиль градиента подвижной фазы при определении антрагликозидов крушины ломкой коры

Gradient profile of the mobile phase in the determination of anthraglycosides of alder buckthorn bark

Время (мин) Time (min)	Подвижная фаза А (%, об/об) Mobile phase A (%, v/v)	Подвижная фаза В (%, об/об) Mobile phase B (%, v/v)
0	90	10
10	50	50
15	20	80
20	0	100

Ранее нами определены оптимальные условия экстракции франгулина А [16]. В настоящем исследовании установлены оптимальные условия экстракции суммы антрагликозидов крушины ломкой коры, при которых наблюдается их наибольший выход.

На первом этапе подбора оптимальных условий экстракции изучали зависимость полноты экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры от природы экстрагента. Для этого проводили серию опытов с водно-спиртовыми смесями с шагом 10%. Результаты представлены на рисунке 3.

Таким образом, наиболее оптимальным экстрагентом для извлечения антрагликозидов крушины ломкой коры является спирт этиловый 40%.

Далее определяли влияние температуры экстракции на выход антрагликозидов крушины ломкой коры. Экстракцию проводили при температурах 20 °С, 40 °С, 60 °С, 80 °С, 100 °С. Результаты представлены на рисунке 4.

Из рисунка 4 видно, что наибольший выход антрагликозидов наблюдается при температуре 80°С, поэтому данное значение использовали в дальнейших исследованиях.

На следующем этапе оценивали влияние продолжительности экстракции. При изучении полноты высвобождения действующих веществ крушины ломкой коры при экстракции в течение 15 минут, 30 минут, 45 минут, 60 минут, 90 минут и 120 минут установлено, что оптимальная продолжительность экстракции составляет 90 минут.

Также важным фактором, влияющим на полноту извлечения действующих веществ растений, является измельченность их лекарственного растительного сырья. Для изучения влияния данного фактора крушины ломкой кору измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сита с размером отверстий 125 мкм, 250 мкм, 500 мкм и 1000 мкм, и экстрагировали антрагликозиды в определенных ранее условиях. На рисунке 5 представлена зависимость полноты

экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры от измельченности лекарственного растительного сырья.

Следовательно, наибольший выход антрагликозидов достигается при измельченности сырья 250 мкм, поэтому данное значение было выбрано в качестве оптимального.

На следующем этапе исследований определено оптимальное соотношение массы сырья и объема экстрагента. Для этого изучали полноту высвобождения антрагликозидов крушины ломкой коры при соотношении сырья и экстрагента 1:25, 1:50, 1:100, 1:200. Установлено, что при соотношении массы сырья и экстрагента 1:50 наблюдается наибольший выход действующих веществ растения.

Валидация разработанной методики количественного определения антрагликозидов крушины ломкой коры методом ВЭЖХ проведена по параметрам специфичности, линейности, правильности, точности, робастности, стабильности растворов стандартного образца и полученных экстрактов [17–19].

Специфичность разработанной методики подтверждена совпадением времен удерживания и спектров поглощения пиков глюкофрангулина А и франгулина А на хроматограммах растворов стандартных образцов глюкофрангулина А и франгулина А и испытуемых образцов лекарственного растительного сырья и отсутствием пиков на хроматограмме используемого растворителя (спирт этиловый 40%). Оценка специфичности проведена по параметру спектральной чистоты пиков в лекарственном растительном сырье (не менее 94%), коэффициенту разрешения пика глюкофрангулина А от других пиков на хроматограмме ($R_s > 1,5$). Эффективность разделения по пику глюкофрангулина и франгулина А – более 10 тысяч теоретических тарелок, коэффициенты асимметрии около 0,80 и 0,81, соответственно.

Линейность методики установлена путем трехкратного построения градуировочного

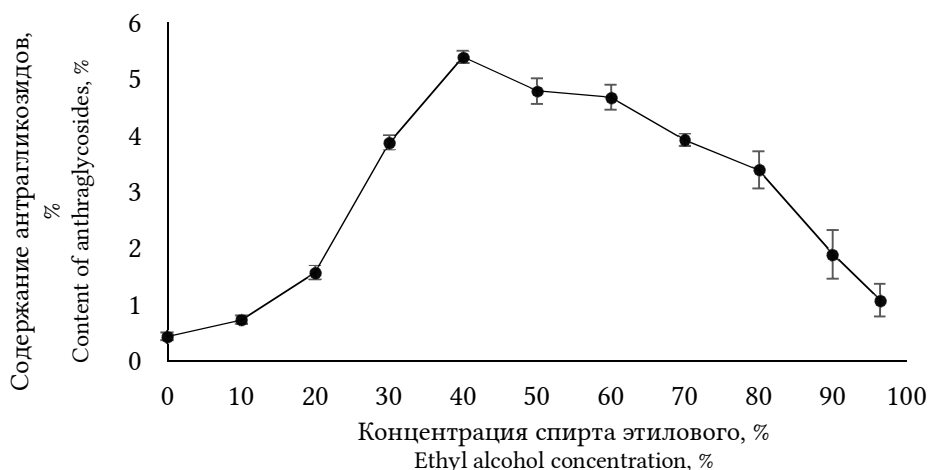


Рис. 3. Зависимость полноты экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры от концентрации спирта этилового ($n = 3$, $P = 95\%$)

Fig. 3. Dependence of the completeness of extraction of anthraglycosides of alder buckthorn bark on the concentration of ethyl alcohol ($n = 3$, $P = 95\%$)

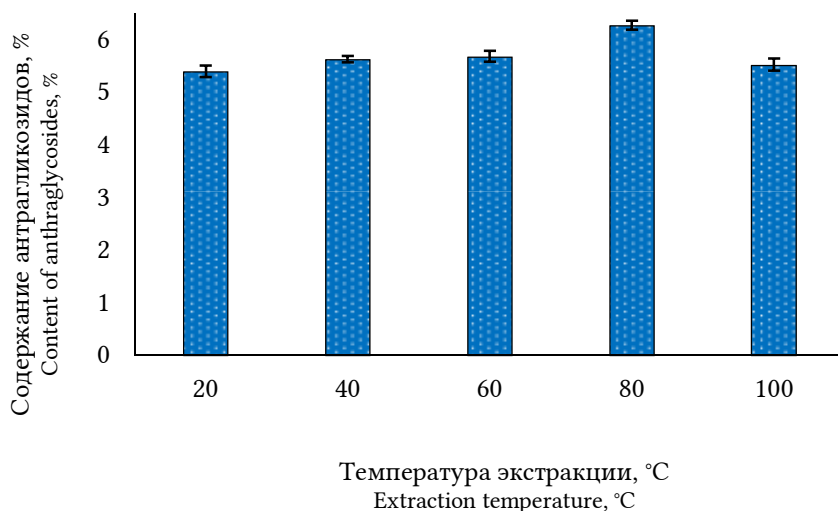


Рис. 4. Зависимость полноты экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры от температуры экстракции ($n = 3$, $P = 95\%$)

Fig. 4. Dependence of the completeness of extraction of anthraglycosides of alder buckthorn bark on the extraction temperature ($n = 3$, $P = 95\%$)

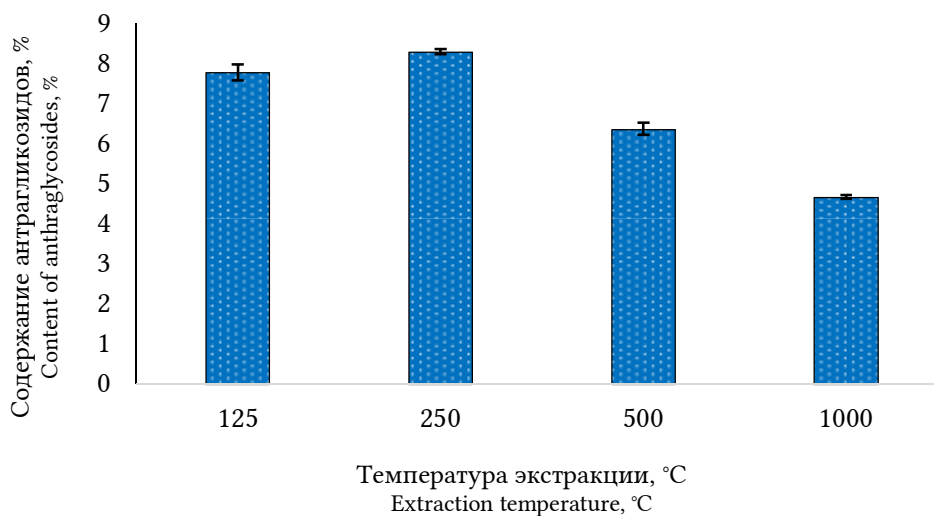


Рис. 5. Зависимость полноты экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры от измельченности лекарственного растительного сырья ($n = 3$, $P = 95\%$)

Fig. 5. Dependence of the completeness of extraction of anthraglycosides of alder buckthorn bark on the grinding of medicinal plant materials ($n = 3$, $P = 95\%$)

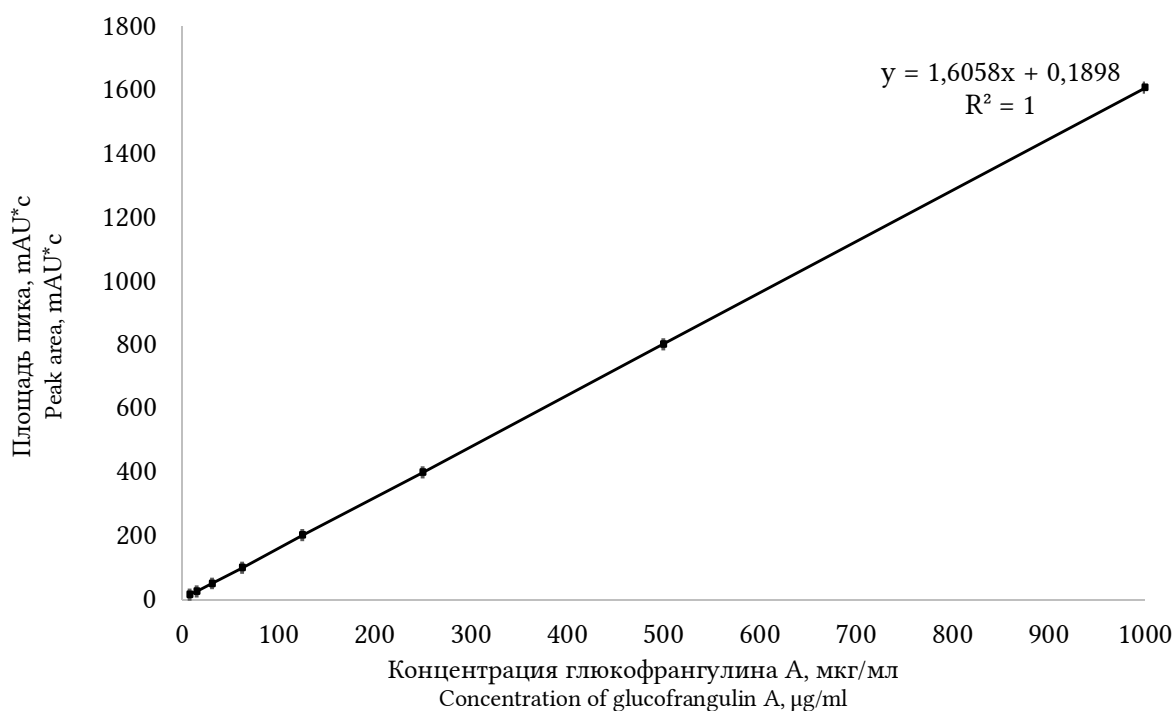


Рис. 6. Градуировочный график зависимости аналитического сигнала (площадь пика) от концентрации глюкофрангулина А ($n = 3$, $P = 95\%$)

Fig.6. Calibration plot of the dependence of the analytical signal (peak area) on the concentration of glucofrangulin A ($n = 3$, $P = 95\%$)

графика в диапазоне концентраций раствора глюкофрангулина А 7,8–1000 мкг/мл (рис. 6).

Таким образом, разработанная методика обладает удовлетворительной линейностью, поскольку коэффициент корреляции в уравнении линейной регрессии составляет 1,000 при критерии приемлемости не менее 0,999.

Для подтверждения правильности методики проведена серия анализов испытуемых растворов методом стандартных добавок. Результаты представлены в таблице 2.

Из таблицы 2 следует, что открываемость разработанной методики соответствует установленным требованиям, поскольку критерий приемлемости находится в диапазоне 95–105%. При этом в результате добавления стандартного образца глюкофрангулина А к испытуемому раствору происходит увеличение только площади хроматографического пика, ему соответствующего. Площади остальных хроматографических пиков не изменяются.

Точность аналитической методики определена по параметрам сходимости и внутрилабораторной воспроизводимости. Сходимость оценена путем многократного повторения методики определения на одном сырье одним и тем же аналитиком в один и тот же день ($n = 9$, $P = 95\%$). Относительное стандартное отклонение составляет при этом 0,7%, что не превышает предельного значения критерия приемлемости (5,0%).

Внутрилабораторная воспроизводимость проверена по результатам определений, которые проводили два аналитика в разные дни. Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости разработанной методики представлены в таблице 3.

Из таблицы 2 видно, что аналитическая методика является точной, поскольку максимальное относительное стандартное отклонение составляет 1,0% (критерий приемлемости – не более 5,0%).

Робастность методики проверена путем изменения температуры колонки ($50 \pm 3^\circ\text{C}$), а также наклона градиента ($\pm 2\%$). Значения площадей пиков, полученные при хроматографировании испытуемого раствора при заданных измененных условиях, отличаются от исходных данных не более чем на 3,3% при критерии приемлемости – не более 5,0%.

Стабильность растворов стандартного образца глюкофрангулина А и испытуемого раствора определена путем сравнения суммы площадей пиков стандартного образца и антрагликозидов через равные промежутки времени при хранении в течение 24 часов при комнатной температуре. Уменьшение содержания анализируемых веществ составляет не более 2,0% при критерии приемлемости – не более 5,0%. Следовательно, раствор стандартного образца глюкофрангулина А и испытуемый раствор в течение 24 часов стабильны.

Таблица 2

Table 2

Результаты определения правильности методики (n = 3, P = 95 %)

Results of determining the correctness of the method (n = 3, P = 95%)

Исходная концентрация антрагликозидов (мкг/мл) Initial concentration of anthraglycosides (µg/ml)	Добавлено глюкофрангулина А (мкг/мл) Glucofrangulin A added (µg/ml)	Обнаружено суммы антрагликозидов (мкг/мл) Detected amount of anthraglycosides (µg/ml)	Открываемость, % Opening rate, %	Относительное стандартное отклонение (RSD, %) Relative standard deviation (RSD, %)
635.6	600.0	1279.8	103.6	0.9
635.6	400.0	1063.9	102.7	0.6
635.6	200.0	866.7	103.7	4.9

Таблица 3

Table 3

Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости методики (n = 3, P = 95 %)

Results of determining the intralaboratory reproducibility of the method (n = 3, P = 95%)

	День 1 Day 1	День 2 Day 2
Аналитик 1 Analyst 1	RSD = 1.0 %	RSD = 0.7 %
Аналитик 2 Analyst 2	RSD = 0.4 %	RSD = 0.9 %

Таким образом, предлагается следующая методика количественного определения антрагликозидов крушины ломкой коры: 1,000 г испытуемого сырья (250 мкм) помещают в круглодонную колбу со шлифом вместимостью 100 мл и прибавляют 50,0 мл спирта этилового 40%. Взвешивают с точностью до 0,01 г, нагревают на водяной бане при температуре 80°C с обратным холодильником в течение 90 минут. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры и доводят массу спиртом этиловым 40 % до первоначальной. Центрифугируют при 5000 g в течение 5 мин, надосадочную жидкость фильтруют через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Приготовление раствора сравнения: 25,0 мг стандартного образца глюкофрангулина А растворяют в спирте этиловом 40% и доводят до объема 100,0 мл этим же растворителем.

Расчет количественного содержания антрагликозидов (%) в пересчете на глюкофрангулин А проводят по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times C \times 500}{S_2 \times m_1 \times (100 - W)}$$

где:

S_1 – сумма площадей пиков антрагликозидов на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 – площадь пика глюкофрангулина А на хроматограмме раствора сравнения;

m_1 – масса навески испытуемого сырья, г;

C – содержание глюкофрангулина А в растворе сравнения, мг/мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Разработанная методика апробирована на трех сериях крушины ломкой коры. Результаты приведены в таблице 4.

Таким образом, в результате исследования методом ВЭЖХ в крушины ломкой коре подтверждено наличие антраценпроизводных глюкофрангулина А, франгулина А, эмолина, хризофанолы и фисциона. Установлено, что глюкофрангулин А является доминирующим антрагликозидом крушины ломкой коры.

Подобраны оптимальные условия хроматографического определения антрагликозидов крушины ломкой коры. Обоснованы оптимальные условия их экстракции: измельченность растительного сырья – 250 мкм, экстрагент – спирт этиловый 40%, температура экстракции – 80°C, продолжительность экстракции – 90 минут, соотношение сырья и экстрагента – 1:50.

Доказано, что разработанная методика количественного определения антрагликозидов крушины ломкой коры является специфичной, линейной, правильной, точной и робастной, поэтому может быть использована при контроле ее качества.

Таблица 4

Table 4

Результаты апробации разработанной методики (n = 3, P = 95 %)

Results of approbation of the developed method (n = 3, P = 95%)

Производитель крушины ломкой коры, серия Alder buckthorn bark manufacturer, series	Содержание антрагликозидов, % Content of anthraglycosides, %
ООО «НПК Биотест», 730617 LLC «NPK Biotest», 730617	8.25 ± 0.07
ООО «НПК Биотест», 140218 LLC «NPK Biotest», 140218	9.74 ± 0.20
ООО «Калина», 010519 LLC «Kalina», 010519	9.17 ± 0.26

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. *Фармакогнозия*. Москва: Медицина, 2002. 656 с. [Murav'yeva D.A., Samylina I.A., Yakovlev G.P. *Pharmacognosy*. Moscow: Medicine, 2002. 656 p. (in Russ.)].
- Алексеева Г.М., Белодубровская Г.А., Блинова К.Ф., Гончаров М.Ю., Жохова Е.В., Зеленцова А.Б., Маргна У.В., Повыдыш М.Н., др. *Фармакогнозия. Лекарственное сырье растительного и животного происхождения*. Санкт-Петербург: СпецЛит, 2010. 863 с. [Alekseyeva G.M., Belodubrovskaya G.A., Blinova K.F., Goncharov M.Yu., Zhokhova E.V., Zelentsova A.B., Margna U.V., Povydysh M.N., et al. *Pharmacognosy. Medicinal raw materials of plant and animal origin*. St. Petersburg: SpetsLit, 2010. 863 p. (in Russ.)].
- Roudbaraki, S. J., Nori-Shargh D. Analysis of the volatile constituents of *Frangula alnus* Mill. from Iran. *Russian Chemical Bulletin*. 2016;65(11): 2770–2772. DOI: 10.1007/s11172-016-1652-0.
- Arsenijevic J., Drobac M., Slavkovska V., Kovacevic N. Anatomical analysis and phytochemical screening of *Frangula rupestris* (Scop.) Schur (Rhamnaceae). *Botanica Serbica*. 2018;42(2):231–239. DOI: 10.5281/zenodo.1468339.
- Романюк А.А., Моисеев Д.В. Крушины ломкой кора: компонентный состав, фармакологические свойства, стандартизация. *Вестник фармации*. 2020;2(88):95–104 [Romanyuk A.A., Moiseyev D.V. Alder buckthorn bark: component composition, pharmacological properties, standardization. *Vestnik farmatsii*. 2020;2(88):95–104 (in Russ.)]. EDN: XWYMHG.
- Bacha A., Jemel I., Moubayed N., Abdelmalek I. Purification and characterization of a newly serine protease inhibitor from *Rhamnus frangula* with potential for use as therapeutic drug. *Journal of Biotech Research*. 2017;7(2):1–13. DOI: 10.1007/s13205-017-0764-z.
- Izhaki I. Emodin-a secondary metabolite with multiple ecological function in higher plants. *New Phytologist*. 2002;155(2):205–217. DOI:10.1046/j.1469-8137.2002.00459.x.
- Sydiskis R., Owen D., Lohr J., Rosler K., Blomster R. Inactivation of enveloped viruses by anthraquinones extracted from plants. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1991;35(12):2463–2466. DOI: 10.1128/AAC.35.12.2463.
- Manojlovic N., Solujic S., Sukdolac S., Milosev M. Antifungal activity of *Rubia tinctorum*, *Rhamnus frangula* and *Caloplaça cerina*. *Fitoterapia*. 2005;76(2):244–246. DOI: 10.1016/j.fitote.2004.12.002.
- Abad M., Ansuategi M., Bermejo P. Active antifungal substances from natural sources. *Archive for Organic Chemistry*. 2007;7:116–145. DOI: 10.3998/ark.5550190.0008.711.
- Stef D., Gergen I., Trasca T., Harmanescu M., Lavinia S., Ramona B., Heghedus M. Total antioxidant and radical scavenging capacities for different medicinal herbs. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009;14(5):4704–4707. URL: <http://www.rombio.eu/rbl5vol14/12.pdf>.
- Марченко С.И., под ред. *Государственная фармакопея Республики Беларусь*. Том №2. *Контроль качества субстанций для фармацевтического использования и лекарственного растительного сырья*. Молодечно: Победа, 2016. 1368 с. [Marchenko S.I. *State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus*. Volume №2. *Quality control of substances for pharmaceutical use and medicinal plant raw materials*. Molodechno: Victory, 2016. 1368 p. (in Russ.)]
- Емшинова С.В., Потанина О.Г., Буданова Е.В., Чистяков В.В. *Государственная фармакопея Российской Федерации*. Том №IV. Москва: Медицина, 2018. 7019 с. [Emshinova S.V., Potanina O.G., Budanova E.V., Chistyakov V.V. *State Pharmacopoeia of the Russian Federation*. Volume IV. Moscow: Medicine, 2018. 7019 p. (in Russ.)]
- Тулегенова А.У. под ред. *Государственная фармакопея Республики Казахстан*. Том №3. Астана: Жибекжолы, 2014. 872 с. [Tulegenova A.U. *State Pharmacopoeia of the Republic of Kazakhstan*. Volume No 3. Astana: Zhibekzholy, 2014. 872 p. (in Russ.)]

15. Marianne E.K., editor. *European Pharmacopoeia:EDQM*. 10th Edition. URL: <https://pheur.edqm.eu/home>
16. Романюк А.А., Моисеев Д.В. Оптимизация условий экстракции франгулина А в крушины ломкой коре методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Вестник Башкирского государственного медицинского университета*. 2019;(4):291–295 [Romanyuk A.A., Moiseyev D.V. Optimization of conditions for extraction of frangulin A into adler buckthorn brittle by high performance liquid chromatography. *Vestnik Bashkirskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2019;(4):291–295 (in Russ.)]. EDN: QUXDIR.
17. Шеряков А.А., под ред. *Государственная фармакопея Республики Беларусь*. Том №1. Общие методы контроля качества лекарственных средств. Молодечно: Победа, 2012. 1220 с. [Sheryakov A.A. *State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus*. Volume №1. *General methods of drug quality control*. Молодечно: Victory, 2012. 1220 p. (in Russ.)].
18. Самылина И.А., Моисеев Д.В., Марченко С.И., Веремчук О.А., Моисеева А.М., Сорокина А.А. Гармонизация методических подходов к стандартизации фармакопейных видов растительно-го сырья, содержащего флавоноиды. *Фармация*. 2020;5(69):5–11 [Samylina I.A., Moiseyev D.V., Marchenko S.I., Veremchuk O.A., Moiseyeva A.M., Sorokina A.A. Harmonization of methodological approaches to the standardization of pharmacopoeial types of plant materials containing flavonoids. *Pharmacy*. 2020;5(69):5–11 (in Russ.)]. DOI: 10.29296/25419218-2020-05-01. EDN: PLLZEG.
19. Эпштейн Н.А., Севастьянова В.Л., Королева А.И. Исследование робастности при валидации методик ВЭЖХ и УЭЖХ: современный подход, включающий анализ рисков. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;4:96–109 [Epshteyn N.A., Sevast'yanova V.L., Koroleva A.I. Robustness study in the validation of HPLC and UPLC methods: a modern approach including risk analysis. *Drug development and registration*. 2018;4:96–109 (in Russ.)]. EDN: VYLMKT.

Поступила в редакцию 02.07.2022

Подписана в печать 23.12.2022

Для цитирования: Романюк А.А., Моисеев Д.В. Определение оптимальных условий экстракции антрагликозидов крушины ломкой коры, разработка и валидация методики их количественного определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Человек и его здоровье*. 2022;25(4):119–128. DOI: 10.21626/vestnik/2022-4/15. EDN: KQYPVU.

DETERMINATION OF THE OPTIMAL CONDITIONS FOR THE EXTRACTION
OF ANTHRAGLYCOSIDES OF ALDER BUCKTHORN BARK, DEVELOPMENT AND
VALIDATION OF A METHOD FOR THEIR QUANTITATIVE DETERMINATION
BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

© Romanyuk A.A.¹, Moiseev D.V.²

Vitebsk State Medical University of the Order of Peoples' Friendship (VSMU)

27, Frunze ave, Vitebsk, Vitebsk region, 210009, Republic of Belarus

LLC «Company «DEKO»»

6A, Sovetskaya Str., vil. Zelenogorsky, Tver region, 171130, Russian Federation

Objective: optimization of extraction conditions for anthraglycosides of alder buckthorn bark, development and validation of a method for their quantitative determination using high performance liquid chromatography.

Materials and methods. The object of the study was alder buckthorn bark from different manufacturers. The work was performed on an Agilent 1100 liquid chromatograph complete with a G1311A four-solvent supply and degassing system, a G1315B diode array detector, a G1316A column thermostat, and a G1313A automatic sample injection device. Chromatographic analysis was carried out on a Zorbax SB-C18 reverse-phase column (4.6×250 mm, 5 µm) in a gradient elution mode of the mobile phase consisting of acetonitrile and highly purified water, adjusted to pH 2 with phosphoric acid.

Results. As a result of the study, the optimal conditions for the chromatographic separation of anthraglycosides of alder buckthorn bark were determined. The optimal conditions for their extraction have been established: the grinding of plant raw materials is 250 µm, the extractant is ethyl alcohol 40%, the extraction temperature is 80°C, the extraction time is 90 minutes, the ratio of raw materials and extractant is 1:50. It has been proved that the developed method for the quantitative determination of anthraglycosides of alder buckthorn bark is specific, linear, correct, accurate and robust. The stability of the solution of the standard sample of glucofrangulin A and the obtained extract was established.

Conclusion. A specific method for the quantitative determination of anthraglycosides of alder buckthorn bark has been developed, which can be used in quality control of this type of medicinal plant material.

Keywords: alder buckthorn bark; anthraglycosides; high performance liquid chromatography; glucofrangulin A; frangulin A.

Romanyuk Anna A. – M. Sci. (Pharm.), senior lecturer at the Department of organization and economics of pharmacy with the course of FPK and PK, VSMU, Vitebsk, Republic of Belarus. ORCID iD: 0000-0001-6907-2983. E-mail: annarkdy@gmail.com (corresponding author)

Moiseev Dmitry V. – Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor, CEO Deputy of quality, LLC «Company «DEKO»», vil. Zelenogorsky, Russian Federation. ORCID iD: 0000-0002-1241-832X. E-mail: ussr80@yandex.ru

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

SOURCE OF FINANCING

The authors state that there is no funding for the study.

Received: 02.07.2022

Accepted: 23.12.2022

For citation: Romanyuk A.A., Moiseev D.V. Determination of the optimal conditions for the extraction of anthraglycosides of alder buckthorn bark, development and validation of a method for their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Humans and their health*. 2022;25(4):119–128. DOI: 10.21626/vestnik/2022-4/15. EDN: KQYPVU.
