

© Коллектив авторов, 2013

Д. Н. Оленников<sup>1</sup>, И. Н. Зилфикаров<sup>2</sup>, Т. А. Пензина<sup>3</sup>

## ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОКОЛОНОЧНОЙ ВЭЖХ ДЛЯ АНАЛИЗА АЛОЭНИНА В СЫРЬЕ И ПРЕПАРАТАХ АЛОЭ ДРЕВОВИДНОГО

<sup>1</sup> ФГБУН Институт общей и экспериментальной биологии СО РАН, Улан-Удэ, Россия;

<sup>2</sup> ГНУ ВИЛАР Россельхозакадемии, Москва, Россия;

<sup>3</sup> ФГБУН Сибирский институт физиологии и биохимии растений СО РАН, Иркутск, Россия

Разработана методика количественного анализа алоэнина методом микроколоночной обращенно-фазовой ВЭЖХ с УФ-детектированием (303 нм) с применением колонки ProntoSIL-120-5-C18 (2 × 75 мм) и градиентной элюентной системы 4,1 М LiClO<sub>4</sub>/0,1 М HClO<sub>4</sub>-ацетонитрил. Валидационный анализ показал, что методика характеризуется удовлетворительными метрологическими показателями. Предел детектирования (LOD), предел количественного определения (LOQ) алоэнина составили 35 и 105 мкг/мл соответственно. Показатели точности для уровней содержания алоэнина 80 – 120 % не превышали 98,16 – 101,34 %. Методика была применена для анализа листьев *Aloe arborescens* Mill. и некоторых препаратов (алоэ экстракт сухой, “Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения”, “Алоэ сок”, таблетки с экстрактом алоэ).

**Ключевые слова:** алоэнин, *Aloe arborescens* Mill., микроколоночная обращенно-фазовая ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Алоэ древовидное (лат. *Aloe arborescens* Mill.) — суккулентный вид семейства Асфоделовых (Asphodelaceae), препараты которого обладают широким спектром биологической активности и применяются в отечественной медицинской практике [1]. В результате химических исследований в сырье *A. arborescens* выявлено присутствие фенольных соединений (антрахинонов, пиранов, хромонов, кумаринов, фенольных кислот) [2 – 4], полисахаридов [5 – 7], гликопротеидов [8], лектинов [9], стероидов, жирных кислот [10], каротиноидов [11], эфирного масла [12], органических кислот [13], аминокислот, полиаминов [14] и лактата магния [15].

Согласно имеющейся в настоящее время нормативной документации стандартизация сырья и препаратов *A. arborescens* в России проводится по содержанию антраценпроизводных с применением метода окислительного гидролиза гликозидов алоэ-эмолина до агликона с последующей жидкофазной экстракцией хлороформом и спектрофотометрическим измерением [16]. Данная методика анализа характеризуется трудоемкостью и длительностью, что зачастую ограничивает ее применение в фармакопейной практике.

Ранее показано, что доминирующим компонентом комплекса фенольных соединений листьев *A. arborescens* является пиран алоэнин [17], представляющий собой 4-метокси-6-(2-О-β-D-глюкопиранозил-4-гидрокси-6-метилфенил)-2-пиран (рис. 1). Для анализа алоэнина были предложены методики с использованием методов УФ-спектрофотометрии [17], ВЭТСХ-денситометрии [18], ВЭЖХ-УФ [19, 20], ВЭЖХ-МС [21], ГХ-МС [22] и капиллярной электрокинетической хроматографии [23].

В последнее время все большим интересом пользуется метод микроколоночной ВЭЖХ (МК-ВЭЖХ), к числу преимуществ которого относятся экспрессность, экономичность и удовлетворительные метрологические показатели, в связи с чем нами рассмотрена возможность разработки простого и эффективного метода количественного определения алоэнина в сырье и препаратах *A. arborescens* с применением обращенно-фазовой МК-ВЭЖХ с УФ-детектированием.

### Экспериментальная часть

**Объекты исследования.** Свежие листья *A. arborescens* собраны в оранжерее ФГБУН Сибирского института физиологии и биохимии растений СО РАН (Иркутск), после чего их разрезали на кусочки и лиофильно высушивали. Биостимуляцию листьев *A. arborescens* проводили, как описано ранее [4]. Препараты — алоэ экстракт сухой, “Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения”, “Алоэ сок” и таблетки с экстрактом алоэ — были предоставлены ЗАО “Вифитех” (Московская обл.).

**Общие экспериментальные условия.** В работе использовали ацетонитрил (НПК Криохром, Россия; сорт 0), LiClO<sub>4</sub>, HClO<sub>4</sub>, вода для ВЭЖХ Chromasolv (Sigma, Швейцария); остальные реагенты имели чистоту ч.д.а. Стандартный образец алоэнина был получен, как описано ранее [17], и имел чистоту ≥ 98 %. Достоверные образцы 8-С-глюкозил-7-О-метил-(S)-алоэзола, алоэрезинов А и Е, изоалоэрезина D, алоинов А и В, 2'-О-ферулоилалоэзина и алоэ-эмолина были выделены ранее из листьев *A. arborescens* [4].

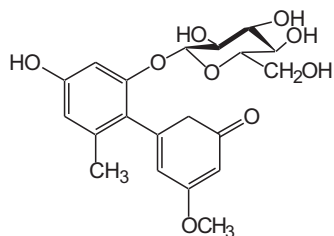


Рис. 1. Структурная формула алоэнина.

**Приготовление рабочих растворов.** 0,5 г (точная навеска) высушенных листьев *A. arborescens* переносили в колбу со шлифом, приливали 25 мл 80 % этанола, присоединяли обратный холодильник и нагревали на кипящей водяной бане в течение 60 мин. После охлаждения извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию повторяли еще один раз в аналогичных условиях. Объем объединенного извлечения доводили до метки 80 % этанолом. Извлечение дополнительно фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм) и далее использовали для анализа. Пробоподготовку для листьев алоэ свежих, экстракта алоэ сухого и таблеток с экстрактом алоэ проводили в аналогичных условиях с навесками 2,0, 0,25 и 1,0 г соответственно. Для анализа препаратов “Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения” и “Алоэ сок” их предварительно фильтровали через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм).

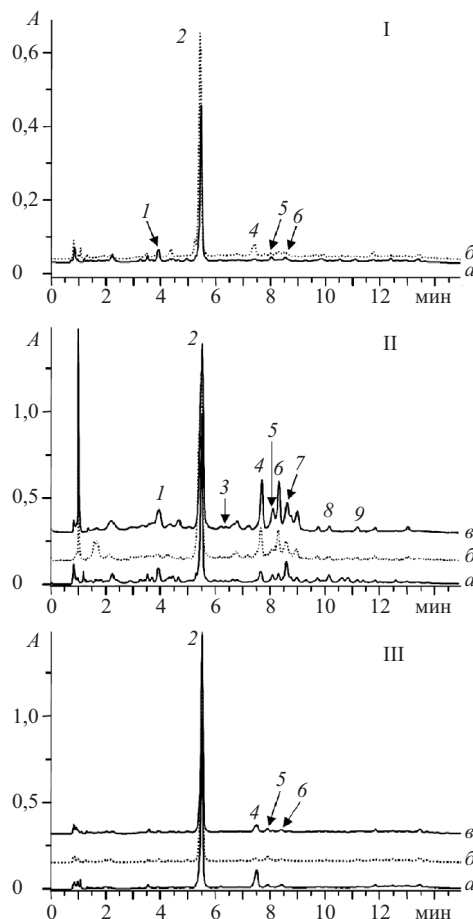


Рис. 2. Хроматограммы (ВЭЖХ) сырья и препаратов *A. arborescens*. I — спиртовые извлечения из листьев *A. arborescens* до (а) и после биостимуляции (б); II — “Алоэ экстракт жидкий для инъекций” (а), таблетки алоэ (б), экстракт алоэ сухой (в); III — партии препарата “Сок алоэ” (а-в). Цифрами указано положение соединений: 8-С-глюкозил-7-О-метил-(S)-алоэзол (1), алоэнин (2), алоэрезин А (3), алоин В (4), изоалоэрезин D (5), алоин А (6), 2'-О-ферулоилалоэзин (7), алоэрезин Е (8), алоэ-эмодин (9).

Таблица 1  
Хроматографические и спектральные параметры алоэнина

$t_R$ , мин	УФ-спектр, $\lambda_{max}$ , нм	Спектральные отношения ( $S_7/S_{210}$ )						
		220	230	240	250	260	280	300
$5,52 \pm 0,06$	208, 303	0,477	0,333	0,223	0,165	0,155	0,231	0,268

Таблица 2  
Валидационные параметры разработанной методики

Показатель	Значение
Уравнение регрессии	$Y = 0,0231X + 0,1277^*$
Коэффициент детерминации ( $r^2$ )	0,9993
Стандартное отклонение ( $S_{YX}$ )	$24,25 \cdot 10^{-2}$
Предел детектирования (LOD), мкг/мл	35
Предел количественного определения (LOQ), мкг/мл	105
Рабочий диапазон, мкг/мл	125 – 1500
Воспроизводимость, % ( $n = 15$ )	1,22
Вариабельность “день-в-день”, % ( $n = 6$ )	0,73
Вариабельность “день-через-день”, % ( $n = 9$ )	0,89
Стабильность, % ( $n = 7$ )	0,93

\*  $X$  — концентрация, мкг/мл;  $Y$  — площадь пика.

**Стандартный раствор алоэнина (1500 мкг/мл).** Точную навеску (15 мг) предварительно высушенного алоэнина переносили в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в 95 % этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

**Условия хроматографического разделения.** Анализ проводили на жидкостном микроколоночном хро-

Таблица 3  
Результаты определения точности разработанной методики

Показатель	Уровень				
	80 %	90 %	100 %	110 %	120 %
Алоэнина в препарате, мг	8,59	8,59	8,59	8,59	8,59
Введено алоэнина, мг	6,87	7,73	8,59	9,45	10,31
Должно быть алоэнина, мг	15,46	16,32	17,18	18,04	18,90
Найдено алоэнина, мг	15,20	16,02	17,41	17,99	18,63
Точность, %	98,32	98,16	101,34	99,72	98,57

матографе Милихром А-02 (ЗАО ЭкоНова, Россия), оснащенный двухкомпонентным градиентным насосом, автосемплером, спектрофотометрическим детектором и термостатируемой стальной колонкой (2 × 75 мм), упакованной сорбентом ProntoSIL-120-5-C18 (Metrohm AG, Швейцария; Ø 5 мкм). В качестве подвижной фазы использовали градиентную систему (4,1 М LiClO<sub>4</sub> в 0,1 М HClO<sub>4</sub>):H<sub>2</sub>O 5:95 (элюент А) — ацетонитрил (элюент В); режим элюирования 12 – 23 % В (0 – 4,5 мин), 23 – 28 % В (4,5 – 9 мин), 28 – 46 % В (9 – 15 мин). Температура колонки 45 °С, скорость подвижной фазы 200 мкл/мин, длина волны детектора 303 нм. Объем инжектируемой пробы — 1 мкл (алоэнин), 2 мкл (“Алоэ сок”, спиртовое извлечение из листьев *A. arborescens* и алоэ экстракта сухого) и 4 мкл (“Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения”).

**Валидационный анализ.** Для построения градуировочного графика серию разведений алоэнина (32 – 1500 мкг/мл) хроматографировали в описанных выше условиях трижды для каждой концентрации вещества. По полученным данным проводили построение градуировочного графика в координатах “концентрация, мкг/мл, — площадь пика” и определяли вид уравнения линейной регрессии ( $Y = aX + b$ ), значения коэффициента детерминации ( $r^2$ ) и стандартного отклонения ( $S_{YX}$ ) с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.2 (Alentum Software, Inc., США). Предел детектирования (LOD) и предел количественного определения (LOQ) определяли по уравнениям:  $LOD = (3,3S_{YX})/a$  и  $LOQ = (10S_{YX})/a$ , где  $S_{YX}$  — стандартное отклонение,  $a$  — коэффициент при  $X$  в уравнении линейной регрессии. Для определения воспроизводимости серию стандартных растворов алоэнина (500 – 1000 мкг/мл) анализировали в 3-кратной повторности. Вариабельность методики определяли в 2 вариантах: “день-в-день” (intra-day) и “день-через-день” (inter-day). В первом варианте стандартный раствор алоэнина (500 мкг/мл) анализировали в течение 1 дня 6-кратно, во втором варианте анализа стан-

дартный раствор алоэнина (500 мкг/мл) анализировали в течение 3 последовательных дней 3-кратно. Стабильность методики определяли на 1 образце препарата “Алоэ сок”, анализируя его через 2, 4, 8, 12, 24 и 72 ч после первого анализа. Показатель точности методики выявляли на образце экстракта алоэ сухого с введением в навеску препарата чистого алоэнина в количестве 80 – 120 % от исходного содержания, с последующими экстракцией и анализом.

В качестве показателя эффективности методики при определении вариабельности, воспроизводимости, стабильности и точности использовали величину относительного стандартного отклонения  $RSD$ :

$$RSD = \frac{100S_{x_i}}{\bar{x}}$$

где  $S_{x_i}$  — стандартное отклонение  $x_i$ ,  $\bar{x}$  — среднее значение  $x$ .

### Результаты и их обсуждение

Для анализа фенольных соединений *A. arborescens* были подобраны хроматографические условия с применением градиентного режима элюирования и УФ-детектирования при длине волны 303 нм, позволяющие добиться оптимального разделения алоэнина от компонентов с близкими временами выхода (8-С-глюкозил-7-О-метил-(S)-алоэзол и алоэрезин А) (рис. 2). Общее время анализа одной пробы с учетом этапа регенерации колонки (3 мин, 12 % В) составило 18 мин, что значительно меньше, чем для ранее предложенных методик с использованием ВЭЖХ (40 – 50 мин). Хроматографические и спектральные параметры алоэнина представлены в табл. 1.

Валидационный анализ показал, что зависимость площади хроматографического пика от концентрации алоэнина в диапазоне концентрации 125 – 1500 мкг/мл описывалась линейной регрессией со значением коэффициента детерминации 0,9993 (табл. 2). Величины пределов детектирования (LOD) и количественного определения алоэнина (LOQ) составили 35 и 105 мкг/мл соответственно. Показатели воспроизводимости, вариабельности и стабильности не превышали 1,5 %, а точность методики, определенная для 5 уровней концентрации (80 – 120 %) составила 98,16 – 101,34 % (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительных метрологических характеристиках разработанной методики.

Исследование применимости методики для анализа растительного сырья, субстанций (экстракт сухой) и лекарственных препаратов *A. arborescens* показало ее эффективность для определения количественного содержания алоэнина (табл. 4). Следует отметить, что в случае анализа малоконцентрированных препаратов, например, “Алоэ экстракта жидкого, раствора для подкожного введения”, алоэнин является единственным детектируемым соединением, присутствие которого позволяет проводить качественную и количественную оценку без предварительного концентрирования.

Таблица 4  
Содержание алоэнина в сырье и препаратах *A. arborescens*

Сырье, препарат	Алоэнин
Листья <i>A. arborescens</i> до биостимуляции:	
свежие, мг/г	2,87 ± 0,05
сухие, мг/г	35,95 ± 0,65
Листья <i>A. arborescens</i> после биостимуляции:	
свежие, мг/г	5,62 ± 0,11
сухие, мг/г	51,09 ± 0,97
Алоэ экстракт сухой, мг/г	68,76 ± 1,24
Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения, мкг/мл	381,30 ± 7,63
Алоэ сок, мкг/мл	495,15 ± 9,82
Таблетки с экстрактом алоэ, мг/г	5,14 ± 0,09

Разработанная методика анализа алоэина с применением метода МК-ВЭЖХ позволяет быстро, точно и достоверно стандартизовать сырье и лекарственные препараты *A. arborescens*, поэтому может быть рекомендована для фармацевтической практики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Y. I. Park and S. K. Lee (eds.), *New perspectives on Aloe*, Springer, New York (2006).
2. T. Suga, T. Hirata, and K. Tori, *Chem. Lett.*, 715 – 718 (1974).
3. K. H. Shin, W. S. Woo, S. S. Lim, et al., *J. Nat. Prod.*, **60**, 1180 – 1182 (1997).
4. D. N. Olennikov, T. A. Ibragimov, V. A. Chelombit'ko, et al., *Chem. Nat. Comp.*, **45**, 478 – 482 (2009).
5. R. G. Ovodova, V. F. Lapchik, and Yu. S. Ovodov, *Chem. Nat. Comp.*, **11**, 1 – 2 (1975).
6. H. Hikino, M. Takahashi, M. Murakami, et al., *Int. J. Crude Drug Res.*, **24**, 183 – 186 (1986).
7. D. N. Olennikov, A. V. Nazarova, A. V. Rokhin, *Chem. Nat. Comp.*, **45**, 611 – 614 (2009).
8. A. Yagi, H. Nishimura, T. Shida, I. Nishioka, *Planta Med.*, **52**, 213 – 218 (1986).
9. I. Suzuki, *J. Biochem.*, **85**, 163 – 171 (1979).
10. M. Yamamoto, T. Masui, K. Sugiyama, et al., *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 1627 – 1629 (1991).
11. S. E. Kudritskaya, G. M. Fishman, L. M. Zagorodskaya, D. M. Chikovani, *Chem. Nat. Comp.*, **21**, 541 (1985).
12. K. Umano, K. Nakahara, A. Shoji, T. Shibamoto, *J. Agric. Food. Chem.*, **47**, 3702 – 3705 (1999).
13. M. Kluge, I. Knapp, D. Kramer, et al., *Planta*, **145**, 357 – 363 (1979).
14. H. Beppu, K. Kawai, K. Shimpo, et al., *Biochem. Syst. Ecol.*, **32**, 783 – 785 (2004).
15. T. Hirata, T. Suga, *Z. Naturforsch.*, **32c**, 731 – 734 (1977).
16. ФСП ЗАО “ВиФитех” № ЛСР-007787/09-051009 “Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения”.
17. D. N. Olennikov, and A. V. Rokhin, I. N. Zilfkarov, *Chem. Nat. Comp.*, **44**, 715 – 719 (2008).
18. D. N. Olennikov, *J. Planar Chrom.*, **22**, 359 – 362 (2009).
19. K. Makino, A. Yagi, I. Nishioka, *Chem. Pharm. Bul.*, **21**, 149 – 156 (1973).
20. N. Okamura, M. Asai, N. Hine, A. Yagi, *J. Chromatogr. A*, **746**, 225 – 231 (1996).
21. W. Rebecca, O. Kayser, H. Hagels, et al., *Phytochem. Anal.*, **14**, 83 – 86 (2003).
22. H. Nakamura, T. Kan, K. Kishimoto, et al., *Jap. Hygienic Chem.*, **35**, 219 – 225 (1989).
23. H. Kuzuya, I. Tamai, H. Beppu, et al., *J. Chromatogr. B*, **752**, 91 – 97 (2001).

Поступила 10.09.12

## USING MICROCOLUMN HPLC FOR ANALYSIS OF ALOENIN IN ALOE ARBORESCENS RAW MATERIAL AND RELATED DRUGS

D. N. Olennikov<sup>1</sup>, I. N. Zilfkarov<sup>2</sup>, and T. A. Penzina<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Institute of General and Experimental Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Ulan-Ude, Buryat Republic, 670047 Russia;

<sup>2</sup> Scientific Center for Biomedical Technologies, State Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), Moscow, 117216 Russia

<sup>3</sup> Siberian Institute of Plant Physiology and Biochemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Irkutsk, 664033 Russia

A method of microcolumn reversed-phase HPLC with UV-detection (303 nm) was developed for quantitative analysis of aloenin using ProntoSIL-120-5-C18 (2 × 75 mm) column and gradient eluent system 4.1 M LiClO<sub>4</sub>/0.1 M HClO<sub>4</sub> – acetonitrile. Validation analysis showed that the proposed method is characterized by satisfactory metrological parameters. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of aloenin were 35 and 10<sup>5</sup> mg/mL respectively. Accuracy at the levels of aloenin content within 80 – 120% did not exceed 98.16 – 101.34%. The method was used for the analysis of *Aloe arborescens* Mill. leaves and some related preparations (aloe dry extract, aloe liquid extract for subcutaneous injection, aloe juice, tablets with aloe extract).

**Keywords:** aloenin, *Aloe arborescens* Mill., microcolumn reverse-phase HPLC with UV detection