

УДК 547-314+54.056+615.07+615.32

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЛАКТОНА АРТЕАННУИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ В ТРАВЕ *ARTEMISIA ANNUA*

© *Р.Ф. Мухаматханова*^{1*}, *В.В. Узбеков*², *Д.К. Муталова*¹, *М.А. Маматханова*¹, *И.Д. Шамьянов*¹,
*Р.М. Халилов*¹

¹ *Институт химии растительных веществ им. акад. С.Ю. Юнусова АН
РУз, ул. М. Улугбека, 77, Ташкент, 100170 (Узбекистан),
e-mail: rfm8@yandex.ru*

² *Институт биоорганической химии им. акад. А. Садыкова АН РУз,
ул. М. Улугбека, 83, Ташкент, 100143, (Узбекистан)*

Разработана методика качественного и количественного анализа артеаннуина В в растительной массе травы *Artemisia annua* ВЭЖХ-УФ методом, которая пригодна по своим валидационным характеристикам, таким как параметры специфичности (сходимости времен удерживания артеаннуина В в стандарте и пробе), пригодности хроматографической системы (эффективности разделения), линейности ($R^2=0.99929$ при $y=9.38x+245.98$), диапазона применения (от 50 до 150%), точности в условиях повторяемости ($RSD = 3.45\%$) и правильности ($Z=100.36\pm 0.56\%$), определенные экспериментальным путем, находятся в пределах рекомендуемых значений. Чистота выделенного артеаннуина В подтверждена ИК-, ¹H ЯМР-, ¹³C ЯМР-спектральными данными. Определены органолептические и физико-химические показатели. Установлено, что в стандартном образце артеаннуина В допускается наличие примесей в количестве не более 1%. Установлено, что содержание артеаннуина В в растительном сырье травы *Artemisia annua* должно быть не менее 0.2%. Разработанная методика количественного определения артеаннуина В может быть использована для стандартизации травы *Artemisia annua*.

Ключевые слова: *Artemisia annua* L, сесквитерпеновые лактоны, артеаннуин В, ВЭЖХ.

Исследования проводились в рамках проекта № ПЗ-20170928186 «Разработка технологии получения субстанции и лекарственной формы комплексного противогельминтного препарата «Гельминтабс» широкого спектра действия» (2018–2020 гг.).

Введение

Мухаматханова Римма Фаильевна – PhD по химическим наукам, старший научный сотрудник лаборатории химии кумаринов и терпеноидов, e-mail: gimmaraya@rambler.ru, rfm8@yandex.ru

Узбеков Вячеслав Вадимович – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории химии белков и пептидов, e-mail: via74@yandex.ru

Муталова Дилноза Каримбердиевна – младший научный сотрудник экспериментально-технологической лаборатории, e-mail: noza-gold@mail.ru

Маматханова Мунирахон Ахматхон кизи – кандидат технических наук, старший научный сотрудник экспериментально-технологической лаборатории, e-mail: munir_05@mail.ru

Шамьянов Ильдар Джамильевич – заведующий лабораторией химии кумаринов и терпеноидов, e-mail: i.shamyanov@mail.ru

Халилов Рашиданжон Муратджанович – доктор технических наук, ведущий научный сотрудник экспериментально-технологической лаборатории, e-mail: r.m.khalilov@mail.ru

Artemisia annua L. – полынь однолетняя принадлежит подроду *Artemisia* рода *Artemisia* (Asteraceae). Данный вид полыни наиболее широко распространен на равнинах и предгорьях Ташкентской, Андижанской, Ферганской, Наманганской и Сырдарьинской областей Узбекистана. Основными вторичными метаболитами, продуцируемыми полынью однолетней, являются биологически активные сесквитерпеновые лактоны [1–4], среди которых мажорными лактонами *Artemisia annua* являются артемизинин (1) и артеаннуин В (2) (рис. 1) [5].

В настоящее время артемизинин и его производные (артеметер, артезунат и др.) находят широкое применение в медицинской практике как эф-

* Автор, с которым следует вести переписку.

фективные противопаразитарные и противоопухолевые препараты [6–9]. В последние годы интенсифицированы исследования экстрактов полыни однолетней, а также индивидуальных сесквитерпеновых лактонов артемизинина и артеаннуина В для выявления их противомикробной [10] и противогельминтной активностей [11–13]. Исследованиями показано, что артемизинин и артеаннуин В обладают высокими противогельминтными свойствами. Отмечено, что по антигельминтной активности артеаннуин В превышает артемизинин. Кадинанолид артеаннуин В входит в состав разрабатываемого в Институте химии растительных веществ Академии наук Республики Узбекистан комплексного противогельминтного препарата широкого спектра действия «Гельминтабс». Согласно вышеизложенному, трава полыни однолетней, несомненно, представляет интерес для медицинской практики. Одним из разделов внедрения лекарственного сырья в практику является разработка методик оценки его качества (стандартизация) [14].

Согласно литературным данным, разработаны различные методы количественного определения артемизинина в полыни однолетней [15–22].

Однако для биологически активного сесквитерпенового лактона кадинанового типа артеаннуина В (2), обладающего высокой противопаразитарной активностью, качественная и количественная методики оценки его содержания в траве полыни однолетней не разработаны.

Цель данного исследования – разработка и валидация ВЭЖХ-УФ методики определения содержания артеаннуина В в траве полыни однолетней, согласно современным требованиям с возможностью включения в проекты нормативно-технической документации.

Экспериментальная часть

Растительный материал. Для проведения исследований использовали траву *Artemisia annua* L., собранную в Ташкентской области Узбекистана в 2018–2019 гг. Видовую принадлежность растения определил заведующий лабораторией лекарственно-технических растений Института химии растительных веществ АН РУз, канд. биол. наук А.М. Нигматуллаев сопоставлением собранных гербарных образцов с гербарным материалом *Artemisia annua* L., хранящихся в Центральном гербарии Узбекистана (объединенные гербарии Ташкентского государственного университета и Института ботаники АН РУз).

Получение рабочего стандартного образца (PCO) артеаннуина В. Воздушно-сухую измельченную траву *Artemisia annua* (1.250 кг) экстрагировали пятикратно смесью экстракционного бензина с хлороформом (95 : 5) в соотношении сырье-экстрагент 1 : 6 (вес-объем) с контактом фаз 8 ч. Объединенные экстракты сгущали на роторном испарителе до 1/10 от первоначального объема. Затем для осаждения балластных веществ сгущенный экстракт обрабатывали горячей водой в соотношении 2 : 1 (объем-объем). Оставляли на сутки. Выпавший осадок отделяли на нутч-филт্রে. Сесквитерпеновые лактоны из спирто-водного филтраты извлекали органическим растворителем хлороформом, который затем сгущали до минимального объема. Сгущенную смолку перемешивали с активной окисью алюминия в соотношении 1 : 1 (вес-вес) и хроматографировали на колонке с активной окисью алюминия. Колонку промывали бензином для удаления липофильных соединений. При промывании колонки смесью бензин-этилацетат 95 : 5 выделили артемизинин, затем при промывании колонки смесью бензин-этилацетат 9 : 1 – артеаннуин В. Контроль проводили методом ТСХ. При этом получили 5 г технического артеаннуина В.

Для аналитических исследований и стандартизации сырья требуется наличие PCO артеаннуина В,

который получали следующим образом: 5 г полученного по вышеописанной методике технического артеаннуина В помещали количественно в грушевидную колбу, куда приливали также 5 мл смеси экстракционного бензина и этилацетата в объемном соотношении 9 : 1. Колбу помещали на водяную баню с обратным холодильником и доводили раствор до кипения растворителя. По каплям добавляли в колбу смесь экстракционного бензина и этилацетата 9 : 1 до полноты растворения кристаллов. Грушевидную колбу вынимали из бани, закрывали притертой крышкой и оставляли до полного осты-

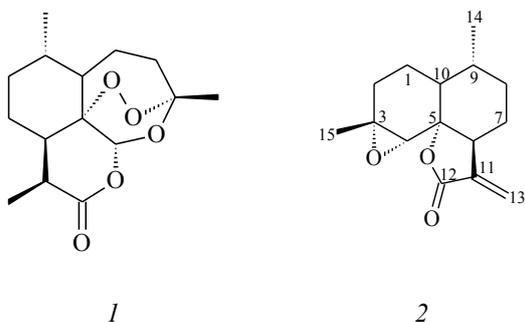


Рис. 1. Сесквитерпеновые лактоны артемизинин (1) и артеаннуин В (2)

вания. Затем выпавшие кристаллы отфильтровывали на воронке Бюхнера под вакуумом, промывали холодной смесью экстракционного бензина и этилацетата 9 : 1, сушили в сушильном шкафу при 40 °С и получили 4.5 г артеаннуина В. Затем 4.5 г артеаннуина В аналогично перекристаллизовывали из смеси экстракционного бензина и этилацетата в объемном соотношении 9 : 1, при этом получили 3.7 г РСО артеаннуина В.

Качественные характеристики.

1. На хроматографическую пластинку «Силуфол» УФ-254 (10×15) наносят в виде полосы длиной 3 см 0.05 мл спиртового извлечения сырья полыни, рядом – полоса – 0.05 мл (100 мкг) раствора РСО артеаннуина В. Пластинку с нанесенными пробами высушивают на воздухе в течение 1 часа и хроматографируют восходящим способом в камере, предварительно насыщенной смесью растворителей бензол – спирт (9 : 1) в течение 30 мин. Когда фронт растворителей дойдет до финиша, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе 10–15 мин и опрыскивают 1% раствором ванилина в концентрированной серной кислоте. На уровне пятна свидетеля должно проявиться пятно голубого цвета (артеаннуин В) с $R_f = 0.42$.

2. В ИК-спектре спиртового извлечения должна наблюдаться интенсивная полоса поглощения карбонильной группы лактонного цикла при длине 1769 см^{-1} .

ВЭЖХ-УФ методика количественного определения артеаннуина В.

Приготовление раствора стандартного образца (стандартный раствор). Около 20 мг артеаннуина В (точная навеска) помещали в мерную колбу объемом 10 мл. Растворяли в 3 мл ацетонитрила при легком нагревании, затем доводили до метки тем же растворителем, перемешивали. Из данного первичного стандартного раствора с концентрацией артеаннуина В 2 мг/мл разведением готовили остальные стандартные растворы, необходимые при калибровке.

Приготовление аналитической пробы сырья (испытуемый раствор). Около 10 г (точная навеска) измельченного сырья помещали в патрон из фильтровальной бумаги и экстрагировали в аппарате Сокслета 96%-ным этиловым спиртом в течение 16 ч. Полученный раствор переливали в мерную колбу объемом 200 мл и доводили 96% этиловым спиртом до метки (раствор А). 0.5 мл раствора А разбавляли 4.5 мл 96% этилового спирта и перемешивали. Полученный раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0.45 мкм в специализированные флаконы для ВЭЖХ анализа.

Условия хроматографирования. Жидкостная хроматография проводилась на жидкостном хроматографе высокого давления Agilent 1100 series (Agilent Technologies Inc., США), оснащенном 4-градиентным насосом, дегазатором, петлевым инжектором и детектором с переменной длиной волны (VWD) в следующих условиях: колонка Supelco Discovery HSC 18 (4.6×75 мм), оснащенная предколонкой Discovery HS C18 (2 см × 4 мм, 3 мкм, 120А); зернение сорбента – 3 мкм; подвижная фаза – 50% ацетонитрил в бидистиллированной воде (об.); скорость потока – 1 мл/мин; детекция – УФ 220 нм; время удерживания артеаннуина В – 4.2 мин; объем образца – 5 мкл.

Содержание артеаннуина В в процентах определяется по формуле

$$X = \frac{S_{\text{исп}} \cdot m_{\text{std}} \cdot V_{\text{исп}} \cdot C}{S_{\text{std}} \cdot m_{\text{исп}} \cdot V_{\text{std}} (100 - W)} \cdot 100,$$

где $S_{\text{исп}}$ – значение площади пика артеаннуина В, вычисленное из хроматограмм испытуемого раствора; S_{std} – значение площади пика артеаннуина В, вычисленное из хроматограммы раствора РСО артеаннуина В; m_{std} – масса навески РСО, в граммах; $m_{\text{исп}}$ – масса навески сырья, в граммах; $V_{\text{исп}}$ – объем разведения испытуемого раствора, в мл; V_{std} – объем разведения РСО артеаннуина В, в мл; C – концентрация РСО артеаннуина В, в %; W – влажность сырья, в %.

Результаты и их обсуждение

Для определения содержания артеаннуина В в траве *Artemisia annua* (далее сырье) нами разработан метод количественного определения артеаннуина В методом ВЭЖХ с УФ-детектором.

Количественное определение артеаннуина В проводят методом ВЭЖХ с использованием внешнего стандарта. Для этого используют РСО соответствующей чистоты. Из 1.250 кг сырья нами получено 3.7 г артеаннуина В 99% чистоты, которая подтверждается спектральными данными (ИК-, ^1H ЯМР, ^{13}C ЯМР):

– ИК (KBr , ν_{max} , см^{-1}): 2976, 2962, 2930, 2887, 2868, 1769, 1675, 1456, 1421, 1382, 1263, 1208, 1186, 1159, 1146, 1112, 1075, 991, 962, 947, 930, 914, 865, 840, 804, 760, 716, 697, 603, 541, 517, 425, 409.

– ^1H ЯМР (400 МГц, CDCl_3 , $\delta\text{T}_{\text{H}}$): 0.92 (3H, d, $J = 6.13$, H-14), 1.27 (3H, s, H-15), 1.2 (1H, m, H-8a), 1.34 (1H, m, H-1a), 1.38-1.52 (3H, m, H-1b, H-7a, H-8b), 1.58-1.74 (2H, m, H-2a, H-7b), 1.78-1.88 (2H, m, H-2b, H-9), 2.00 (1H, ddd, $J = 2.85, 3.95, 13.15$, H-10), 2.62 (1H, s, H-4), 2.68 (1H, ddd, $J = 3.07, 6.14, 12.27$, H-6), 5.37 (1H, d, $J = 3.07$, H-13a), 6.08 (1H, d, $J = 3.06$, H-13b).

– ^{13}C ЯМР (77.23 МГц, CDCl_3 , $\delta\text{T}_{\text{C}}$): 16.35 (C-1), 18.65 (C-14), 21.78 (C-15), 22.86 (C-7), 24.40 (C-2), 30.72 (C-9), 33.96 (C-8), 43.68 (C-10), 52.80 (C-6), 58.50 (C-4), 58.75 (C-3), 81.21 (C-5), 117.81 (C-13), 138.61 (C-11), 170.10 (C-12).

Органолептические и физико-химические показатели артеаннуина В приведены в таблице 1.

Для оценки линейности при калибровке прибора по стандарту РСО артеаннуина В снимали на ВЭЖХ при различных концентрациях (рис. 2).

На основе полученных данных был построен калибровочный график, согласно которому установили, что полученная прямая подчиняется закону Бугера-Ламберта-Бера (рис. 3).

Таблица 1. Органолептическая и физико-химическая характеристика стандартного образца артеаннуина В

Наименование показателей	Метод	Нормы
Описание	Визуально	Белый или белый с кремоватым оттенком кристаллический порошок
Растворимость	ГФ XI	Растворим в бензоле, этилацетате, ацетоне, этаноле. Практически нерастворим в воде очищенной
Качественные реакции	1. ИК-спектроскопия 2. Ультрафиолетовый спектр спиртового раствора артеаннуина В в области от 220 до 340 нм 3. Подтверждение изопреноидной структуры артеаннуина В реакцией с раствором ванилина в серной кислоте.	1. Наличие полос поглощения 1769 (C=O γ -лактона и ацетата), 1675, 1456, 1146 (α,β -ненасыщенный γ -лактон), 1634, 1263 (C=C). 2. Наличие максимума поглощения при 214 нм. 3. Появление голубой окраски
Температура плавления	ГФ XI	152–154 °C
Потеря в массе при высушивании	ГФ XI	Не более 1.0%
Сульфатная зола	ГФ XI	Не более 0.5%
Тяжелые металлы	ГФ XI	Не более 0.001%

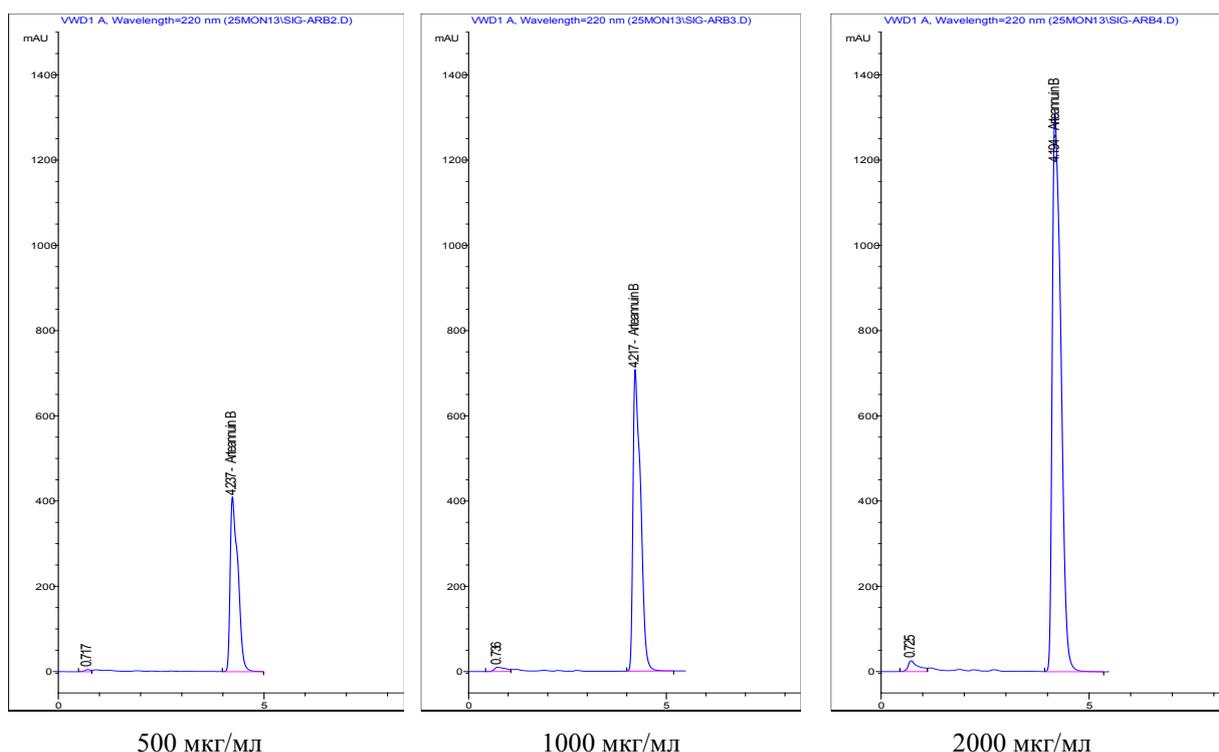


Рис. 2. Хроматограммы ВЭЖХ РСО артеаннуина В при различных концентрациях

Полученные результаты анализов пяти образцов артеаннуина В колеблются от 99.0 до 100%. При этом в стандартном образце артеаннуина В допускается наличие примесей в количестве не более 1%.

Последующий анализ аналитической пробы сырья проводили в тех же условиях, что и анализ стандартного образца артеаннуина В (рис. 4). Расчет содержания артеаннуина В в сырье вели по предварительно построенной калибровочной кривой, полученной анализом известной концентрации вещества.

По разработанной методике количественного определения артеаннуина В в траве *Artemisia annua* методом ВЭЖХ проведен анализ 3 образцов сырья с повторностью $n = 6$ (табл. 2).

Валидацию методики количественного определения артеаннуина В в аналитической пробе травы полыни однолетней проводили по параметрам специфичность, характеристика пригодности хроматографической системы, линейность, воспроизводимость и правильность.

1. *Специфичность методики.* При проведении исследования установлено, что время удерживания артеаннуина В в стандартах и аналитической пробе составляет $RT=4.2$ мин, с отклонением в обе стороны $<1\%$. Пики примесей растворителя и фоновых веществ не мешают его определению.

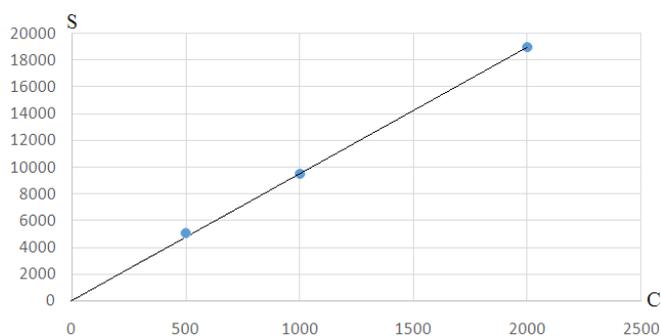


Рис. 3. Калибровочный график

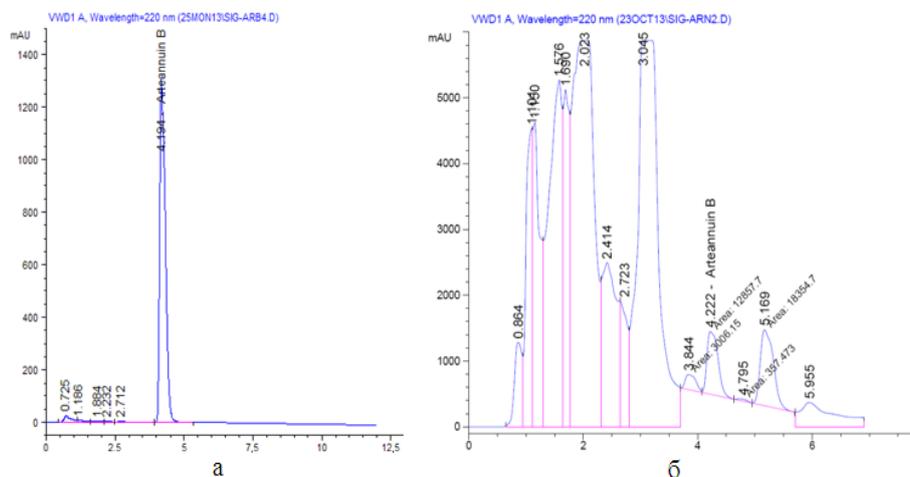


Рис. 4. Хроматограмма ВЭЖХ растворов РСО артеаннуина В (а) и аналитической пробы травы *Artemisia annua* (б)

Таблица 2. Анализ образцов травы *Artemisia annua* методом ВЭЖХ

№ повторности	Содержание артеаннуина В в образцах сырья			Метрологическая характеристика
	1 образец, %	2 образец, %	3 образец, %	
1	0.282	0.316	0.294	$\bar{x}=0.290$ $S^2=0.0000908$ $S=0.0095$ $\pm\Delta x=0.0099$ $\pm\varepsilon, RSD_{анлт}=3.45\%$
2	0.301	0.309	0.302	
3	0.295	0.306	0.315	
4	0.300	0.297	0.307	
5	0.278	0.313	0.298	
6	0.285	0.295	0.310	
Среднее значение, %	0.290	0.306	0.304	

2. Характеристики пригодности хроматографической системы:

А) Коэффициент симметрии пика артеаннуина В в стандарте $T_{std}=1.42-1.44$ и в аналитической пробе $T_{пр}=1.82 (\leq 2.0)$

Б) Коэффициент разделения $R_s=2.5 (> 2.0)$

В) Эффективность колонки по артеаннуину В, $N=5.54 (RT/W_{h/2})^2=1539$ т.т. (> 1000)

Г) Воспроизводимость площадей пиков стандарта 2000 мкг/мл (по 5 анализам)

$RSD_{std}=0.68\% (\leq 2.0\%)$

3. *Линейность* на 3 уровнях концентраций в диапазоне 500–2000 мкг/мл: коэффициент корреляции между концентрацией и площадью пика в данном диапазоне составлял $R^2=0.99929 (> 0.995)$ при $y=9.38x+245.98$. Диапазон экспериментальных данных, удовлетворяющих линейной модели, в интервале концентраций от 50 до 150% рассматривали как аналитическую область методики.

4. *Воспроизводимость* по аналиту (6 анализов) $RSD_{анлт}=3.45\%$

5. *Правильность* (recovery) по 3 анализам артеаннуина В в растительной массе травы: $Z=100.36\pm 0.56\%$.

Таким образом, разработанная методика качественного и количественного анализа артеаннуина В в растительной массе травы *Artemisia annua* методом ВЭЖХ пригодна по своим валидационным характеристикам, таким как параметры специфичности (сходимости времен удерживания артеаннуина В в стандарте и пробе), пригодности хроматографической системы (эффективности разделения), линейности ($R^2=0.99929$ при $y=9.38x+245.98$), диапазона применения (от 50 до 150%), точности в условиях повторяемости ($RSD = 3.45\%$) и правильности ($Z=100.36\pm 0.56\%$), определенные экспериментальным путем, находятся в пределах рекомендуемых значений.

В результате количественного анализа экстракта полыни однолетней с помощью валидированной методики установлено, что содержание артеаннуина В в сырье должно быть не менее 0.2%. Разработанная методика количественного определения артеаннуина В может быть использована для стандартизации травы *Artemisia annua*.

Выводы

Разработана методика качественного и количественного анализа артеаннуина В в растительной массе травы *Artemisia annua* ВЭЖХ-УФ методом, которая пригодна по своим валидационным характеристикам, таким как параметры специфичности, пригодности хроматографической системы, линейности, диапазона применения, точности в условиях повторяемости и правильности, определенные экспериментальным путем, находятся в пределах рекомендуемых значений.

Чистота выделенного артеаннуина В подтверждена ИК-, 1H ЯМР-, ^{13}C ЯМР-спектральными данными. Определены органолептические и физико-химические показатели. Установлено, что в стандартном образце артеаннуина В допускается наличие примесей в количестве не более 1%.

Установлено, что содержание артеаннуина В в сырье, приготовленном из травы *Artemisia annua*, должно быть не менее 0.2%.

Разработка и валидация ВЭЖХ-УФ методики определения содержания артеаннуина В в траве полыни однолетней, согласно современным требованиям, может быть использована в проектах нормативно-технической документации.

Список литературы

1. Коновалов Д.А., Шевчук О.М., Логвиненко Л.А., Хамилонов А.А. Биологически активные соединения полыни однолетней. Сесквитерпеновые лактоны // Фармация и фармакология. 2016. Т. 4. №5. С. 4–35. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-5-4-35.
2. Махатов Б.К., Патсаев А.К., Коновалов Д.М., Алиханова Х.Б., Орынбасарова К.К., Сапакбай М.М., Рахманова Г.С. Обзор химического состава, биологических свойств растений полынь // Вестник Казахской академии естественных наук. 2017. №3. С. 86–90.
3. Коновалов Д.А., Тираспольская С.Г., Алфимова Г.В., Саморядова А.Б. Изучение корней полыни однолетней с целью создания новых лекарственных средств отечественного производства // Современные проблемы науки и образования. 2013. №4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9735>.

4. Weathers P.J., Arsenault P.R., Covello P.S., McMickle A., Teoh K.H., Reed D.W. Artemisinin production in *Artemisia annua*: studies *in planta* and results of a novel delivery method for treating malaria and other neglected diseases // *Phytochem Rev.* 2011. Vol. 10. Pp. 173–183. DOI: 10.1007/s11101-010-9166-0.
5. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование / под ред. П.Д. Солодова. СПб., 1993. Т. 7. 361 с.
6. Chaturvedi D., Goswami A., Saikia P.P., Barua N.C., Rao P.G. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents // *Chem. Soc. Rev.* 2010. Vol. 39(2). Pp. 435–454. DOI: 10.1039/b816679j.
7. Meunier B., Robert A. Heme as Trigger and Target for Trioxane-Containing Antimalarial Drugs // *Acc. Chem. Res.* 2010. Vol. 43(11). Pp. 1444–1451. DOI: 10.1021/ar100070k.
8. Nakase I., Lai H., Singh N.P., Sasaki T. Anticancer properties of artemisinin derivatives and their targeted delivery by transferrin conjugation // *Int. J. Pharm.* 2008. Vol. 354(1). Pp. 28–33. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.09.003.
9. Chang Z. The discovery of Qinghaosu (artemisinin) as an effective anti-malaria drug: A unique China story // *Sci. China Life Sci.* 2016. Vol. 59. N1. Pp. 81–88. DOI: 10.1007/s11427-015-4988-z.
10. Klayman D.L. Effect and Tolerability of the Combined Plant Extract (PAC) in Treatment of Acne Vulgaris // *Science.* 1985. Vol. 228. N4703. Pp. 1049–1055. DOI: 10.1126/science.3887571.
11. Исламова Ж.И., Мухаматханова Р.Ф., Дусматова Д.Э., Шамьянов И.Д., Хушбактова З.А., Сыров В.Н. Лактоны *Artemisia annua* как перспективные антигельминтные средства // Доклады Академии наук РУз. 2017. №5. С. 78–81.
12. Исламова Ж.И., Шамьянов И.Д., Хушбактова З.А., Сыров В.Н. Об антигельминтных свойствах сесквитерпеновых лактонов // Журнал теоретической и клинической медицины. 2019. №4. С. 11–14.
13. Zhang Y.Q., Ding W., Zhao Zhi-Mo, Wu J., Fan Y.-H. Studies on acaricidal bioactivities of *Artemisia annua* L. extracts against *Tetranychus cinnabarinus* Bois. (Acari: Tetranychidae) // *Agricultural Sciences in China.* 2008. Vol. 7. N5. Pp. 577–584.
14. Куркина А.В. Современная стандартизация как методологическая основа рационального использования ресурсов лекарственных растений, содержащих флавоноиды // Известия Самарского центра Российской академии наук. 2012. Т. 14. №1(9). С. 2253–2256.
15. Olsson M.E., Olofsson L.M., Lindahl A.-L., Lungren A., Brodelius M., Brodelius P.E. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L // *Phytochemistry.* 2009. Vol. 70. Pp. 1123–1128. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.009.
16. Covello P.S., Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., Nowak G. Functional genomics and biosynthesis of artemisinin // *Phytochemistry.* 2007. Vol. 68. Pp. 1864–1871. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.016.
17. Diawara H.Z., Gbaguidi F., Evrard B., Leclercq J.Q., Moudachirou M., Debrus B., Hubert P., Rozet E. Validation, transfer and measurement uncertainty estimation of an HPLC-UV method for the quantification of artemisinin in hydro alcoholic extracts of *Artemisia annua* L. // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2011. Vol. 56. N1. Pp. 7–15. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.04.012.
18. Edwards G. Measurement of artemisinin and its derivatives in biological fluids // *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1994. Vol. 88. Pp. 37–39. DOI: 10.1016/0035-9203(94)90470-7.
19. Widmer V., Handloser D., Reich E. Quantitative HPTLC Analysis of Artemisinin in Dried *Artemisia annua* L.: A Practical Approach // *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.* 2007. Vol. 30. N15. Pp. 2209–2219. DOI: 10.1080/10826070701451555.
20. Lapkin A.A., Walker A., Sullivan N., Khambay B., Mlambo B., Chemat S. Development of HPLC analytical protocol for artemisinin quantification in plant materials and extracts summary // Summary of Report on the Medicines for Malaria Ventures Supported Project. 2009. 7 p.
21. Соктоева Т.Э., Рыжова Г.Л., Дычко К.А., Хасанов В.В., Жигжитжапова С.В., Раднаева Л.Д. Содержание артемизинина в экстрактах *Artemisia annua* L., полученных различными методами // Химия растительного сырья. 2011. №4. С. 131–134.
22. The International Pharmacopoeia. Ninth Edition, 2019. 3 p.

Поступила в редакцию 23 сентября 2020 г.

После переработки 30 октября 2020 г.

Принята к публикации 5 марта 2021 г.

Для цитирования: Мухаматханова Р.Ф., Узбеков В.В., Муталова Д.К., Маматханова М.А., Шамьянов И.Д., Халилов Р.М. Количественное определение лактона артеаннуина методом ВЭЖХ в траве *Artemisia annua* // Химия растительного сырья. 2021. №3. С. 163–170. DOI: 10.14258/jcrpm.2021038476.

Mukhamatkhonova R.F.^{1*}, Uzbekov V.V.², Mutalova D.K.¹, Mamatkhonova M.A.¹, Sham'yanov I.D.¹, Khalilov R.M.¹
 QUANTITATIVE DETERMINATION OF ARTEANNUIN B – A SESQUITERPENE LACTONE FROM ARTEMISIA ANNUA

¹ Acad. S. Yu. Yunusov Institute of the Chemistry of Plant Substances Uzbek Academy of Sciences, ul. Mirzo Ulugbeka, 77, Tashkent, 100170 (Uzbekistan), e-mail: rfm8@yandex.ru

² Acad. A. Sadykov Institute of the Bioorganic Chemistry Academy of Sciences, ul. Mirzo Ulugbeka, 83, Tashkent, 100143 (Uzbekistan)

The HPLC (High performance liquid chromatography) method for the determination of arteannuin B in the herb *Artemisia annua* has been developed. The method is suitable for its validation characteristics, such as specificity parameters (convergence of the retention times of arteannuin B in the standard and sample), suitability of the chromatographic system (separation efficiency), linearity ($R^2 = 0.99929$ at $y = 9.38x + 245.98$), range of application (from 50 to 150%), accuracy in terms of repeatability ($RSD = 3.45\%$) and correctness ($Z = 100.36 \pm 0.56\%$), determined experimentally, are within the recommended values. As a marker compound, it was proposed to use a standard sample of arteannuin B. For this, a standard sample of arteannuin B was obtained with a purity of at least 99%, which is confirmed IR, ¹HNMR, ¹³CNMR spectral data. Organoleptic and physico-chemical parameters were determined. It has been established that the presence of impurities in an amount of not more than 1% is allowed in a standard sample of arteannuin B. It was established that the content of arteannuin B in the raw material should be at least 0.2%. The development and validation HPLC-UV method for the determination of arteannuin B have to used to standardization the herb of *Artemisia annua*.

Keywords: *Artemisia annua* L, sesquiterpene lactone, arteannuin B, HPLC.

References

- Kononov D.A., Shevchuk O.M., Logvinenko L.A., Khamilonov A.A. *Farmatsiya i farmakologiya*, 2016, vol. 4, no. 5, pp. 4–35. DOI: 10.19163/2307-9266-2016-4-5-4-35. (in Russ.).
- Makhatov B.K., Patsayev A.K., Kononov D.M., Alikhanova Kh.B., Orynbasarova K.K., Sapakbay M.M., Rakhmanova G.S. *Vestnik Kazakhstanskoy akademii yestestvennykh nauk*, 2017, no. 3, pp. 86–90. (in Russ.).
- Kononov D.A., Tiraspol'skaya C.G., Alfimova G.V., Samoryadova A.B. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*, 2013, no. 4. URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9735>. (in Russ.).
- Weathers P.J., Arsenault P.R., Covello P.S., McMickle A., Teoh K.H., Reed D.W. *Phytochem Rev.*, 2011, vol. 10, pp. 173–183. DOI: 10.1007/s11101-010-9166-0.
- Rastitel'nyye resursy SSSR. Tsvetkovyye rasteniya, ikh khimicheskiy sostav, ispol'zovaniye* [Plant resources of the USSR. Flowering plants, their chemical composition, use], ed. P.D. Sokolov. St.-Petersburg, 1993, vol. 7, 361 p. (in Russ.).
- Chaturvedi D., Goswami A., Saikia P.P., Barua N.C., Rao P.G. *Chem. Soc. Rev.*, 2010, vol. 39(2), pp. 435–454. DOI: 10.1039/b816679j.
- Meunier B., Robert A. *Acc. Chem. Res.*, 2010, vol. 43(11), pp. 1444–1451. DOI: 10.1021/ar100070k.
- Nakase I., Lai H., Singh N.P., Sasaki T. *Int. J. Pharm.*, 2008, vol. 354(1), pp. 28–33. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.09.003.
- Chang Z. *Sci. China Life Sci.*, 2016, vol. 59, no. 1, pp. 81–88. DOI: 10.1007/s11427-015-4988-z.
- Klayman D.L. *Science*, 1985, vol. 228, no. 4703, pp. 1049–1055. DOI: 10.1126/science.3887571.
- Islamova Zh.I., Mukhamatkhonova R.F., Dusmatova D.E., Sham'yanov I.D., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N. *Doklady Akademii Nauk RUz*, 2017, no. 5, pp. 78–81. (in Russ.).
- Islamova Zh.I., Sham'yanov I.D., Khushbaktova Z.A., Syrov V.N. *Zhurnal teoreticheskoy i klinicheskoy meditsiny*, 2019, no. 4, pp. 11–14. (in Russ.).
- Zhang Y.Q., Ding W., Zhao Zhi-Mo, Wu J., Fan Y.-H. *Agricultural Sciences in China*, 2008, vol. 7, no. 5, pp. 577–584.
- Kurkina A.V. *Izvestiya Samarskogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2012, vol. 14, no. 1(9), pp. 2253–2256. (in Russ.).
- Olsson M.E., Olofsson L.M., Lindahl A.-L., Lungren A., Brodelius M., Brodelius P.E. *Phytochemistry*, 2009, vol. 70, pp. 1123–1128. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.07.009.
- Covello P.S., Teoh K.H., Polichuk D.R., Reed D.W., Nowak G. *Phytochemistry*, 2007, vol. 68, pp. 1864–1871. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.02.016.
- Diawara H.Z., Gbaguidi F., Evrard B., Leclercq J.Q., Moudachirou M., Debrus B., Hubert P., Rozet E. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011, vol. 56, no. 1, pp. 7–15. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.04.012.
- Edwards G. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 1994, vol. 88, pp. 37–39. DOI: 10.1016/0035-9203(94)90470-7.
- Widmer V., Handloser D., Reich E. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2007, vol. 30, no. 15, pp. 2209–2219. DOI: 10.1080/10826070701451555.
- Lapkin A.A., Walker A., Sullivan N., Khambay B., Mlambo B., Chemat S. *Summary of Report on the Medicines for Malaria Ventures Supported Project*, 2009. 7 p.
- Soktoyeva T.E., Ryzhova G.L., Dychko K.A., Khasanov V.V., Zhigzhitzhapova S.V., Radnayeveva L.D. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2011, no. 4, pp. 131–134. (in Russ.).
- The International Pharmacopoeia*. Ninth Edition, 2019, 3 p.

Received September 23, 2020

Revised October 30, 2020

Accepted March 5, 2021

For citing: Mukhamatkhonova R.F., Uzbekov V.V., Mutalova D.K., Mamatkhonova M.A., Sham'yanov I.D., Khalilov R.M. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2021, no. 3, pp. 163–170. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2021038476.

* Corresponding author.