

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АНТРАЦЕНПРОИЗВОДНЫХ В ЛИСТЬЯХ АЛОЭ ДРЕВОВИДНОГО (*ALOE ARBORESCENS* L.)© Глушченко С.Н.¹, Куркин В.А.², Шмыгарева А.А.¹, Саньков А.Н.¹¹Оренбургский государственный медицинский университет, Россия, 460000, Оренбург, ул. Советская, 6²Самарский государственный медицинский университет, Россия, 443099, Самара, ул. Чапаевская, 89*Резюме*

Цель. Разработка и проведение методики количественного определения антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) с использованием УФ-спектрофотометрии.

Методика. Количественный анализ листьев алоэ древовидного проводился по сумме антраценпроизводных (в пересчете на барбалоин). Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра Unicо 2800 в диапазоне длин волн 190-700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм, ультразвуковая ванна Вилитек VBS с частотой 40 кГц. Исследовали УФ-спектры водно-спиртовых и щелочно-аммиачных растворов листьев алоэ древовидного. Объектом настоящего исследования служили свежие образцы листьев алоэ древовидного, культивированные на кафедре управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии Оренбургского государственного медицинского университета (2019 г.). Так как методика количественного определения в листьях и побегах алоэ древовидного в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания отсутствует, то была использована методика, определяющая антраценпроизводные непосредственно в испытуемом растворе в пересчете на барбалоин без гидролиза и окисления.

Результаты. С использованием разработанной методики количественного анализа было определено содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в свежих листьях алоэ древовидного, которое варьирует от 3-5%.

Заключение. При проведении количественного анализа свежих листьев алоэ-древовидного было установлено процентное содержание действующего вещества алоэ древовидного – барбалоина.

Ключевые слова: алоэ древовидное, листья, антраценпроизводные, барбалоин, количественное определение, УФ-спектрофотометрия

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTHRACEN DERIVATIVES IN ALOE ARBORESCENS LEAVESGlushchenko S.N.¹, Kurkin V.A.², Shmygareva A.A.¹, Sankov A.N.¹¹Orenburg State Medical University, Soviet St., 6, 460000, Orenburg, Russia²Samara State Medical University, Chapaevskaya St., 89., 443099, Samara, Russia*Abstract*

Objective. Development and implementation of methods for the quantitative determination of anthracen derivatives in *Aloe arborescens* leaves using UV spectrophotometry.

Methods. Quantitative determination of total anthracen derivatives in the leaves of *Aloe arborescens* was carried out calculated on barbaloin. The electronic spectra were recorded using a Unicо 2800 spectrophotometer in the wavelength range of 190-700 nm in cuvettes with a layer thickness of 10 mm, ultrasonic bath Vilitек VBS with a frequency of 40 kHz. UV spectra of aqueous-alcoholic and alkaline-ammonia solutions of aloe arborescens leaves were studied. The object of this study were fresh samples of *Aloe arborescens* leaves cultivated at the department of management and economics of pharmacy, pharmaceutical technology and pharmacognosy of the Orenburg State Medical University (2019). Since the quantitative determination method in the leaves and shoots of aloe tree is absent in the XIV edition of State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the method to define anthracenedione directly in the test solution was applied calculated on barbaloin without hydrolysis and oxidation.

Results. Using the developed method of quantitative analysis, the amount of anthracen derivatives calculated on barbaloin in fresh leaves of *Aloe arborescens*, which varies from 3-5%, was determined.

Conclusions. When conducting a quantitative analysis of fresh leaves of *Aloe arborescens*, the percentage of the active substance of *Aloe arborescens* – barbaloin was found.

Keywords: *Aloe arborescens*, leaves, anthracen derivatives, barbaloin, quantitative determination, UV spectrophotometry

Введение

Листья алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) широко используются в медицине в качестве биостимулирующего, регенерирующего, общетонизирующего и адаптогенного лекарственного средства [4, 6]. Алоэ древовидное используется как в официальной, так и в народной медицине. Самый распространенный лекарственный препарат в официальной медицине – сок алоэ. Сок алоэ обладает бактерицидным и бактериостатическим действием в отношении многих групп микробов: стрептококков, стафилококков, дифтерийной, брюшнотифозной и дизентерийной палочек. Алоэ обладает мощными ранозаживляющими свойствами, выводит радионуклиды, повышает иммунореактивные способности и защитные силы организма в борьбе с инфекционными заболеваниями, а также является великолепным биостимулятором, способствуя оздоровлению организма в целом. В народной медицине листья алоэ и сок из них используют наружно как ранозаживляющее средство. В виде орошений и примочек сок из свежих листьев применяют для лечения гнойных ран, трофических язв, ожогов, нарывов, фурункулов.

Однако до сих пор не решены проблемы стандартизации сырья алоэ древовидного. Так, в Государственной фармакопее России XIV издания, фармакопейная статья на листья алоэ древовидного отсутствует [2, 3]. В зарубежных фармакопеях таких как: Британская фармакопея, Японская фармакопея, фармакопея США, также отсутствует статья на листья алоэ древовидного, так как наиболее распространенным лекарственным растением рода алоэ является алоэ-вера. В этих статьях описывается сложная многостадийная методика с использованием хлорида железа и метанола, что значительно затрудняет процесс количественного определения. Исходя из этого, актуальным является вопрос о разработке методики количественного анализа данного лекарственного растительного сырья [1, 5].

Целью работы являлось разработка методики количественного определения и проведение количественного анализа листьев алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) с использованием УФ-спектрофотометрии.

Методика

Объектами исследования служили свежие образцы листьев алоэ древовидного. Образцы листьев алоэ-древовидного культивировались на кафедре управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии Оренбургского государственного медицинского университета (2019). Электронные спектры измерялись на УФ-спектрофотометре UNICO 2800 в диапазоне длин волн 190-700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм, ультразвуковая ванна Вилитек VBS с частотой 40 кГц.

Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в колбу со шлифом вместимостью 250,0 мл, прибавляют 100 мл 60% спирта этилового. Колбу закрывали пробкой, взвешивали с точностью до $\pm 0,01$, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин., либо 90 мин. Затем в течение 15 мин., проводили экстракцию при воздействии ультразвука с частотой 40 кГц, фильтр «красная лента», после чего взвешивали и восполняли недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр («красная» полоса). Испытуемый раствор готовили следующим образом: 0,5 мл полученного извлечения помещали в мерную колбу вместимостью 25,0 мл и доводили объем раствора до метки щелочно-аммиачным раствором, приготовленным в соответствии с требованиями Государственной фармакопее РФ XIV издания. После охлаждения измеряли оптическую плотность на спектрофотометре с толщиной кюветы 10 мм при длине волны 396 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Примечание 1: Приготовление раствора рабочего стандартного образца (PCO) барбалоина. Около 0,02 (точная навеска) барбалоина помещали в мерную колбу вместимостью 50,0 мл, растворяли в 30 мл 60% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводили объем раствора 60% этиловым спиртом до метки (раствор А барбалоина). 1 мл раствора А барбалоина помещали в мерную колбу на 25,0 мл и доводили объем раствора до метки щелочно-аммиачным раствором (испытуемый раствор Б). Раствор Б помещали в колбу емкостью 50,0 мл и нагревали в течение 15 мин на кипящей водяной бане с обратным холодильником. После охлаждения измеряли оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре с толщиной кюветы 10 мм при длине волны 396 нм. В качестве раствора сравнения использовали воду очищенную.

Содержание суммы антраценпроизводных (X) в пересчете на барбалоин в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{D \times m_0 \times 25 \times 25 \times 1 \times 100}{D_0 \times m \times 2 \times 50 \times 25}$$

, где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D₀ – оптическая плотность раствора PCO барбалоина; m – масса навески сока, г; m₀ – масса PCO барбалоина, г.

При отсутствии стандартного образца барбалоина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 300:

$$X = \frac{D \times 100 \times 25 \times 100}{m \times 300 \times (100 - B)}, \text{ где}$$

D – оптическая плотность;

m – масса сырья, в г;

B – влажность (%). 300 – удельный показатель поглощения ($E_{1cm}^{1\%}$) щелочно-аммиачного раствора PCO барбалоина А при 396 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование УФ-спектров показало, что четкий максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора водно-спиртового извлечения из листьев алоэ древовидного обнаружился в длинноволновой области спектра при 396±2 нм только в дифференциальном варианте (рис. 1), тогда как в случае прямой спектрофотометрии наблюдается в данной области лишь «плечо».

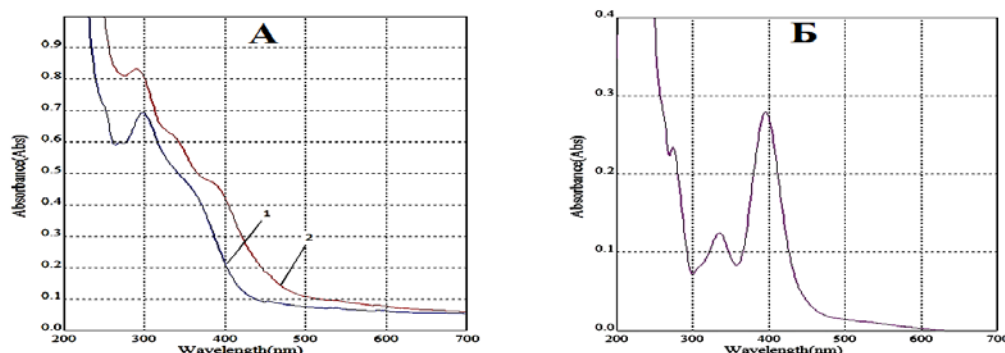


Рис. 1. А – УФ-спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора (2) водно-спиртового извлечения из листьев алоэ древовидного; Б – УФ-спектр водно-спиртового извлечения из листьев алоэ древовидного (дифференциальный вариант)

В длинноволновой области электронного спектра щелочно-аммиачного раствора барбалоина наблюдался четкий максимум поглощения при 396±2 нм как в случае прямой спектрофотометрии, так и в дифференциальной варианте (рис. 3).

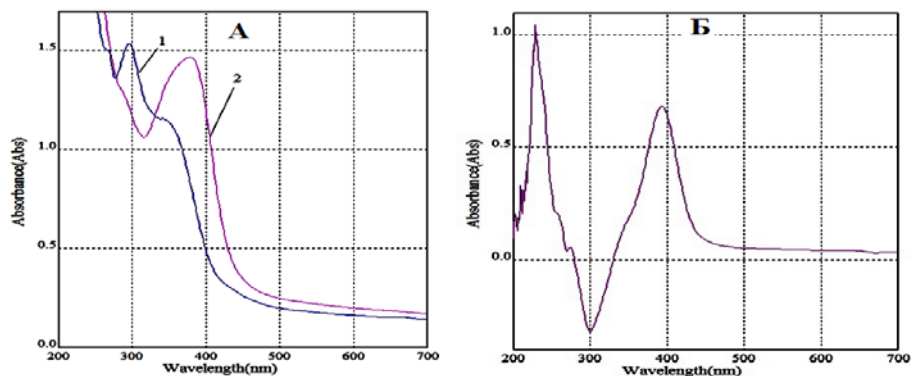


Рис. 3. А – УФ-спектры исходного раствора (1) и щелочно-аммиачного раствора РСО барбалоина (2); Б – Дифференциальный УФ-спектр раствора РСО барбалоина

Следовательно, в качестве аналитической длины волны может быть использовано значение 396 нм (дифференциальная спектрофотометрия), а стандартным образцом может служить доминирующее антраценпроизводное – барбалоин, причем в случае отсутствия стандарта в расчетной формуле может быть использовано теоретическое значение удельного показателя поглощения ($E_{1\%}^{1\text{см}}$) – 300. Экстракция проводилась при различных соотношениях «сырье-экстрагент», а также варьировалось время экстракции на водяной бане (табл.1).

Таблица 1. Влияние различных факторов на полноту извлечения антраценпроизводных из листьев алоэ древовидного

Концентрация этилового спирта, %	Соотношение «сырье: экстрагент»	Время экстракции, мин.	Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье, %
60%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	4,60±0,03
60%	1:10	60 мин. +15 мин. воздействия ультразвука	2,76±0,03
60%	1:10	90 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	3,60±0,03
40%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	4,52±0,03
50%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	2,66±0,03
70%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	3,37±0,03
80%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	3,78±0,03
96%	1:10	30 мин. + 15 мин. воздействия ультразвука	3,84±0,03

При модификации методики количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного выявлены оптимальные условия экстракции антраценпроизводных: экстрагент – 60% спирт этиловый; соотношение «сырье – экстрагент» – 1:10; время экстракции – 30 мин. на водяной бане при температуре 80-90 °С, 15 мин. экстракции при воздействии ультразвука с частотой 40 кГц (рис. Б). Для контроля было проведено определение суммы антраценпроизводных ранее предложенным методом экстракции в течение 30 мин. на водяной бане [7, 8].

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного представлены в табл. 2.

Таблица 2. Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного

f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
10	4,60	0,0707	95	2,25	$\pm 0,157$	$\pm 3,4$

Валидационные характеристики методики спектрофотометрического определения антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного были определены по следующим показателям: линейности, прецизионности, правильности, специфичности, что позволило нам доказать пригодность разработанной методики количественного определения.

Заключение

При проведении количественного анализа свежих листьев алоэ-древовидного было установлено процентное содержание действующего вещества алоэ древовидного – барбалоина, что составило 4,6%. Следовательно, в качестве нижнего предела содержания антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в листьях алоэ древовидного следует рекомендовать значение не ниже 4%. Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что ошибка единичного определения содержания антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в листьях алоэ древовидного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,4\%$.

Литература (references)

1. Алесковский В.Б., Бардин В.В., Булатов М.И. Физико-химические методы анализа. Практическое руководство Л.: Химия, 1988. – 376 с. [Aleskovsky, V.B. Physico-chemical methods of analysis. Practical Guide V.B. Aleskovsky, V.V. Bardin, M.I. Bulatov. – L.: Chemistry, 1988. – 376 p. (in Russian)]
2. Государственная фармакопея Российской Федерации: Вып.3. – МЗ РФ. 14-е изд. – М.: Медицина, 2018. – 7019 с. [State Pharmacopoeia of the Russian Federation: Issue 3. - Ministry of Health of the Russian Federation. 14th ed. – M.: Medicine, 2018. – 7019 p. (in Russian)]
3. Зилфикаров И.Н., Оленников Д.Н., Ибрагимов В.А., Челомбитко В.А., Вандышев В.В. Современные аспекты фармакогнозического и биохимического изучения суккулентного сырья алоэ древовидного и каллизи идушистой. МО, Щелково: Издатель Мархотин П.Ю., 2013. – 192 с. [Zilfikarov, I.N. Modern aspects of pharmacognostic and biochemical study of succulent raw materials of aloe arborescens and fragrant callisia / I.N. Zilfikarov, D.N. Olennikov, T.A. Ibragimov, V.A. Chelombitko, V.V. Vandyshev. – Moscow Region, Schelkovo: Publisher Markhotin P.Yu., 2013. – 192 p. (in Russian)]
4. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). – 3-изд., перераб. и доп. / В.А. Куркин. – Самара: «Офорт»; ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016. – 1279 с. [Kurkin, V.A. Pharmacognosy: a textbook for students of pharmaceutical universities (faculties). – 3rd ed., Revised. and additional / V.A. Kurkin. – Samara: "Etching"; FSBEI IN Samara State Medical University, Ministry of Health of Russia, 2016. – 1279 p. (in Russian)]
5. Музычкина Р.А. Природные антрахиноны. Биологические свойства и физико-химические характеристики. / Под ред. Г.А. Толстикова. – М.: ФАЗИС, 1998. – 864 с. [Muzychkina, R.A. Natural Anthraquinones. Biological properties and physicochemical characteristics / Ed. By G.A. Tolstikov. – Moscow: PHASIS, 1998. – 864 p. (in Russian)]
6. Moffat Anthony C., M David Osselton, Brian Widdop. Clarke's analysis of drugs and poisons // L.: LEGO S.p.A., 2011. – 855 p.
7. Urch D.L. Aloe Vera – Nature's Gift. Aloe Vera in Veterinary Practice // Blackdow Publications. – 1999. – 123 p.
8. Zwaving J.N. Recent developments in the analysis of anthraquinone derivatives // Pharmacology – 1980. – V.20(1) – P. 65-75.

Информация об авторах

Глуценко Светлана Николаевна – соискатель кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: svetlana94g@gmail.com

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, почетный профессор СамГМУ, заслуженный работник высшей школы РФ, почетный выпускник СамГМУ, заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: v.a.kurkin@samsmu.ru

Шмыгарева Анна Анатольевна – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: a.shmygareva@mail.ru

Саньков Анатолий Николаевич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: a.sankov@mail.ru