

## Сравнительная оценка методов количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах

Н. П. Антонова, И. М. Моргунов\*, С. С. Прохвятилова, Е. П. Шефер, А. М. Калинин

Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации,  
Петровский бульвар, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Использование для количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах методик, различающихся условиями анализа, вызывает необходимость корректировки установленных норм для суммы антраценпроизводных в соответствии с используемой методикой определения.

**Цель работы:** провести сравнительное исследование различных фармакопейных методик количественного определения антраценпроизводных, установленных норм содержания действующих веществ и возможности замены норм с учетом используемой методики испытания. **Материалы и методы:** количественное определение суммы антраценпроизводных в образцах крушины ольховидной коры (кора измельченная и порошок) и сенны листьев (листья измельченные и порошок) проводилось в соответствии с методиками Государственной фармакопеи Российской Федерации XI и XIII изданий и Европейской фармакопеи. **Результаты:** анализ отечественных и зарубежных фармакопейных требований по определению антраценпроизводных в препаратах слабительного действия выявил различия используемых экстрагентов в методиках анализа, условий детектирования и способов расчета полученных результатов. Экспериментально обоснованы использование 70 % спиртовых растворов в качестве оптимального экстрагента и целесообразность замены опосредованного стандарта кобальта хлорида на использование удельных показателей поглощения глюкофрангулина А и сеннозида Б. Установлено, что нормы содержания суммы антраценпроизводных должны выбираться в соответствии с используемыми условиями экстрагирования. **Выводы:** проведенные сравнительные теоретические и экспериментальные исследования позволили определить оптимальные условия анализа и соответствующие им нормы содержания суммы антраценпроизводных при проведении контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов по показателю «Количественное определение».

**Ключевые слова:** спектрофотометрия; антраценпроизводные; лекарственное растительное сырье (ЛРС); лекарственные растительные препараты (ЛРП); фармакопейные методы анализа

**Для цитирования:** Антонова НП, Моргунов ИМ, Прохвятилова СС, Шефер ЕП, Калинин АМ. Сравнительная оценка методов количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье. *Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2018;8(4):252–261. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-4-252-261>

\***Контактное лицо:** Моргунов Игорь Михайлович; [Morgunov@expmed.ru](mailto:Morgunov@expmed.ru)

## Comparative Evaluation of Assay Methods Used to Determine Anthracene Derivatives in Herbal Substances and Herbal Medicinal Products

N. P. Antonova, I. M. Morgunov\*, S. S. Prokhvatilova, E. P. Shefer, A. M. Kalinin

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,  
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

**Abstract:** The use of assay methods with different test conditions for determination of anthracene derivatives in herbal substances and herbal medicinal products requires adjustment of the established limits for total anthracene derivatives content based on the test method used. **The aim of the study** was to compare different pharmacopoeial methods of quantitative determination of anthracene derivatives, and established limits for the active substance content, and to analyse the possibility of adjusting the limits based on the test method used. **Materials and methods:** the total content of anthracene derivatives was measured in the samples of frangula bark (fragmented bark and powder) and senna leaves (fragmented leaves and powder) using the test methods described in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (XI and XIII editions), and the European Pharmacopoeia. **Results:** the analysis of Russian and foreign pharmacopoeial requirements for determination of anthracene derivatives in laxative herbal medicinal products demonstrated differences in extraction solvents, extraction conditions, and calculation methods used. The experiments showed that the optimal extraction solvent was 70 % alcohol solutions, and that an indirect cobaltic chloride reference standard should be replaced by specific absorbance of glucofrangulin A and sennoside B. It was shown that the limits for total anthracene derivatives content should be chosen based on the extraction conditions used. **Conclusions:** comparative theoretical research and experimental studies helped to determine optimal assay conditions and respective limits for total anthracene derivatives content to be used in quality control of herbal substances and herbal medicinal products.

**Key words:** spectrophotometry; anthracene derivatives; herbal substances; herbal medicinal products; pharmacopoeial methods

**For citation:** Antonova NP, Morgunov IM, Prokhvatilova SS, Shefer EP, Kalinin AM. Comparative Evaluation of Assay Methods Used to Determine Anthracene Derivatives in Herbal Substances and Herbal Medicinal Products. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2018;8(4):252–261. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-4-252-261>

\***Corresponding author:** Igor M. Morgunov; [Morgunov@expmed.ru](mailto:Morgunov@expmed.ru)

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Слабительные средства являются широко используемой группой лекарственных средств для лечения функциональных расстройств пищеварительной системы. В медицинской практике наряду с синтетическими слабительными средствами применяются слабительные растительного происхождения, содержащие антраценпроизводные [1, 2].

Для количественного определения антраценпроизводных в лекарственном растительном сырье (ЛРС) и лекарственных растительных препаратах (ЛРП) в качестве фармакопейного используется метод спектрофотометрии [3]. Существуют несколько вариантов этого метода, имеющих общий принцип пробоподготовки: экстракция → гидролиз и окисление → перекрепация с образованием окрашенных фенолятов. В Государственную фармакопею СССР X и XI изданий (ГФ X и ГФ XI соответственно), а также в Государственную фармакопею Российской Федерации XIII издания (ГФ XIII) включен модифицированный метод Аутерхоффа для количественного определения суммы антрагликозидов в коре крушины в пересчете на истизин, основанный на том, что гидролиз гликозидов проводится одновременно с экстракцией ледяной уксусной кислотой<sup>1,2</sup>.

При замене этой методики на методику определения суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А, аналогичную методикам Европейской фармакопеи и Британской фармакопеи, нормы содержания действующих веществ не были скорректированы в сторону увеличения до норм, установленных зарубежными фармакопеями. В сложившейся ситуации возможен выход на рынок низкокачественного ЛРС и препаратов на его основе (ЛРП).

Другие методы для количественного определения антраценпроизводных, такие как хроматоспектрофотометрия и денситометрия, не получили широкого распространения [4, 5].

Цель работы — провести сравнительное исследование различных фармакопейных методик количественного определения антраценпроизводных, установленных норм содержания действующих веществ и возможности замены норм с учетом используемой методики испытания.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести анализ отечественных и зарубежных фармакопейных требований по определению антраценпроизводных в ЛРС и ЛРП слабительного действия;
- систематизировать полученные данные и провести сравнительные экспериментальные исследования для определения оптимальных условий анализа и норм по показателю «Количественное определение», соответствующих используемому методу экстрагирования антраценпроизводных.

В отечественную фармакопею в настоящее время включены несколько видов лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные. Для исследований были выбраны два объекта, которые наиболее часто используются в медицинской практике: Крушины ольховидной кора и Сенны листья.

В качестве образцов лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов использовались:

- Крушины ольховидной кора, 2 серии (кора измельченная и порошок);
- Сенны листья, 2 серии (листья измельченные и порошок).

Каждый образец анализировался в виде трех параллельных проб, по результатам измерения которых рассчитывалось относительное стандартное отклонение (RSD).

Оборудование:

- спектрофотометр Cary 100 varian, сушильный шкаф Binder ED53, аналитические весы Mettler Toledo XPE205DR, баня водяная Julabo TW-12.

Для анализа использовались методы количественного определения антраценпроизводных Крушины ольховидной коры и Сенны листьев в соответствии с ГФ XI, ГФ XIII и зарубежными фармакопеями<sup>3,4,5,6</sup>.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе исследования был проведен сравнительный анализ методов количественного определения антраценпроизводных крушины, включенных в различные фармакопеи. Результаты представлены в таблице 1.

В фармакопейную статью ГФ XIII «Крушины ольховидной кора» (ФС 2.5.0021.15) включены две методики количественного определения антраценпроизводных, причем норма содержания антраценпроизводных одинаковая для обоих методов, независимо от способа пробоподготовки. Регламентировано, что и сумма антрагликозидов в пересчете на истизин, определяемая по модифицированному методу Аутерхоффа, и сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А, определяемая после экстракции сырья 80 % раствором этанола, должна быть не менее 4,5 %.

По методике Европейской фармакопеи экстракция сырья для определения антраценпроизводных крушины проводится 70 % раствором метанола, при этом норма извлечения составляет не менее 7,0 % суммы глюкофрангулинов в пересчете на глюкофрангулин А. Согласно данным литературы, именно концентрация спиртового раствора 70 % является оптимальной для экстракции антраценпроизвод-

<sup>1</sup> Государственная фармакопея СССР. 11-е изд. М.: Медицина; 1990.

<sup>2</sup> Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. Т. 1–3. М.; 2015.

<sup>3</sup> European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017.

<sup>4</sup> British Pharmacopoeia. London; 2016.

<sup>5</sup> United States Pharmacopoeia. 39th ed. 2016.

<sup>6</sup> Государственная фармакопея Республики Беларусь. Т. 2. Минск; 2008.

ных крушины, так как позволяет наиболее полно провести извлечение анализируемых веществ [6].

Методы 1, 2 и 3 (табл. 1) отличаются применяемыми стандартными образцами. В соответствии с методом 1 содержание производных антрацена в пересчете на истизин вычисляют по калибровочному графику для оптической плотности растворов кобальта хлорида различной концентрации. Методами 2 и 3 предусмотрено использование удельного показателя поглощения стандартного образца глюкофрангулина А.

На втором этапе исследования было проведено сравнительное экспериментальное определение суммы антраценпроизводных параллельно в двух в образцах коры крушины (кора измельченная и порошок) методами 1, 2 и 3, выбранными на основании анализа таблицы 1. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Экстракция биологически активных веществ из ЛРС/ЛРП — это сложный процесс, зависящий от сочетания свойств конкретного сырья и экстрагента: способности к смачиванию, коэффициента поглощения, диффузионной способности, десорбирующих свойств и т. д. [7].

При сравнении результатов анализа коры крушины, полученных тремя методами (табл. 2), выяв-

лено несоответствие качества испытуемых образцов по содержанию суммы антраценпроизводных в пересчете на истизин. Также установлено, что результаты определения суммы антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А, полученные методами 2 и 3, различаются между собой. При проведении анализа методом 2 получены более низкие результаты, чем при анализе, проведенном методом 3. Это объясняется различием в концентрации спирто-водной смеси, используемой в качестве экстрагента.

Установлено также, что использование кобальта хлорида в качестве опосредованного стандарта (метод 1) может увеличить ошибку определения, связанную с несовпадением максимумов поглощения испытуемого и стандартного растворов. Максимум поглощения щелочно-аммиачного раствора антрахинонов коры крушины, полученного методом 1, находится в области длин волн  $531 \pm 3$  нм (рис. 1).

Максимум поглощения стандартных растворов кобальта хлорида не совпадает с максимумом испытуемого раствора и находится в области длин волн  $510 \pm 2$  нм (рис. 2).

В соответствии с методом 1 измерение оптической плотности испытуемого раствора предусмотрено проводить при длине волны 540 нм, а растворов кобальта хлорида при длине волны около 530 нм,

**Таблица 1.** Сравнение фармакопейных методов количественного определения антраценпроизводных в коре крушины

Название фармакопей	Метод	Определяемая группа веществ и норма	Длина волны
ГФ XI и GF XIII	Фотоколориметрический	Сумма антрагликозидов в пересчете на истизин не менее 4,5 % (модифицированный метод Аутерхоффа) ( <b>метод 1</b> )	540 нм
ГФ XIII	Спектрофотометрический	Сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 4,5 % ( <b>метод 2</b> )	515 нм
Государственная фармакопея Республики Беларусь	Спектрофотометрический	Сумма глюкофрангулинов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 7,0 %	515 нм
Британская фармакопея	Спектрофотометрический	Сумма глюкофрангулинов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 7,0 %	515 нм
Европейская фармакопея	Спектрофотометрический	Сумма глюкофрангулинов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 7,0 % ( <b>метод 3</b> )	515 нм
Фармакопея США	Спектрофотометрический	Сумма производных гидроксиантрацена в пересчете на каскарозид А не менее 7,0 %	515 нм

**Таблица 2.** Результаты сравнительного количественного определения суммы антраценпроизводных коры крушины тремя различными методами

Методы и нормы	Наименование ЛРП; лекарственная форма	Результат, %
<b>Метод 1:</b> GF XI и GF XIII (модифицированный метод Аутерхоффа) Сумма антраценпроизводных в пересчете на истизин не менее 4,5 %	Крушины кора; кора измельченная	4,1 (RSD = 2,9 %)
	Крушины кора; кора порошок	4,4 (RSD = 2,6 %)
<b>Метод 2:</b> GF XIII Сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 4,5 %	Крушины кора; кора измельченная	7,2 (RSD = 1,4 %)
	Крушины кора; кора порошок	7,2 (RSD = 0,8 %)
<b>Метод 3:</b> Европейская фармакопея Сумма антрагликозидов в пересчете на глюкофрангулин А не менее 7,0 %	Крушины кора; кора измельченная	8,0 (RSD = 0,6 %)
	Крушины кора; кора порошок	8,6 (RSD = 1,7 %)

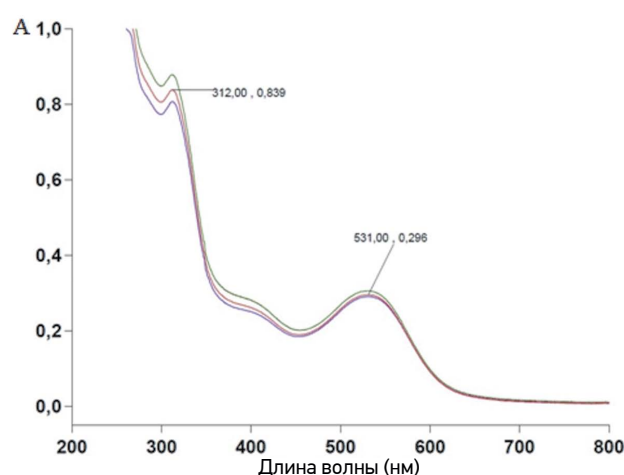


Рис. 1. Спектры испытуемых растворов коры крушины (пробоподготовка по методу 1, параллельные пробы)

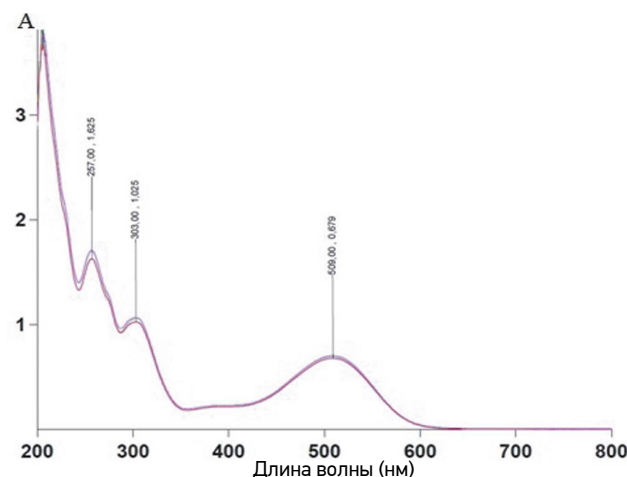


Рис. 3. Спектры испытуемых растворов коры крушины (пробоподготовка по методу 2, параллельные пробы)

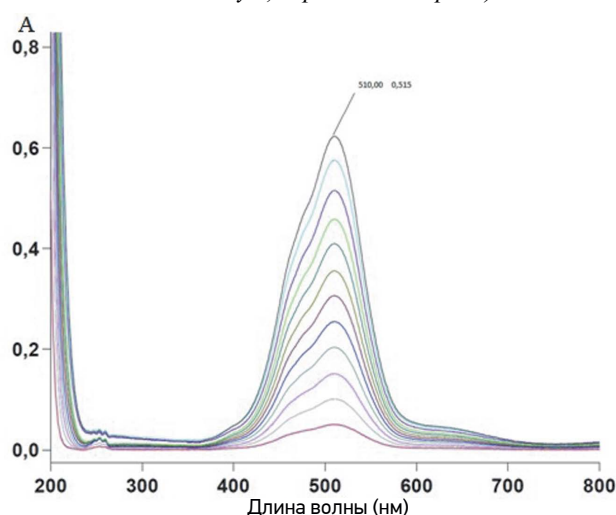


Рис. 2. Спектры растворов опосредованного стандарта — кобальта хлорида 2,5 мг/мл, 5,0 мг/мл, 7,5 мг/мл, 10,0 мг/мл, 12,5 мг/мл, 15,0 мг/мл, 17,5 мг/мл, 20,0 мг/мл, 22,5 мг/мл, 25,0 мг/мл, 27,5 мг/мл, 30,0 мг/мл (метод 1)

что может привести к получению некорректных результатов. Использование истизина (хризофановой кислоты) вместо кобальта хлорида в качестве стандартного образца в настоящее время невозможно, так как на рынке вышеуказанный стандартный образец не представлен.

Фактический максимум поглощения фенолятов антрагликозидов коры крушины ломкой, полученных методами 2 и 3, находится в области  $509 \pm 3$  нм (рис. 3). Измерение оптической плотности испытуемого раствора в соответствии с методами 2 и 3 предусмотрено проводить при 515 нм, что вносит меньшую ошибку в результаты анализа, чем при использовании метода 1.

Аналогичные сравнительные исследования были проведены для методов количественного определения антраценпроизводных листьев сенны. Результаты представлены в таблице 3.

Согласно фармакопейной статье ГФ XIII «Сенны листья» (ФС.2.5.0038.15) для методики определения содержания суммы агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту предусмотрены два способа расчета результатов. В одном случае расчет проводят с использованием калибровочного графика оптической плотности растворов кобальта хлорида различной концентрации (метод 1). В другом случае допускается проводить вычисления с использованием величины удельного показателя поглощения хризофановой кислоты при длине волны 523 нм (метод 2). По Европейской фармакопее предусмотрено определение суммы гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б с нормой не менее 2,5 %, для расчетов при этом используется удельный показатель поглощения сеннозида Б (метод 3).

Таблица 3. Сравнение фармакопейных методов количественного определения антраценпроизводных в листьях сенны

Название фармакопей	Метод	Определяемая группа веществ и норма	Длина волны
ГФ XI и ГФ XIII	Спектрофотометрический	Сумма агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту не менее 1,35 % (методы 1 и 2)	523 нм
Государственная фармакопея Республики Беларусь	Спектрофотометрический	Содержание гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б не менее 2,5 %	515 нм
Британская фармакопея	Спектрофотометрический	Содержание гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б не менее 2,5 %	515 нм
Европейская фармакопея	Спектрофотометрический	Содержание гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б не менее 2,5 % (метод 3)	515 нм
Фармакопея США (USP)	Спектрофотометрический	Сумма производных гидроксиантрацена в пересчете на каскарозид А не менее 2,5 %	515 нм



**Таблица 4.** Результаты сравнительного количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях сенны

Метод и нормы	Наименование ЛРП; лекарственная форма	Результат, %
<b>Метод 1:</b> ГФ XI и ГФ XIII Сумма агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту не менее 1,35 % (калибровочный график)	Сенны листья; листья измельченные	1,85 (RSD = 1,9 %)
	Сенны листья; листья порошок	1,98 (RSD = 2,1 %)
<b>Метод 2:</b> ГФ XIII Сумма агликонов антраценового ряда в пересчете на хризофановую кислоту не менее 1,35 % (удельный показатель поглощения)	Сенны листья; листья измельченные	1,84 (RSD = 1,9 %)
	Сенны листья; листья порошок	1,97 (RSD = 2,1 %)
<b>Метод 3:</b> Европейская фармакопея Сумма гидроксиантраценгликозидов в пересчете на сеннозид Б не менее 2,5 %	Сенны листья; листья измельченные	2,50 (RSD = 2,9 %)
	Сенны листья; листья порошок	2,60 (RSD = 2,7 %)

После проведения экспериментального исследования было установлено, что результаты испытаний образцов листьев сенны (табл. 4) при использовании метода 3 почти на 25 % выше, чем результаты, полученные методами 1 и 2.

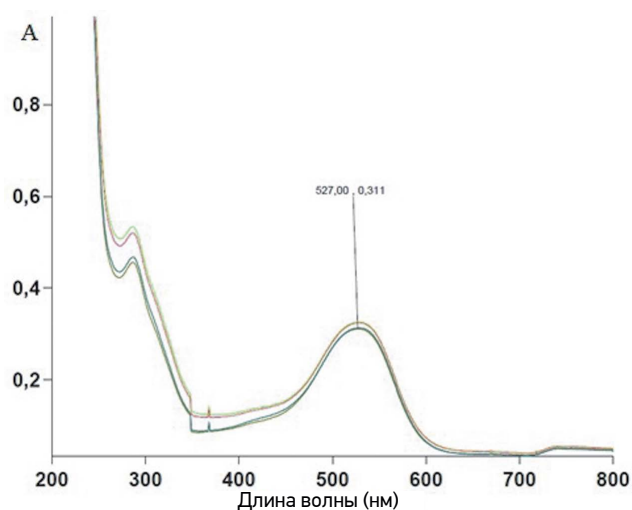
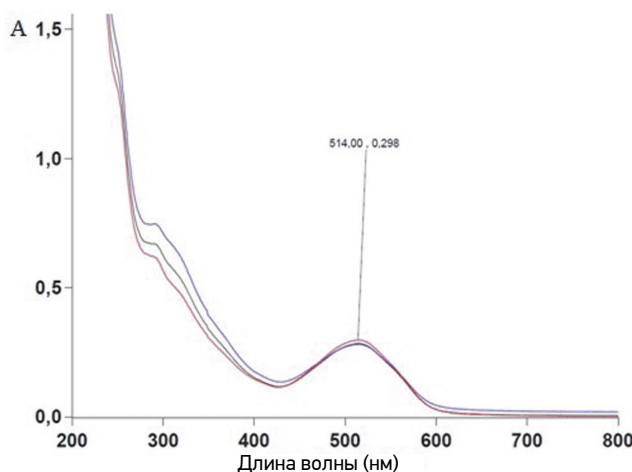
Выявленные различия связаны с методикой пробоподготовки, способом расчета и выбранной длиной волны, при которой определяется оптическая плотность испытуемого раствора. При использовании методов 1 и 2 требуемая для проведения измерений длина волны составляет 523 нм. При этом фактически полученный в испытании максимум поглощения испытуемого раствора составил 527 нм (рис. 4). При использовании метода 3 для проведения измерений установлена длина волны 515 нм, что соответствует фактически полученному в испытании максимуму поглощения испытуемого раствора — 514 нм (рис. 5).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведена сравнительная оценка методов количественного определения антраценпроизводных в ЛРС и ЛРП Крушины ольховидной кора и Сенны листья. Установлено, что при разработке методики ГФ XIII ФС.2.5.0021.15 для количественного определения суммы антрагликозидов Крушины ольховидной коры в пересчете на глюкофрангулин А не были учтены следующие факторы: выбор наиболее подходящего экстрагента для анализа и необходимость увеличения нормы содержания суммы антраценпроизводных в условиях новой методики. В качестве оптимального экстрагента при анализе Крушины ольховидной коры по данной методике является 70 % метанол или этанол; норма содержания антраценпроизводных должна составлять «не менее 7,0 %».

Установлено, что методика количественного определения суммы антраценпроизводных Сенны листьев по ГФ XIII ФС.2.5.0038.15 должна быть согласована с методикой Европейской фармакопеи, а норма содержания должна составлять «не менее 2,5 %».

При определении содержания антраценпроизводных в ЛРС/ЛРП целесообразно взамен методики с использованием калибровочного графика, построенного по растворам кобальта хлорида, вклю-

**Рис. 4.** Спектры испытуемых растворов листьев сенны (пробоподготовка по методам 1 и 2, параллельные пробы)**Рис. 5.** Спектры испытуемых растворов листьев сенны (пробоподготовка по методу 3, параллельные пробы)

чать методики, предусматривающие использование удельных показателей поглощения стандартных образцов, которые соответствуют присутствующим в сырье активным веществам — глюкофрангулин А, сеннозид Б.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00023-18-02 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Laxatives are a widely used group of medicines that help resolve digestive system disorders. Laxatives used in medical practice include chemicals and herbal medicinal products containing anthracene derivatives [1, 2].

Pharmacopoeias describe the spectrophotometric method for anthracene derivatives determination in herbal substances and herbal medicinal products [3]. This method has a number of variations that share a common sample preparation algorithm: extraction → hydrolysis and oxidation → re-extraction resulting in the formation of coloured phenolates. The State Pharmacopoeia of the USSR, X and XI editions (SPh X and XI, respectively) and the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition (SPh XIII) include the modified Auterhoff's method for quantitative determination of the total content of anthraglycosides expressed as istizin (1,8-dihydroxyanthraquinone) in frangula bark. The method is based on hydrolysis of glycosides and extraction of anthracene derivatives with glacial acetic acid performed simultaneously<sup>1,2</sup>.

When this method was replaced in the SPh III by a procedure of determination of total anthraglycosides expressed as glucofrangulin A which is similar to the methods described in the European Pharmacopoeia and British Pharmacopoeia, the limits for active substance content were not increased to meet the norms established by the foreign pharmacopoeias. This might be fraught with appearance of low quality herbal substances and herbal medicinal products in the market.

Other types of assays for anthracene derivatives determination, such as chromatophotometry, or densitometry are rather uncommon [4, 5].

The aim of the study was to compare different pharmacopoeial methods of quantitative determination of anthracene derivatives, and established limits for the active substance content, and to analyse the possibility of adjusting the limits based on the test method used.

To achieve this aim the following objectives had to be addressed:

- analysis of Russian and foreign pharmacopoeial requirements for determination of anthracene derivatives in laxative herbal substances and herbal medicinal products;
- systematisation of obtained data and conducting a comparative experimental study to determine optimal assay conditions and respective limits consistent with the anthracene derivatives extraction method being used.

## MATERIALS AND METHODS

The Russian Pharmacopoeia includes monographs on several types of herbal substances containing anthracene derivatives. Two of them, which are most widely used in medical practice, were included into the study: frangula bark and senna leaves.

Samples of herbal substances and herbal medicinal products analysed in the study included:

- frangula bark, 2 batches (fragmented bark and powder);
- senna leaves, 2 batches (fragmented leaves and powder).

Three parallel analyses were performed for each sample, and the obtained results were used to calculate the relative standard deviation (RSD).

Equipment:

- Varian Cary 100 spectrophotometer, Binder ED53 oven, Mettler Toledo XPE205DR analytical balance, Julabo TW-12 water bath.

Quantitative determination of anthracene derivatives in frangula bark and senna leaves was performed using the assay methods described in the SPh XI, SPh XIII, and foreign pharmacopoeias<sup>3,4,5,6</sup>.

## RESULTS AND DISCUSSION

The first stage of the study involved comparative analysis of the pharmacopoeial assay methods used for determination of anthracene derivatives in frangula bark. The results are given in table 1.

The «Frangula bark» monograph included into the SPh XIII (FS.2.5.0021.15) describes two methods of anthracene derivatives determination, and the limits for anthracene derivatives content are the same for both these methods irrespective of the sample preparation procedure used. It states that both the total content of anthraglycosides expressed as istizin which is determined using the modified Auterhoff's method, and the total content of anthraglycosides expressed as glucofrangulin A which is determined after anthracene derivatives extraction from the raw material with 80 % ethanol — have to account for not less than 4.5 %.

The European Pharmacopoeia method of anthracene derivatives determination in frangula bark includes anthracene derivatives extraction from the raw material with 70 % methanol, and the content is minimum 7.0 % of glucofrangulins expressed as glucofrangulin A. According to literary sources the alcohol solution concentration of 70 % is the optimal one for extraction of frangula anthracene derivatives, as it allows for maximum extraction of the test substances [6].

Methods 1, 2 and 3 (table 1) differ in the reference standards used. Method 1 involves calculation of anthracene derivatives expressed as istizin using a calibration curve for optical density of cobaltic chloride solutions

<sup>1</sup> State Pharmacopoeia of the USSR. XI ed. Moscow: Meditsina; 1990.

<sup>2</sup> State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII ed. V 1–3. Moscow; 2015.

<sup>3</sup> European Pharmacopoeia. 9th ed. Strasbourg; 2017. Available from: <http://online.edqm.eu/EN/entry.htm>

<sup>4</sup> British Pharmacopoeia. London; 2016. Available from: <http://pharmacopoeia.com/downloads/bp/2016>

<sup>5</sup> United States Pharmacopoeia. 39th ed. 2016. Available from: <http://www.uspnf.com/uspnf>

<sup>6</sup> State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus. V. 2. Minsk; 2008.

with different concentrations. Methods 2 and 3 rely on specific absorbance values for the glucofrangulin A reference standard.

At the second stage an experimental study was carried out that compared the results of determination of total anthracene derivatives performed simultaneously for two samples of frangula bark (fragmented bark and powder) by methods 1, 2, and 3 which were chosen following analysis of data in table 1. The obtained results are given in table 2.

The extraction of bioactive substances from herbal substances/herbal medicinal products is a complex process which depends on the combination of properties of a particular raw material and extraction solvent: wettability, absorbance, diffusibility, desorption characteristics, etc. [7].

The comparison of the results of frangula bark testing by three methods (table 2) demonstrated inconsistent quality of the test samples in terms of the total content of anthracene derivatives expressed as istizin. The results of determination of the total content of anthraglycosides expressed as glucofrangulin A by methods 2 and 3 showed some variation. The values obtained with method 2 were lower than those obtained with method 3. This can be accounted for by different concentrations of the water-alcohol mixture used as extraction solvent.

It was also shown that the use of cobaltic chloride as an indirect reference standard (method 1) could increase

measurement error associated with the discrepancy between absorption maxima of the test and reference solutions. The absorption maxima of the alkali-ammonia solutions of frangula bark anthraquinones obtained by method 1 occur at  $531 \pm 3$  nm (fig. 1).

The absorption maxima of the cobaltic chloride reference solutions do not coincide with those of the test solution and occur at  $510 \pm 2$  nm (fig. 2).

According to method 1 the optical density of the test solution is measured at 540 nm, and the optical density of cobaltic chloride solutions is measured at about 530 nm, which may give rise to inaccurate results. Replacing cobaltic chloride with istizin (methyl chrysazin) as a reference standard is not feasible now since the latter is not available on the market.

The actual absorption maxima of solutions of anthraglycoside phenolates contained in frangula bark and obtained using methods 2 and 3 fall within the range of  $509 \pm 3$  nm (fig. 3). According to methods 2 and 3 the optical density of the test solution is measured at 515 nm, which is associated with a smaller measurement error than that characteristic of method 1.

A similar comparative study was carried out for assays that are used to determine anthracene derivatives in senna leaves. The results are given in table 3.

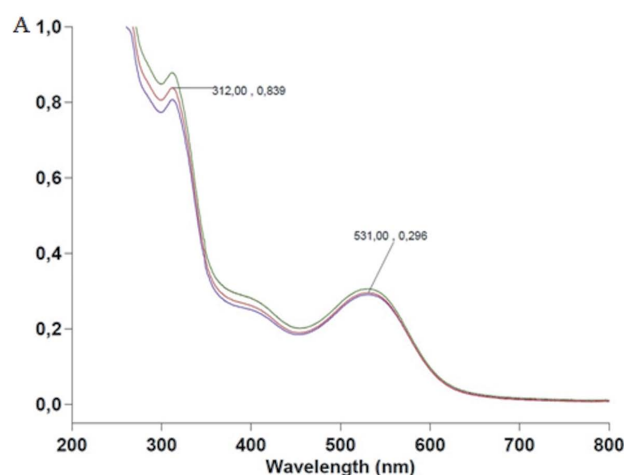
The «Senna leaves» monograph included into the SPh XIII (FS.2.5.0038.15) describes two ways of deter-

**Table 1.** Comparison of the pharmacopoeial assay methods used for determination of anthracene derivatives in frangula bark

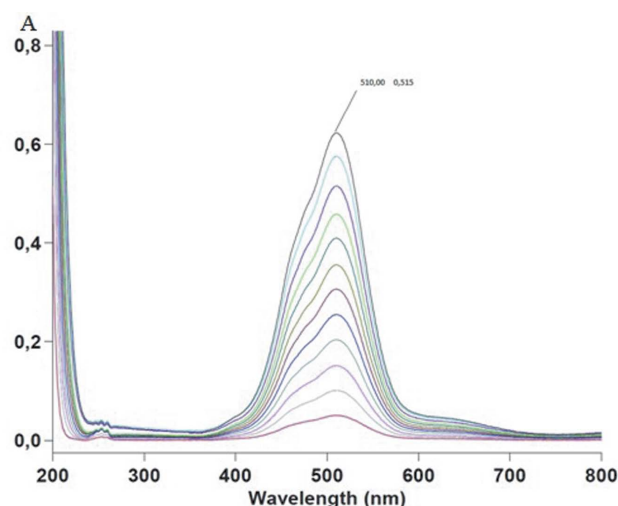
Pharmacopoeia	Test method	Group of substances to be determined	Wavelength
SPh XI and SPh XIII	Photocolorimetry	Total content of anthraglycosides expressed as istizin — NLT 4.5 % (the modified Auterhoff's method), <b>Method 1</b>	540 nm
SPh XIII	Spectrophotometry	Total content of anthraglycosides expressed as glucofrangulin A — NLT 4.5 %, <b>Method 2</b>	515 nm
State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus	Spectrophotometry	Total content of glucofrangulins expressed as glucofrangulin A — NLT 7.0 %	515 nm
British Pharmacopoeia	Spectrophotometry	Total content of glucofrangulins expressed as glucofrangulin A — NLT 7.0 %	515 nm
European Pharmacopoeia	Spectrophotometry	Total content of glucofrangulins expressed as glucofrangulin A — NLT 7.0 %, <b>Method 3</b>	515 nm
United States Pharmacopoeia	Spectrophotometry	Total content of hydroxyanthracene derivatives expressed as cascarioside A — NLT 7.0 %	515 nm

**Table 2.** Results of comparative quantitative determination of total anthracene derivatives in frangula bark by three different methods

Method and limits	Medicinal product; dosage form	Result, %
<b>Method 1:</b> SPh XI and SPh XIII (the modified Auterhoff's method) Total content of anthracene derivatives expressed as istizin — NLT 4.5 %	Frangula bark; fragmented bark	4.1 (RSD = 2.9 %)
	Frangula bark; powdered bark	4.4 (RSD = 2.6 %)
<b>Method 2:</b> SPh XIII Total content of anthraglycosides expressed as glucofrangulin A — NLT 4.5 %	Frangula bark; fragmented bark	7.2 (RSD = 1.4 %)
	Frangula bark; powdered bark	7.2 (RSD = 0.8 %)
<b>Method 3:</b> European Pharmacopoeia Total content of anthraglycosides expressed as glucofrangulin A — NLT 7.0 %	Frangula bark; fragmented bark	8.0 (RSD = 0.6 %)
	Frangula bark; powdered bark	8.6 (RSD = 1.7 %)

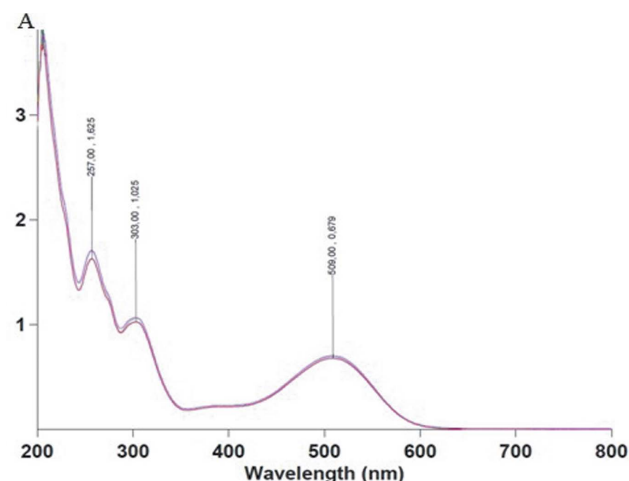


**Fig. 1.** The spectra of the frangula bark test solutions (sample preparation performed according to method 1, replicates)



**Fig. 2.** The spectra of the indirect reference standard solutions — cobaltic chloride 2.5 mg/ml, 5.0 mg/ml, 7.5 mg/ml, 10.0 mg/ml, 12.5 mg/ml, 15.0 mg/ml, 17.5 mg/ml, 20.0 mg/ml, 22.5 mg/ml, 25.0 mg/ml, 27.5 mg/ml, 30.0 mg/ml (method 1)

mination of the total content of anthracene aglycones expressed as methyl chrysazin. The first method involves calculation using a calibration curve for optical density of cobaltic chloride solutions with different concentrations (method 1). The other method allows for calculations



**Fig. 3.** The spectra of frangula bark test solutions (sample preparation performed according to method 2, replicates)

using the specific absorbance value of methyl chrysazin at 523 nm (method 2). The European Pharmacopoeia method determines the total content of hydroxyanthracene glycosides expressed as sennoside B, and the limit is set at no less than 2.5 %. The calculations are made using the specific absorbance of sennoside B (method 3).

The experimental part of the study showed that the results of senna leaves testing (table 4) using method 3 were almost 25 % higher than those obtained with methods 1 and 2.

The revealed differences are attributed to the sample preparation procedure, the calculation method, and the wavelength at which the optical density of the test solution was determined. Methods 1 and 2 require measurements to be made at 523 nm, and the actual absorption maximum obtained for the test solution was 527 nm (fig. 4). Method 3 requires measurements to be made at 515 nm, and this is very close to the actual absorption maximum obtained for the test solution — 514 nm (fig. 5).

## CONCLUSION

The study reported in this paper compared the assay methods used for determination of anthracene derivatives in herbal substances and herbal medicinal products — frangula bark and senna leaves. It was demonstrated that the SPh XIII monograph FS.2.5.0021.15 was elaborated without due regard to a number of factors essential

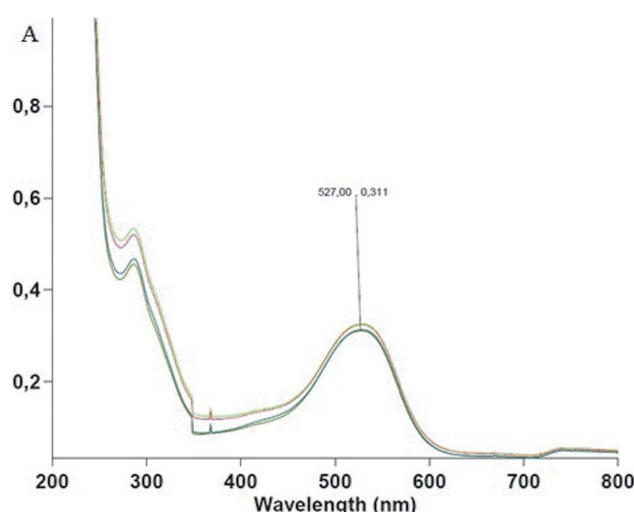
**Table 3.** Comparison of pharmacopoeial assay methods used to determine anthracene derivatives in senna leaves

Pharmacopoeia	Test method	Group of substances to be determined	Wavelength
SPh XI and SPh XIII	Spectrophotometry	Total content of anthracene aglycones expressed as methyl chrysazin — NLT 1.35 % ( <b>methods 1 and 2</b> )	523 nm
State Pharmacopoeia of the Republic of Belarus	Spectrophotometry	Content of hydroxyanthracene glycosides expressed as sennoside B — NLT 2.5 %	515 nm
British Pharmacopoeia	Spectrophotometry	Content of hydroxyanthracene glycosides expressed as sennoside B — NLT 2.5 %	515 nm
European Pharmacopoeia	Spectrophotometry	Content of hydroxyanthracene glycosides expressed as sennoside B — NLT 2.5 % ( <b>method 3</b> )	515 nm
United States Pharmacopoeia (USP)	Spectrophotometry	Total content of hydroxyanthracene derivatives expressed as cascarioside A — NLT 2.5 %	515 nm

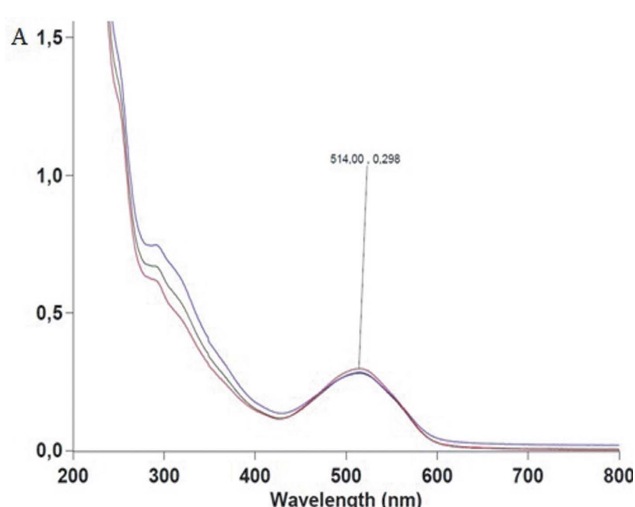


**Table 4.** Results of comparative quantitative determination of total anthracene derivatives in senna leaves

Method and limits	Medicinal product; dosage form	Result, %
<b>Method 1:</b> SPh XI and SPh XIII Total content of anthracene aglycones expressed as methyl chrysazin — NLT 1.35 % (calibration curve)	Senna leaves; fragmented leaves	1.85 (RSD = 1.9 %)
	Senna leaves; powdered leaves	1.98 (RSD = 2.1 %)
<b>Method 2:</b> SPh XIII Total content of anthracene aglycones expressed as methyl chrysazin — NLT 1.35 % (specific absorbance value)	Senna leaves; fragmented leaves	1.84 (RSD = 1.9 %)
	Senna leaves; powdered leaves	1.97 (RSD = 2.1 %)
<b>Method 3:</b> European Pharmacopoeia Total content of hydroxyanthracene glycosides expressed as sennoside B — NLT 2.5 %	Senna leaves; fragmented leaves	2.50 (RSD = 2.9 %)
	Senna leaves; powdered leaves	2.0 (RSD = 2.7 %)



**Fig. 4.** The spectra of senna leaves test solutions (sample preparation performed according to methods 1 and 2, replicates)



**Fig. 5.** The spectra of senna leaves test solutions (sample preparation performed according to method 3, replicates)

for determination of the total content of frangula bark anthraglycosides expressed as glucofrangulin A, i.e. the choice of the optimal extraction solvent and the need to increase the limits for the total anthracene derivatives given the conditions of the new test procedure. The optimal extraction solution for testing frangula bark using this method is 70 % methanol/ethanol, and the anthracene derivatives content should be «no less than 7.0 %».

It was demonstrated that the assay method used for determination of the total content of anthracene derivatives in senna leaves according to the SPh XIII monograph FS.2.5.0038.15 should be brought in line with the European Pharmacopoeia method, and the content should be «no less than 2.5 %».

Determination of anthracene derivatives in herbal substances or herbal medicinal products should not be based on the calibration curve for cobaltic chloride solutions, instead it should include methods relying on specific absorbance of reference standards corresponding to the active pharmaceutical ingredients present in the herbal substances — glucofrangulin A and sennoside B.

**Acknowledgements.** The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00023-18-02 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. AAAA-A18-118021590049-0).

**Conflict of interest.** Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Куркин ВА, Шмыгарева АА. Новые подходы к стандартизации листьев сенны. *Химия растительного сырья*. 2016;(1):71–7. [Kurkin VA, Shmygareva AA. New approaches to standartization of Cassia leaves. *Khimiya rastitelnogo syriya = Chemistry of Plant Raw Material*. 2016;(1):71–7 (In Russ.)]
2. Зайцева НВ, Куркин ВА, Авдеева ЕВ. Перспективы комплексного использования щавеля конского. *Известия Самарского научно-го центра Российской академии наук*. 2012;14(1):2222–5. [Zaytseva NV, Kurkin VA, Avdeeva EV. Prospects of complex using the Horse sorrel. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk = Izvestiya of Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*. 2012;14(1):2222–5 (In Russ.)]
3. Марахова АИ, Аврач АС, Скалзубова ТА, Сорокина АА, Сергунова ЕВ, Федоровский НН. Спектрофотометрия в анализе сборов. *Медицина и образование в Сибири*. 2012;(2):79–89. [Marakhova AI,

- Avrach AS, Skalozubova TA, Sorokina AA, Sergunova EV, Fedorovsky NN. Spectrophotometry in analysis of preparations. *Meditsina i obrazovanie v Sibiri = Journal of Siberian Medical Sciences*. 2012;(2):79–89 (In Russ.)]
4. Rai PP. Thin-layer densitometric determination of individual dehydroxy-anthraquinone derivatives. *Chromatographia*. 1980;13(12):763–4.
5. Lemmens L. Determination of dehydroxyanthrones by densitometry after thin-layer chromatographic separation. *Journal of Chromatography A*. 1977;132(2):363–5.
6. Куркин ВА, Шмыгарева АА. Определение антраценпроизводных в коре крушины. *Фармация*. 2010;(8):9–11. [Kurkin VA, Shmygareva AA. Determination of anthracene derivatives in the buckthorn (*Frangula*) bark. *Farmatsiya = Pharmacy*. 2010;(8):9–11 (In Russ.)]
7. Саламатин АА, Хазиев РШ, Макарова АС, Иванова СА. Кинетика экстракции биологически активных веществ из растительного сырья кипящим растворителем. *Теоретические основы химической технологии*. 2015;49(2):206–13. [Salamatina AA, Khaziev RSh, Makarova AS, Ivanova SA. Kinetics of boiling solvent extraction of bioactive compounds from herbal substances. *Teoreticheskie osnovy khimicheskoy tekhnologii = Theoretical Foundations of Chemical Engineering*. 2015;49(2):206–13 (In Russ.)]

## ОБ АВТОРАХ

**Антонова Наталья Петровна**, канд. биол. наук, начальник лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

**Моргунов Игорь Михайлович**, эксперт 2-й категории лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3907-3456>

**Прохватилова Светлана Степановна**, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

**Шефер Елена Павловна**, канд. фарм. наук, главный эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

**Калинин Артем Михайлович**, ведущий эксперт лаборатории фитопрепаратов и гомеопатических средств Испытательного центра экспертизы качества лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-4980-3248>

## AUTHORS

**Natalia P. Antonova**, Cand. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-7818-5303>

**Igor M. Morgunov**, 2nd Professional Category Expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3907-3456>

**Svetlana S. Prokhvatilova**, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-3278-1994>

**Elena P. Shefer**, Cand. Sci. (Pharm.), Chief Expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8389-4799>

**Artem M. Kalinin**, Leading Expert of the Laboratory of Herbal and Homeopathic Products of the Testing Centre for Evaluation of Medicinal Products' Quality of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0002-4980-3248>

Статья поступила 14.06.2018  
После доработки 03.10.2018  
Принята к печати 19.11.2018

Article was received 14 June 2018  
Revised 3 October 2018  
Accepted for publication 19 November 2018