

СТРЕСС-ТЕСТЫ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© Романюк А.А.¹, Моисеев Д.В.²¹ Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет (ВГМУ)

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

² ООО «Компания «ДЕКО»»

Российская Федерация, 129344, г. Москва, ул. Енисейская, д. 3, корп. 4

Цель: изучение стабильности растворов стандартных образцов сеннозида В и глюкофрангулина А методом стресс-тестов с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Материалы и методы. Объектами исследования являлись растворы стандартных образцов сеннозида В, а также глюкофрангулина А. Стрессовыми агентами являлись 0,5М водный раствор меди (II) хлорида (CuCl_2), 0,5М водный раствор железа (III) хлорида (FeCl_3), 0,1М водный раствор кислоты хлороводородной (HCl), а также 0,1М водный раствор натрия гидроксида (NaOH) и раствор пероксида водорода (H_2O_2) 3%. Исследование проводили с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1100. Для этого использовали обращенно-фазовую колонку Zorbax SB-C18 (4,6×250 мм, 5 мкм). Элюирование подвижной фазы (ацетонитрил и вода высокоочищенная, которая доведена до значения pH 2 кислотой ортофосфорной) осуществляли в градиентном режиме. Детектирование проводили при длинах волн 360 нм и 435 нм.

Результаты. Установлено, что раствор стандартного образца глюкофрангулина А стабилен в течение 14 дней под действием 0,1М водного раствора HCl и 0,1М водного раствора NaOH , а также 0,5М водного раствора FeCl_3 и раствора H_2O_2 3%. При взаимодействии раствора стандартного образца глюкофрангулина А с 0,5 М водным раствором CuCl_2 наблюдается его деструкция. При взаимодействии стандартного образца сеннозида В с раствором H_2O_2 3% и 0,5М водным раствором CuCl_2 он остается стабильным. При взаимодействии с остальными стрессовыми агентами происходит его деструкция.

Заключение. Полученные результаты по стабильности растворов стандартных образцов антраценпроизводных определяют основные физико-химические факторы, которые вызывают их деструкцию, что может быть учтено при валидации аналитических методик, обосновании условий хранения, упаковки и переработки лекарственного растительного сырья, которое содержит в своем составе антраценпроизводные.

Ключевые слова: антраценпроизводные; высокоэффективная жидкостная хроматография; глюкофрангулин А; сеннозид В; стресс-тесты.

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, зам. ген. директора по качеству, ООО «Компания «ДЕКО»», г. Москва. ORCID iD: 0000-0002-1241-832X. E-mail: ussr80@yandex.ru

В настоящее время при составлении регистрационного досье в разделе «Стабильность» указывают информацию о результатах проведенных стресс-тестов фармацевтических субстанций растительного происхождения, что используется для обоснования возможности определения в них примесей, а также для выбора их упаковки. Стабильность при этом определяют в результате взаимодействия фармацевтических субстанций с кислотами и щелочами, под действием катионов железа и меди, а также при нагревании и облучении.

Помимо этого, результаты стресс-тестов должны учитываться при обосновании условий переработки лекарственного растительного сырья, а также его хранения. Оценка стабильности является важным этапом исследований при определении сроков годности лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов, разработанных на его основе [1].

В условиях разработки и валидации методик количественного определения биологически активных веществ лекарственных растений вопрос проведения стресс-тестов является также

весьма актуальным. В результате этого определяется их стабильность под действием деструктирующих агентов, а также оценивается возможность методики разделять продукты деструкции и определяемые вещества в достаточной степени.

Методики количественного определения антраценпроизводных сенны листьев, крушины ломкой коры и жостера слабительного плодов были ранее нами были разработаны и валидированы. Доминирующим антраценпроизводным сенны листьев является сеннозид В, крушины ломкой коры и жостера слабительного плодов – глюкофрангулин А [2-4].

Таким образом, цель настоящего исследования – изучение влияния различных факторов на стабильность растворов стандартных образцов сеннозида В и глюкофрангулина А методом стресс-тестов с использованием метода ВЭЖХ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей статье объектами исследования являлись стандартный образец сеннозида В (CAS [128-57-4], производителя «Phytolab», Германия) и стандартный образец глюкофрангулина А (CAS [21133-53-9], производителя «Phytolab», Германия).

Раствор стандартного образца глюкофрангулина А получали растворением стандартного образца глюкофрангулина А в спирте этиловом 50%. Раствор стандартного образца сеннозида В получали растворением стандартного образца сеннозида В в метаноле [3, 4].

При проведении стресс-тестов растворов стандартных образцов сеннозида В и глюкофрангулина А использовали рекомендации, описанные в литературе [5-8].

Стрессовыми агентами являлись 0,1 М водный раствор HCl, 0,1 М водный раствор NaOH, 0,5 М водный раствор CuCl₂, 0,5 М водный раствор FeCl₃, а также раствор H₂O₂ 3%.

После смешивания 900 мкл раствора стандартного образца со 100 мкл стрессового агента оценивали устойчивость веществ, определяя методом ВЭЖХ их концентрацию через 1 и 24 часа, а также через 5 и 14 суток.

Исследуемые вещества считали стабильными, если в результате взаимодействия со стрессовыми агентами их разрушалось не более 15%.

Хроматографическое определение осуществляли с помощью жидкостного хромато-

графа Agilent 1100. При этом использовали обращенно-фазовую колонку Zorbax SB-C18 (4,6×250 мм, 5 мкм). Подвижная фаза А – вода высокоочищенная, которая доведена до значения pH 2 кислотой ортофосфорной, подвижная фаза В – ацетонитрил. Использовали хроматографические условия, представленные в таблице 1 [3, 4].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования была изучена стабильность раствора стандартного образца глюкофрангулина А в течение 2 недель под действием катионов железа и меди, а также в условиях кислотного, щелочного гидролиза и окисления. Результаты представлены на рисунке 1.

Таким образом, глюкофрангулин А стабилен в течение исследуемого периода при взаимодействии с 0,1М водным раствором HCl и 0,1М водным раствором NaOH, 0,5М водным раствором FeCl₃ и раствором H₂O₂ 3%. При взаимодействии с 0,5М водным раствором CuCl₂ наблюдается его значительная деструкция (более 80%). На рисунке 2 представлены хроматограммы раствора стандартного образца глюкофрангулина А до обработки 0,5М водным раствором CuCl₂ и после. Определено, что в результате взаимодействия с данным стрессовым агентом происходит деструкция глюкофрангулина А с образованием продукта деструкции.

Таблица 1

Table 1

Условия хроматографического анализа стандартного образца сеннозида В и глюкофрангулина А

Conditions for chromatographic analysis of a standard sample of sennoside B and glucofrangulin A

Стандартный образец Standard sample	Сеннозид В Sennoside B			Глюкофрангулин А Glucofrangulin A		
Профиль градиента подвижной фазы Mobile phase gradient profile	Время (мин.) Time (min)	Подвижная фаза А (%, об/об) Mobile phase A (%, v/v)	Подвижная фаза В (%, об/об) Mobile phase B (%, v/v)	Время (мин.) Time (min)	Подвижная фаза А (%, об/об) Mobile phase A (%, v/v)	Подвижная фаза В (%, об/об) Mobile phase B (%, v/v)
	0–10	90 → 80	10 → 20	0–10	80 → 60	20 → 40
	10–20	80 → 60	20 → 40	10–15	60 → 20	40 → 80
	20–30	60 → 35	40 → 65	15–20	20 → 0	80 → 100
Скорость подвижной фазы, мл/мин Mobile phase speed, ml/min	1			1		
Температура колонки, °С Column temperature, °С	40			50		
Длина волны детектирования, нм Detection wavelength, nm	360			435		

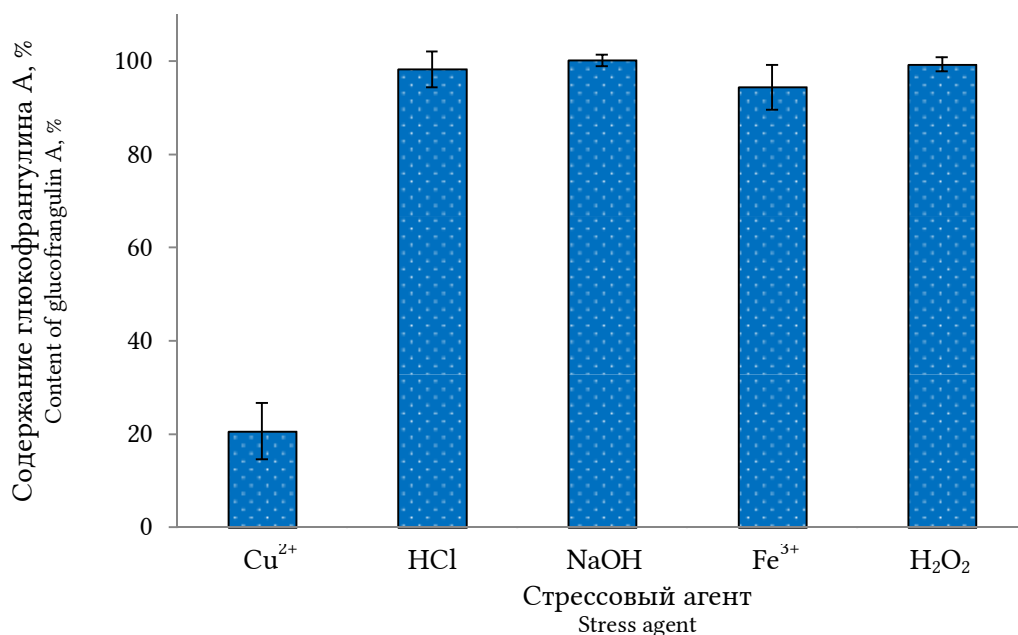


Рис. 1. Деструкция глюкофрангулина А (в % от исходного содержания) в растворе стандартного образца при взаимодействии со стрессовыми агентами через 14 дней (n = 3, P = 95%)

Fig. 1. Destruction of glucofrangulin A (in % of the initial content) in a standard sample solution when interacting with stress agents after 14 days (n = 3, P = 95%).

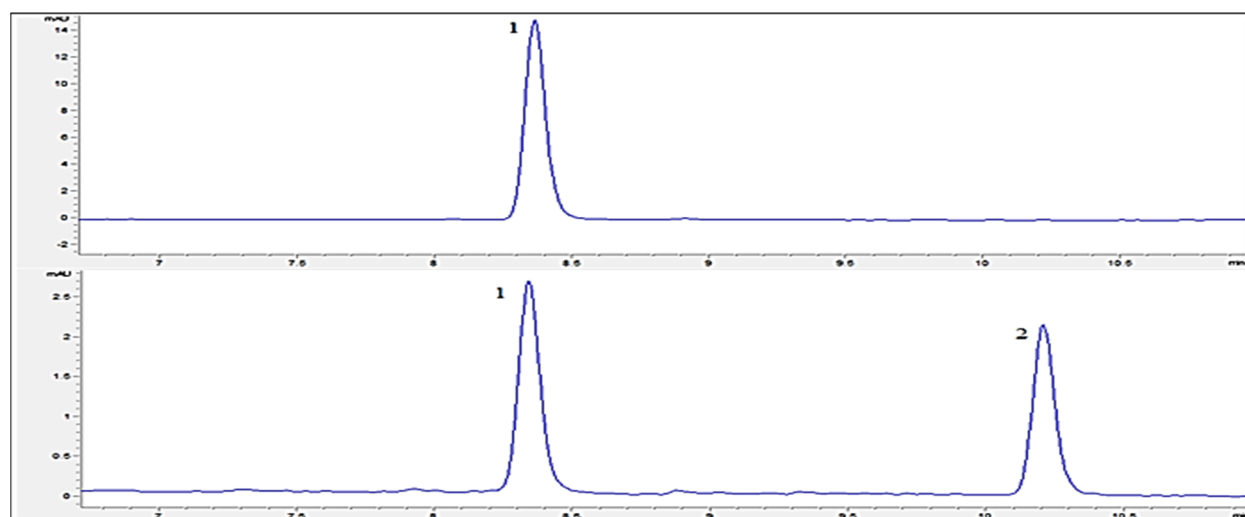


Рис. 2. Хроматограмма раствора стандартного образца глюкофрангулина А (сверху) и хроматограмма раствора стандартного образца глюкофрангулина А под действием раствора CuCl₂ через 14 дней (снизу).

Fig. 2. Chromatogram of a standard sample solution of glucofrangulin A (top) and a chromatogram of a solution of a standard sample of glucofrangulin A under the action of a solution of CuCl₂ after 14 days (below).

Примечание: 1 – глюкофрангулин А, 2 – продукт деструкции глюкофрангулина А.

Note: 1 – glucofrangulin A, 2 – degradation product of glucofrangulin A.

На втором этапе исследования изучена стабильность стандартного образца сеннозида В. Результаты приведены на рисунке 3.

Установлено, что в течение 2 недель сеннозид В стабилен при взаимодействии с раствором H₂O₂ 3% и 0,5M водным раствором CuCl₂. Под действием 0,5M водного раствора FeCl₃ наблюдается его полное разрушение. При взаимодействии сеннозида В с 0,1M водным раствором HCl

на хроматограммах также появляются хроматографические пики продуктов его деструкции, что представлено на рисунке 4.

В результате проведенных исследований по изучению стабильности растворов стандартных образцов глюкофрангулина А и сеннозида В установлены основные физико-химические факторы, которые вызывают их деструкцию. Определено, что стандартный образец глю-

кофрангулина А наиболее устойчив в кислой и щелочной среде, а также под действием раствора H_2O_2 3% и 0,5М раствора FeCl_3 . Стандартный образец сеннозида В устойчив при взаимодействии с 0,5М раствором CuCl_2 и раствором H_2O_2 3%.

Результаты настоящего исследования могут быть учтены при валидации хроматографических методик анализа для определения специфичности, а также при оценке примесей опре-

деляемых веществ. Помимо этого, полученные результаты могут использоваться при фармацевтической разработке новых лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, для получения растительных экстрактов с целью наибольшего сохранения действующих веществ и обоснования их упаковки, условий хранения и сроков годности.

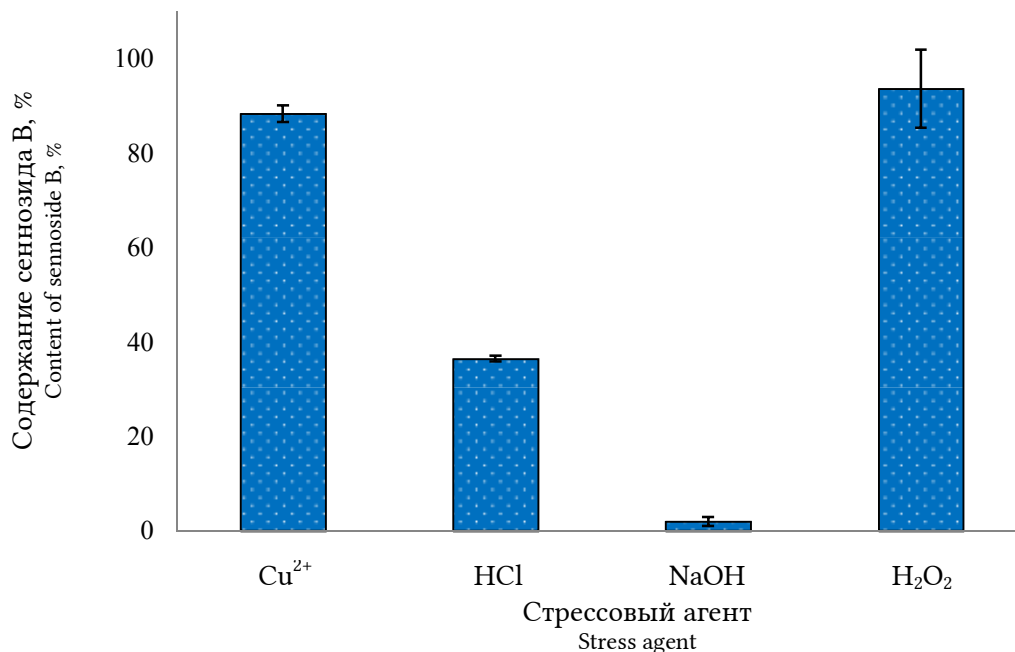


Рис. 3. Деструкция сеннозида В (в % от исходного содержания) в растворе стандартного образца при взаимодействии с изучаемыми стрессовыми агентами через 14 дней ($n = 3$, $P = 95\%$)

Fig. 3. Destruction of sennoside B (in % of the initial content) in a standard sample solution during interaction with the studied stress agents after 14 days ($n = 3$, $P = 95\%$)

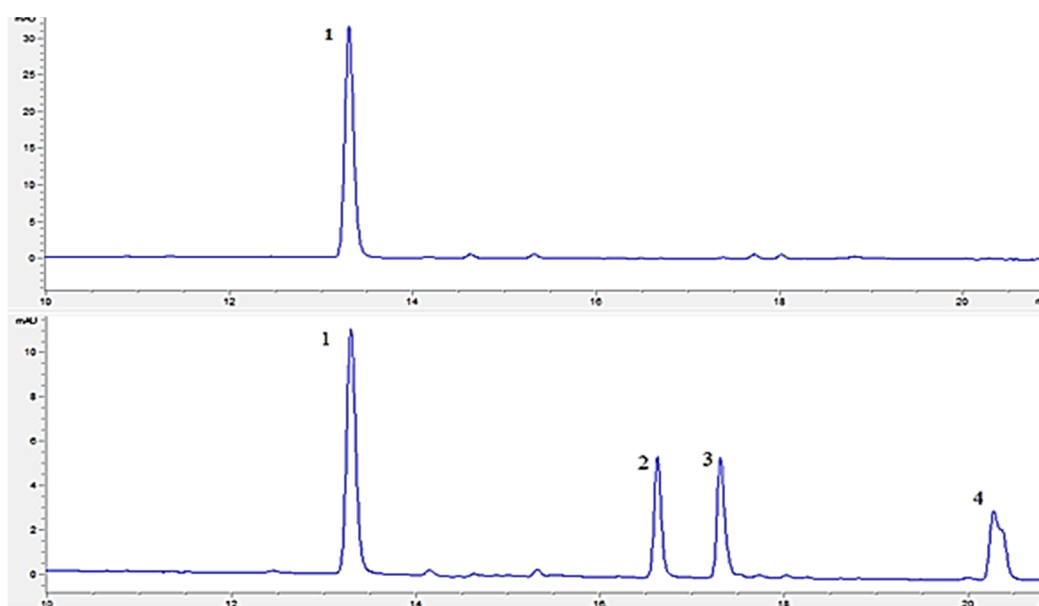


Рис. 4. Хроматограмма раствора стандартного образца сеннозида В (сверху) и хроматограмма раствора стандартного образца сеннозида В под действием 0,1М водного раствора HCl через 14 дней (снизу).

Fig. 4. Chromatogram of a standard sample solution of sennoside B (top) and a chromatogram of a solution of a standard sample of sennoside B under the influence of 0.1M aqueous HCl after 14 days (below).

Примечание: 1 – сеннозид В, 2-4 – продукты деструкции сеннозида В.

Note: 1 – sennoside B, 2-4 – degradation products of sennoside B.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Авторы заявляют об отсутствии финансирования.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Blessy M., Patel R.D., Prajapati P.N., Agrawal Y.K. Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs – A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 2014;4(3):159–165. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.09.003.
2. 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;4(25):118–127 [Romanyuk A.A., Moiseyev 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;4(25):118–127 (in Russ.)]. DOI: 10.21626/vestnik/2022-4/15. EDN: KQYPVU.
3. Романюк А.А., Моисеев Д.В. Разработка и валидация методики количественного определения антраценпроизводных жостера слабительного плодов методом ВЭЖХ. *Вестник фармации*. 2023;1(99):33–42 [Romanyuk A.A., Moiseyev D.V. Development and validation of a method for the quantitative determination of anthracene derivative Common Buckthorn fruit by HPLC method. *Vestnik farmatsii*. 2023;1(99):33–42 (in Russ.)]. DOI: 10.52540/2074-9457.2023.1.33. EDN: AHSQPQ.
4. Романюк А.А., Моисеев Д.В. Определение оптимальных условий экстракции антраценпроизводных сенны листьев, разработка и валидация методики их количественного определения методом ВЭЖХ. *Вестник фармации*. 2022;2(96):55–64 [Romanyuk A.A., Moiseyev D.V. Determination of optimum conditions for the extraction of senna leaves anthracene derivatives, development and validation of the method for their assay by HPLC. *Vestnik farmatsii*. 2022;2(96):55–64 (in Russ.)]. DOI: 10.52540/2074-9457.2022.2.55. EDN: CIJDPMэ
5. Klick S., Muijselaar P.G., Waterval J.C., Eichinger T., Korn C., Gerding T.K., Debets A.J., Vandingenen J., et al. Toward a generic approach for stress testing of drug substances and drug products. *Pharmaceutical Technology*. 2005;29(2):48–66.
6. Baertschi S.W., Alsante K.M., Reed R.A. *Pharmaceutical stress testing. Predicting drug degradation*. Boca Raton: CRC Press, 2011. 624 p.
7. Carstensen J.T., Rhodes C. *Drug stability. Principles and Practice*. Boca Raton: CRC Press, 2000. 792 p.
8. Moiseev D. Stress stability of drug substances from herbal origin is a new way of stability investigations of medicinal preparations. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2016;5(6):21–23.

Поступила в редакцию 08.06.2023

Подписана в печать 25.11.2023

Для цитирования: Романюк А.А., Моисеев Д.В. Стресс-тесты антраценпроизводных растительного происхождения. *Человек и его здоровье*. 2023;26(3):83–88. DOI: 10.21626/vestnik/2023-3/10. EDN: VBMFGN.

STRESS TESTS OF ANTHRACENE DERIVATIVES OF PLANT ORIGIN

© Romanyuk A.A.¹, Moiseev D.V.²

¹ Vitebsk State Order of Peoples' Friendship Medical University (VSMU)

276 Frunze Ave., Vitebsk, Vitebsk region, 210009, Republic of Belarus

² LLC «Company «DEKO»

3, bldg.4 Yeniseiskaya Str., Moscow, 129344, Russian Federation

Objective: to study the stability of solutions of standard samples of sennoside B and glucofrangulin A by stress tests using high performance liquid chromatography (HPLC).

Materials and methods. The objects of the study were solutions of standard samples of sennoside B, as well as glucofrangulin A. Stress agents were 0.5M aqueous solution of copper (II) chloride (CuCl₂), 0.5M aqueous solution of iron (III) chloride (FeCl₃), 0.1M aqueous solution of hydrochloric acid (HCl), as well as 0.1M aqueous solution of sodium hydroxide (NaOH) and a solution of hydrogen peroxide (H₂O₂) 3%. The study was carried out using an Agilent 1100 liquid chromatograph. For this purpose, a Zorbax SB-C18 reverse-phase column (4.6×250 mm, 5 μm) was used. Elution of the mobile phase (acetonitrile and highly purified water, which was adjusted to pH 2 with phosphoric acid) was carried out in a gradient mode. Detection was carried out at wavelengths of 360 nm and 435 nm.

Results. It was found that a solution of a standard sample of glucofrangulin A is stable for 14 days under the influence of 0.1M aqueous solution of HCl and 0.1M aqueous solution of NaOH, as well as 0.5M aqueous solution of FeCl₃ and 3% H₂O₂ solution. When a solution of a standard sample of glucofrangulin A interacts with a 0.5M aqueous solution of CuCl₂, its destruction is observed. When a standard sample of sennoside B reacts with a 3% H₂O₂ solution and a 0.5M aqueous CuCl₂ solution, it remains stable. When interacting with other stress agents, its destruction occurs.

Conclusion. The results obtained on the stability of solutions of standard samples of anthracene derivatives determine the main physico-chemical factors that cause their destruction, which can be taken into account when validating analytical methods, justifying the conditions of storage, packaging and processing of medicinal plant materials that contain anthracene derivatives.

Keywords: anthracene derivatives; high performance liquid chromatography; glucofrangulin A; sennoside B; stress tests.

Romanyuk Anna A. – Master of Pharmaceutical Sciences, 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: annark-dy@gmail.com (corresponding author).

Moiseev Dmitry V. – Dr. Sci. (Pharm.), Associate Professor, deputy general director for quality, LLC «Company «DEKO», Moscow, 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 08.06.2023

Accepted 25.11.2023

For citation: Romanyuk A.A., Moiseev D.V. Stress tests of anthracene derivatives of plant origin. *Humans and their health*. 2023;26(3):83–88. DOI: 10.21626/vestnik/2023-3/10. EDN: VBMFGN.