УДК 615.07:615.32:543.544.943.3.068.7 DOI: 10.32352/0367-3057.5.20.08
К. О. ХОХЛОВА (http://orcid.org/0000-0002-7151-6763), канд. фарм. наук, доцент
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБЛЕННЯ УНІФІКОВАНИХ ВЕТШХ МЕТОДИК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У НАСТОЙКАХ

Ключові слова: настойка, високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), ідентифікація, флавоноїди, фенілпропаноїди

K. O. KHOKHLOVA (http://orcid.org/0000-0002-7151-6763)
National University of Pharmacy, Kharkiv

DEVELOPMENT OF HARMONIZED HPTLC METHODS FOR DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF TINCTURES

Key words: tincture, high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), identification, flavonoids, phenylpropanoids

Традиційною і широко розповсюдженою рідкою лікарською формою для фармацевтичного ринку України є настойки, виготовлені з лікарської рослинної сировини (ЛРС) [1]. Пропозиції лікарських рослинних засобів (ЛРЗ) у формі настойок надходять від 14 різних вітчизняних виробників у кількості 21 найменування [1], із них окремі монографії Державної фармакопеї України (ДФУ) наявні тільки для 6 найменувань, для 11 найменувань – наявні монографії на вихідну сировину, для 4 найменувань – відсутні монографії як на настойки, так і на вихідну сировину [2].

Згідно з ДФУ чи методами контролю якості (МКЯ) на ЛРЗ, у разі стандартизації більшості настойок контролюють наявність і/чи вміст поліфенольних сполук, таких як флавоноїди і фенілпропаноїди, та терпеноїдів, таких як ефірні олії, тритерпеноїди, сесквітерпени та ін. [2]. Відомо, що фенілпропаноїди (похідні гідроксикоричних кислот) та флавоноїди відповідають за широкий спектр фармакологічної дії [3, 4].

Зазвичай, ідентифікацію флавоноїдів і фенілпропаноїдів здійснюють одночасно. Для цього Європейська фармакопея (ЄФ) і ДФУ застосовують уніфіковані рухомі фази на речовини флавоноїдної природи [2, 5]. Однак, у разі ідентифікації поліфенольних речовин різних рослин застосовують різні умови хроматографування: рухомі фази, проявники, режими виявлення та ін., що унеможливлює виконання паралельного аналізу декількох засобів одночасно, а систематичні хроматографічні дослідження різних настойок в однакових умовах відсутні. До того ж, класичний метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) переважно застосовують для паралельного аналізу невеликої кількісті зразків, у той час як у разі нанесення зразків на пластину для високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) із розміром частинок 2–10 мкм за стандартизованою процедурою ВЕТШХ [2, 5] є можливість здійснювати аналіз до 15 зразків паралельно, а одержані результати є відтворюваними. Зважаючи на природу екстрагента настойок – спирто-водні розчини різної концентрації, визначення флавоноїдних сполук і фенілпропаноїдів є цікавим і для тих настойок, вихідна ЛРС якої стандартизується і за іншими класами біологічно-активних речовин (БАР).

Метою роботи було визначення і порівняння хроматографічних знімків і профілей ВЕТШХ флавоноїдів і фенілпропаноїдів 10 настойок вітчизняного виробництва в уніфікованих рухомих фазах, виокремлення маркерних зон кожної настойки, визначення придатності використання заданих хроматографічних умов для стандартизації та можливості виконання в цих умовах паралельного контролю якості декількох різних настойок.

© К. О. Хохлова, 2020

Матеріали та методи дослідження

Дослідження було виконано на базі 2 лабораторій (CAMAG, Мутенц, Швейцарія і Навчально-наукового тренінгового центру хіміко-технологічних досліджень Навчально-наукового інституту прикладної фармації (ННТЦХТД ННІПФ) НФаУ) із використанням системи ВЕТШХ для рослинних засобів виробництва CAMAG, Швейцарія. Обробка даних була забезпечена з використанням ПЗ Vision CATS 2.5 (CAMAG, Швейцарія).

В аналіз було включено 10 широко розповсюджених настойок із фармацевтичного ринку України, а саме: Настойка глоду (ТОВ «Тернофарм», сер. 110910, сер. 90910); Настойка м'яти перцевої (ПРаТ ФФ «Віола», сер. 040619, сер. 080919); Настойка шавлії (ТОВ «ДКП "Фармацевтична фабрика"», сер. 10719, сер. 10319); Настойка пустирника (ПРаТ «ФІТОФАРМ», сер. 90319, сер. 160719); Настойка календули (ПРаТ «ФІТОФАРМ», сер. 190519, ПРаТ ФФ «Віола», сер. 120319); Настойка софори японської (ТОВ «ДКП "Фармацевтична фабрика"», сер. 10419, ПРаТ «ФІТОФАРМ», сер. 20818); Настойка ехінацеї пурпурової (ПРаТ ФФ «Віола», сер. 060919, ТОВ «ДКП "Фармацевтична фабрика"», сер. 10219); Настойка валеріани (ПРаТ «ФІТОФАРМ», сер. 250819, сер. 100319); Настойка півонії (ТОВ «ДКП "Фармацевтична фабрика"», сер. 10819, ТОВ «ДКП "Фармацевтична фабрика"», сер. 10519); Настойка евкаліпта (ПРаТ ФФ «Віола», сер. 050919, сер. 020219).

Були застосовувані різні стандартні зразки (СЗ): рутин (USP, сер. H1I146), гіперозид (USP, сер. 33520F), кислота розмаринова (USP, сер. F0M076), кислота кофейна (TCI, сер. C0002), кислота хлорогенова (EDQM, A0290470).

Методика

Підготовка проби: ступінь розведення настойки, що відповідає 100 мг/мл вихідної сировини ЛРЗ. Об'єм нанесення було підібрано індивідуально для кожної настойки.

Розчини порівняння: 0,5 мг/мл СЗ рутину у метанолі Р, 0,2 мг/мл СЗ кислоти розмаринової у метанолі Р. Додатково було застосовувано розчини інших стандартних зразків, специфічних для різних настойок.

Умови хроматографування:

Стаціонарна фаза – ВЕТШХ Si 60 F_{254}.

Рухома фаза А – етилацетат Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р (8:1:1).

Рухома фаза Б – етилацетат Р, метилетилкетон Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р (5:3:1:1).

Рухома фаза В – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, кислота оцтова Р, вода Р (100:11:11:27).

Відстань для хроматографування – 70 мм (від нижнього краю пластинки).

Насичення – 20 хв із фільтрувальним папером.

Температура, відносна вологість – 22 ± 5 ºС, 33%.

Дериватизація – нагрівання при 100 ºС упродовж 3 хв, занурення теплої пластинки у Реагент 1 (5 мг/мл аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в етилацетаті Р). За потреби занурення пластинки у Реагент 2 (50 мг/мл макроголу 400 в дихлорметані Р).

Виявлення – до проявлення реагентом – 254 нм, 366 нм; після проявлення реагентом – 366 нм, біле світло.

Результати дослідження та обговорення

Для паралельного аналізу 10 різних настойок за флавоноїдами і фенілпропаноїдами методом ВЕТШХ, нами було відібрано три уніфіковані рухомі фази, що застосовують при ТШХ-ідентифікації речовин флавоноїдної природи у фармакопейному аналізі різних рослин; у тому числі, для обраних об'єктів дослідження, їх вихідної

сировини чи споріднених об'єктів (інша частина чи інша лікарська форма вихідної сировини). Так, рухому фазу А – етилацетат Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р (8:1:1) – застосовують у монографіях ДФУ і/чи ЄФ на квітки нагідок і настойку нагідок[N], квітки софори і бутони софори; рухому фазу Б – етилацетат Р, метилетилкетон Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р (5:3:1:1) – у монографіях на плоди глоду, квітки та листя глоду, сухий і рідкий екстракт глоду, корені ехінацеї пурпурової (ЄФ), траву ехінацеї пурпурової; рухому фазу В – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, кислота оцтова Р, вода Р (100:11:11:27) – у монографіях на м'яти перцевої листя, м'яти перцевої екстракт сухий [2, 6]. Для кожної досліджуваної настойки нами було експериментально визначено і порівняно хроматографічні відбитки ВЕТШХ (знімки і профілі піків знімків) флавоноїдів і фенілпропаноїдів, одержаних у різних уніфікованих рухомих фазах (рис. 1–10). Одержані результати дали змогу зробити висновок про те:

• чи є суттєва різниця у розділенні БАР у разі використання різних рухомих фаз;

• чи в уніфікованих умовах можуть бути виявлені хімічні маркери, що зазвичай використовують для стандартизації того чи іншого об'єкту в різних/специфічних умовах та ін.;

• чи може одна з порівняних рухомих фаз бути замінена на іншу, наприклад у разі відсутності того чи іншого реагенту;

• чи мають різні настойки характеристичні відбитки в тих самих умовах і чи може бути проведений аналіз декількох різних об'єктів паралельно на одній пластинці.

Результати, одержані для кожної з настойок обговорені нижче. Слід зазначити, що одержані результати описують хроматографічні відбитки ВЕТШХ тільки зразків, що були залучені в аналіз. Використання результатів для встановлення критеріїв якості у разі контролю якості настойок можливо лише після виконання валідаційних досліджень із залученням великої кількості зразків.

Порівнюючи режими виявлення, після проявлення при 366 нм на хроматограмах настойок виявляються як зони флавоноїдів (мають жовто-оранжеву флуоресценцію), так і зони фенілпропаноїдів (мають блакитну флуоресценцію), тоді як при 366 нм до виявлення виявляються блакитні зони фенілпропаноїдів; при 254 нм до виявлення на зеленому фоні можна побачити темні зоні поглинання різної інтенсивності, що відповідають флавоноїдам; при білому світлі зони, притаманні флавоноїдам, виявляються жовтим кольором.

Настойка глоду. Зазвичай настойку глоду виготовляють із сухих плодів фармакопейних видів глоду (*Crataegus* spp.) у співвідношенні – 1:10, як екстрагент використовують 70%-й етанол. Пропозиції надходять від 14 вітчизняних виробників [1]. Окрема монографія ДФУ на настойку глоду відсутня, наявна монографія ДФУ на сировину глоду (плоди глоду, листя та квітки глоду), рідкий і сухий екстракт листя та квіток глоду. Стандартизацію плодів глоду – вихідної сировини настойки, проводять за флавоноїдами і гідроксикоричними кислотами (ідентифікація, ТШХ) та за сумою проціанідинів чи сумою флавоноїдів (кількісне визначення, спектрофотометрія (СФ)) [2, 5]. Стандартизація настойки згідно з МКЯ може відбуватися за якісною реакцією на антоціани та лейкоантоціани, флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ), за сумою флавоноїдів (кількісне визначення, СФ).

Відомо, що в монографіях ЄФ/ДФУ на квітки та листя глоду, а також на плоди глоду застосовують рухому фазу Б. Наші попередні дослідження різних фармакопейних і нефармакопейних видів сировини глоду і настойки глоду також було виконано у цій рухомій фазі. Однак, нещодавно, до включення у монографію на плоди глоду Європейської фармакопеї було запропоновано рухому фазу А, тоді як у монографіях на листя та квітки глоду зміни рухомої фази не відбулися.

Нами було порівняно ВЕТШХ хроматограми та профілі піків хроматограм настойки глоду у 3 уніфікованих рухомих фазах (рис. 1).

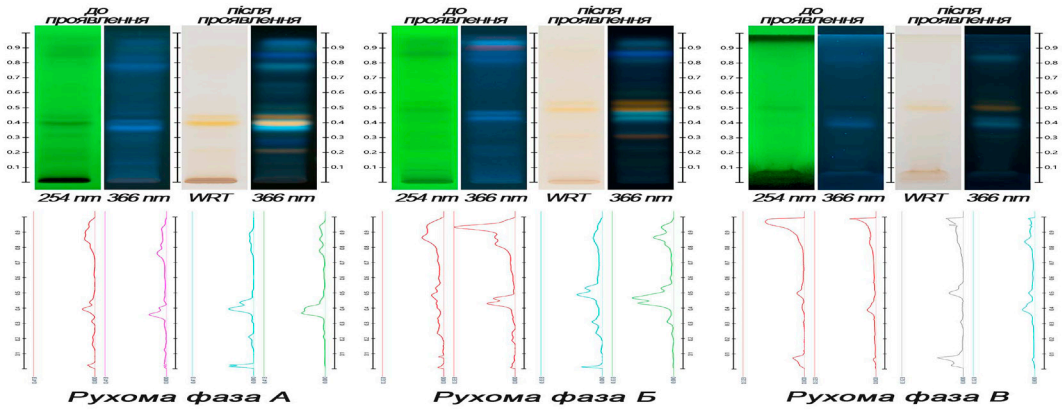

Рис. 1. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки глоду**

Специфічні маркери: рутин, гіперозид, кислота хлорогенова

Як ми бачимо з рис. 1, найбільш чітке розділення флавоноїдних сполук і фенілпропаноїдів настойки глоду спостерігається у рухомій фазі Б, де у середній частині пластинки ми можемо побачити 4 зони: дві зони блакитної флуоресценції (із них нижня зона відповідає кислоті хлорогеновій) і дві зони оранжевої флуоресценції (із них нижня зона відповідає гіперозиду), тоді як у рухомих фазах А і В відповідні зони повністю не розділилися. При цьому у рухомій фазі А зони блакитної флуоресценції у верхній частині пластинки розділилися краще, ніж у рухомій фазі Б. Так, після дериватизації при 366 нм виявляються 3 чіткі зони блакитної флуоресценції; крім того, між зонами, що відповідають рутину і кислоті хлорогеновій виявилася додаткова синя зона, що відсутня в результатах, одержаних у рухомих фазахА і В. Також у рухомій фазі Б спостерігається краще розділення профілів піків настойки.

Настойка м'яти перцевої. На сьогодні на фармацевтичному ринку України наявні настойки м'яти від двох вітчизняних виробників різних складів. Згідно зі складом 1, настойку м'яти виготовляють із сухого листя м'яти перцевої (*Mentha piperita*) у співвідношенні (1:20) і екстрагента 90%-го етанолу; до настойки м'яти складу 2 додано ще й олію м'яти [1]. Монографія ДФУ на настойку – відсутня, наявна лише монографія ДФУ/ЄФ на вихідну сировину (листя) та на сухий екстракт листя м'яти перцевої. Стандартизація листя м'яти за ДФУ/ЄФ відбувається за флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ) і ефірними оліями (кількісне визначення ефірних олій методом перегонки з водяним паром), стандартизація сухого екстракту листя м'яти проходить за флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ) та кислотою розмариновою (кількісне визначення, високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ)). Згідно з ДФУ/ЄФ, для ідентифікації і листя і сухого екстракту пропонують рухому фазу В із невеликими змінами у складі – оцтова кислота Р, мурашина кислота безводна Р, вода Р, етилацетат Р (7:7:18:68) [2]. У наших попередніх дослідженнях було встановлено, що для ідентифікації ЛРС родини *Lamiaceae*, у тому числі сировини м'яти, шавлії і собачої кропиви, найбільш придатною є рухома фаза А, оскільки у цих умовах розділяються різні фенілпропаноїди, такі як кислота розмаринова і кислота кофейна [7].

Порівняння хроматограм ВЕТШХ і їх профілів піків для настойки м'яти перцевої, одержаних у 3 уніфікованих рухомих фазах на речовини флавоноїдної природи (рис. 2) виявило, що в усіх трьох рухомих фазах після проявлення при 366 нм у нижній частині пластини виявляється пара зон: нижня із оранжевою флуоресценцією

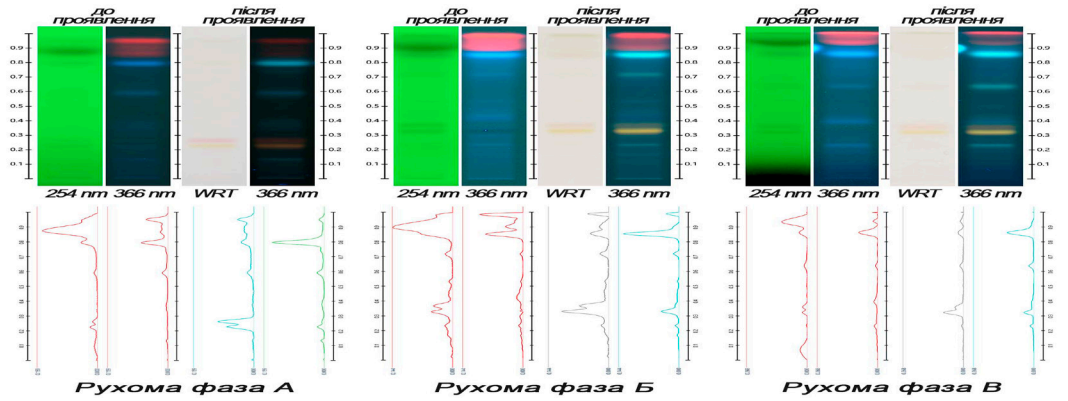

Рис. 2. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки м'яти перцевої**

Специфічні маркери: рутин, неоеріоцитрин, еріоцитрин, кислота розмаринова

(відповідає рутину), над нею розміщується червона зона (відповідає неоеріоцитрину і еріоцитрину), у верхній частині пластинки близько фінішу виявляється зона блакитної флуоресценції (відповідає кислоті розмариновій), нижче неї розміщується ще одна блакитна зона з меншою інтенсивністю. На профілі знімків піків хроматограм, піки, відповідні рутину і неоеріоцитрину/еріоцитрину, найкраще виявляються після проявлення при білому світлі, характерний пік кислоти розмаринової виявляється до і після проявлення при 366 нм. Таким чином, оскільки суттєвих змін у розділенні речовин, характерних для настойки м'яти перцевої, не було, для ідентифікації можна застосовувати всі 3 досліджувані фази, однак, перевагу має рухома фаза А, оскільки є більш інформативною для виявлення різних фенілпропаноїдів.

Настойка шавлії. Настойку шавлії виготовляють із сухого листя шавлії лікарської (*Salvia officinalis*) у співвідношенні (1:5) із використанням як екстрагента 70%-го етанолу. На сьогодні настойку шавлії виготовляє 1 вітчизняний виробник [1]. У ДФУ наявна монографія на настойку шавлії і її вихідну сировину – листя шавлії лікарської. Згідно з ДФУ, стандартизація настойки шавлії і листя шавлії лікарської відбувається за ефірними оліями (ідентифікація, ТШХ) і вмістом ефірних олій (кількісне визначення, перегонка з водяним паром). Відомо, що листя шавлії лікарської містить флавоноїди і фенілпропаноїди, а прийнятне розділення спостерігається у рухомій фазі А [7].

Нами проведено аналіз ВЕТШХ настойки шавлії у 3 уніфікованих рухомих фазах на речовини флавоноїдної природи (рис. 3).

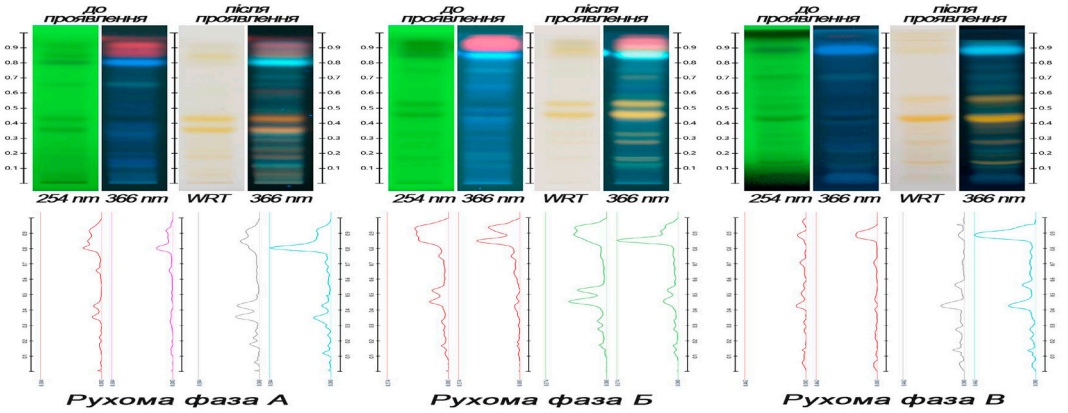

Рис. 3. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки шавлії**

Специфічні маркерні зони: лютеолін-7-глікозид, кислота розмаринова

Як ми бачимо з рис. 3, усі 3 рухомі фази придатні для розділення флавоноїдних сполук настойки шавлії – при 366 нм після дериватизації на хроматограмі виявляються 2 жовто-оранжеві зони у середній частині пластини (флавоноїди, одна з зон, ймовірно, лютеолін-7-глікозид) і одна блакитна зона у верхній частині пластини (кислота розмаринова). Піки характерної пари оранжевих зон краще за все виявляються після виявлення у білому світлі; пік, що відповідає кислоті розмариновій, до і після проявлення – при 366 нм. З огляду на можливість розділення кислоти розмаринової з іншими фенілпропаноїдами, для ідентифікації настойки шавлії перевагу можна віддати рухомій фазі А.

Настойка пустирника (собачої кропиви). Виготовляють із сухої трави собачої кропиви звичайної (*Leonurus cardiaca)*, собачої кропиви п'ятилопатевої *(L. quinquelobatus)* або їх суміші у співвідношенні (1:5) з екстрагентом 70%-м етанолом. На фармацевтичний ринок надходять пропозиції від 8 виробників [1]. Наявна монографія ДФУ на настойку собачої кропиви, а також національна та гармонізована монографія ДФУ/ЄФ на траву собачої кропиви. Згідно з ДФУ, стандартизація настойки собачої кропиви і трави відбувається за іридоїдами і флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ) і сумою флавоноїдів (кількісне визначення, СФ). Ідентифікацію виконують у рухомій фазі – оцтова кислота льодяна Р, вода Р, етилацетат Р (20:20:60), що має близький склад до рухомої фази А [2]. У наших попередніх дослідженнях для ідентифікації настойки собачої кропиви у складі екстемпорального розчину було використано рухому фазу Б.

Як видно з рис. 4, хроматографічні відбитки настойки собачої кропиви подібні у рухомих фазах Б і В і відрізняються у рухомій фазі А.

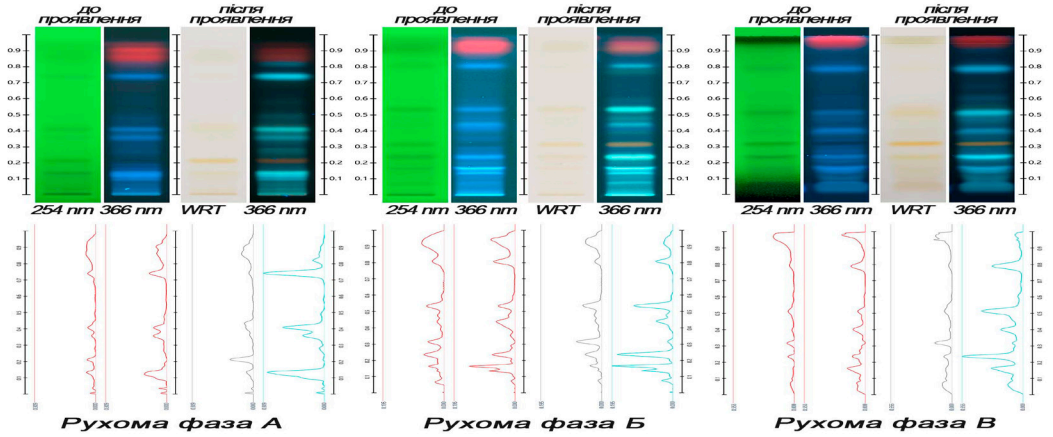

Рис. 4. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки пустирника (собачої кропиви)**
Специфічні маркери: рутин, кислота хлорогенова

Так, у всіх рухомих фазах після проявлення при 366 нм у нижній третині пластини виявляється оранжева зона, що флуоресціює, яка відповідає рутину, нижче цієї зони у рухомій фазі А виявляється одна блакитна флуоресціююча зона, у рухомих фазах Б і В – 2 блакитних флуоресціюючі зони; вище оранжевої флуоресціюючої зони, що відповідає рутину, у рухомій фазі А виявляються 4 чітко розділених блакитних флуоресціюючих зони, у рухомих фазах Б і В виявляються лише 3 розділені блакитні флуоресціюючі зони. Піки блакитних зон, що притаманні фенілпропаноїдам, отриманих з хроматограм, краще виявляються до і після проявлення при 366 нм; піки зон, що відповідають флавоноїдам – у білому світлі після проявлення.

Настойка календули (нагідок). Виготовляють із сухих квіток нагідок лікарських (*Calendula officinalis*) і екстрагента – етанолу 70%-го у співвідношенні (1:10). Пропозиції надходять від 9 вітчизняних виробників [1]. У ДФУ наявні окремі монографії на настойку нагідок і квітки нагідок. Згідно з ДФУ, стандартизація настойки відбувається за флавоноїдами і гідроксикоричними кислотами (ідентифікація, ТШХ), тритерпеновими сапонінами – календулозиди (ідентифікація, ТШХ), сумою флавоноїдів (кількісне визначення, СФ). Для ідентифікації використовують рухому фазу А [2]. У наших попередніх дослідженнях було розроблено і валідовано методики ТШХ для настойки нагідоку рухомій фазі – бутанол Р, кислота оцтова льодяна Р, вода Р (4:1:2) і екстемпоральної мазі, що містить настойку нагідок, у рухомій фазі В.

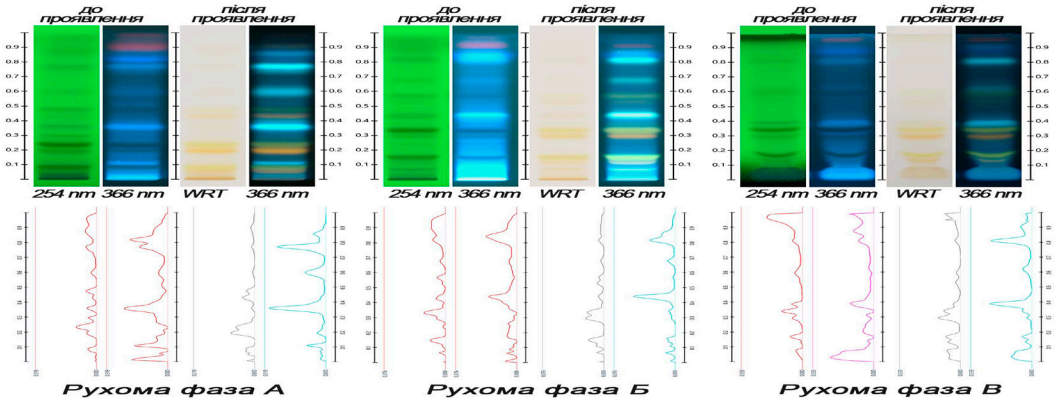

Рис. 5. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки календули (нагідок)**
Специфічні маркери: рутин, ізорамнетин-3-О-рутинозид

Порівняння ВЕТШХ хроматограм та профілей піків хроматограм настойки нагідок, одержаних у 3 уніфікованих рухомих фазах на речовини флавоноїдної природи, після проявлення при 366 нм (рис. 5) виявило, що у рухомих фазах А і Б розділюється 11 речовин, тоді як у рухомій фазі В частина речовин у верхній половині пластини коелюють. При цьому, у рухомій фазі В у нижній частині пластини спостерігається чітке розділення трьох зон, специфічних для нагідок: зона оранжевої флуоресценції (відповідає за розміщенням рутину), зона зеленої флуоресценції (відповідає ізорамнетин-3-О-рутинозиду), зона блакитної флуоресценції (відповідає кислоті хлорогеновій); у рухомих фазах А і Б оранжева і зелена флуоресціюючі зони, що відповідають рутину і ізорамнетин-3-О-рутинозиду, розділюються трохи гірше, але на профілі піків зі зображення при білому світлі чітко можна побачити 2 піки цих сполук. Рухома фаза А має перевагу перед рухомою фазою Б у розділенні зон блакитної флуоресценції у верхній частині пластинки та чіткості виявлення пари зон оранжевої і зеленої флуоресценції, розміщених над зоною, що відповідає кислоті хлорогеновій. У цілому, за кількістю, чіткістю розділення і за діапазоном розміщення розділених зон настойки нагідок, рухомі фази А і Б мають перевагу над рухомою фазою В. Однак, залежно від мети аналізу, рухома фаза В може мати перевагу над рухомими фазами А і Б.

Настойка софори японської. Виготовляють із сухих плодів софори японської (*Sophorae japonicae*) у співвідношенні (1:2) з екстрагентом етанолом 48%-м. На фармацевтичному ринку України представлено настойку софори японської від трьох вітчизняних виробників [1]. У ДФУ відсутні монографії на настойку софори і на її вихідну сировину – плоди софори. Наявні споріднені монографії ЄФ/ДФУ на буто-

ни софори і квітки софори, згідно з якими стандартизація і квіток і бутонів софори відбувається за флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ), сумою флавоноїдів (кількісне визначення, СФ), кількісним вмістом рутину (кількісне визначення, ВЕРХ). Для ідентифікації використовують рухому фазу А [2]. Згідно з відомими МКЯ на настойку софори, стандартизація відбувається за фенольними сполуками і флавоноїдами (якісні реакції), флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ) і сумою флавоноїдів (кількісне визначення, СФ); при ідентифікації ТШХ використовують рухому фазу складу: етилацетат Р, кислота оцтова льодяна Р, вода Р (3:1:1).

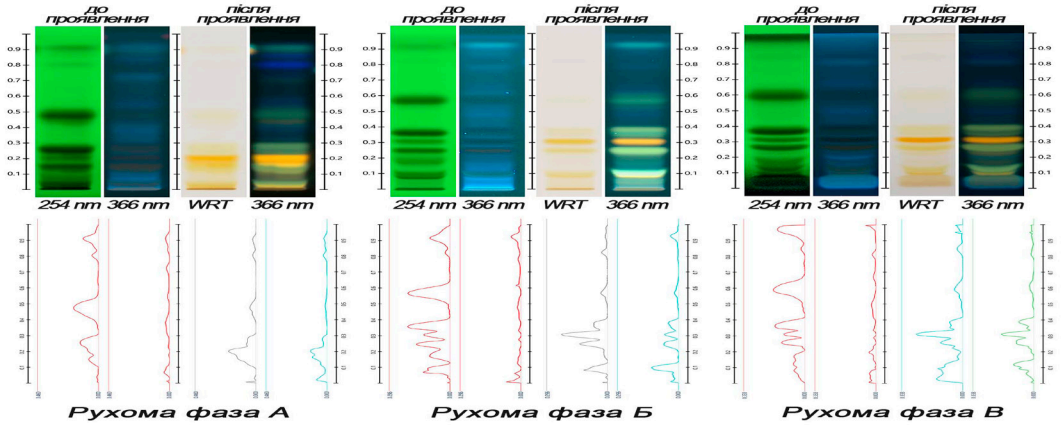

Рис. 6. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки софори японської**
Специфічні маркери: рутин

Порівняння ВЕТШХ хроматограм та профілей піків хроматограм настойки софори, одержаних у 3 уніфікованих рухомих фазах на речовини флавоноїдної природи після проявлення при 366 нм (рис. 6) виявило, що краще розділення сполук спостерігалося у рухомих фазах Б і В, де характеристичний відбиток (дві інтенсивні зелені флуоресціюючі зони, розміщені нижче оранжевої флуоресціюючої зони, що відповідає рутину, і одна інтенсивна зелена зона розміщена вище неї) розмістилися у діапазоні до $R_F \approx 0{,}4$, тоді як у рухомій фазі А цей характеристичний відбиток розмістився у діапазоні до $R_F \approx 0{,}3$, що зумовило скупчення зон і їх неповне розділення. Над характеристичним відбитком у всіх трьох рухомих фазах спостерігалося виявлення зони зеленої флуоресценції. Близько фронту у рухомій фазі А виявилися синя і блакитна флуоресціюючі зони, які у рухомій фазі Б виявилися гірше, а у рухомій фазі В були майже відсутні.

Профілі, що найкраще характеризують флавоноїди настойки софори, були отримані у рухомих фазах Б і В із хроматограм, одержаних при 254 нм до проявлення, і білого світла і 366 нм після проявлення.

Настойка ехінацеї пурпурової. На сьогодні, на фармацевтичному ринку України наявні настойки ехінацеї пурпурової (*Echinacea purpurea*) від 6 виробників, що мають різні склади і виготовляються з сухої чи свіжої сировини. Для виготовлення настойки ехінацеї складу 1 використовують сухі кореневища з коренями ехінацеї пурпурової у співвідношенні (1:10), екстрагент – етанол 50%-й; складу 2 – свіжі кореневища з коренями ехінацеї пурпурової у співвідношенні (1:5), екстрагент – етанол 50%-й [1]. Наявна монографія ДФУ на настойку ехінацеї пурпурової[N], окремі монографії на ехінацеї корені і траву [2]. Згідно з монографією ДФУ на настойку ехінацеї пурпурової, використовують сухі корені, виготовлені у співвідношенні 1:10, екстрагент – 50%-й етанол. Стандартизацію настойки здійснюють за гідроксикоричними кисло-

тами (ідентифікація, ТШХ), використовують СЗ ДФУ екстракту ехінацеї пурпурової – мають бути наявні характерні зони, і екстракту ехінацеї блідої (мають бути відсутні характерні зони), за ß-ситостерином (ідентифікація, ТШХ) та за сумою гідроксикоричних кислот (кількісне визначення, СФ). У національній монографії ехінацеї пурпурової корені[N] використовують ту саму комбінацію методів і маркерів/груп БАР. У монографії ДФУ на корені ехінацеї пурпурової, гармонізованої з ЄФ, стандартизацію виконують за гідроксикоричними кислотами (ідентифікація, ТШХ, зовнішній маркер – кислота кофейна, мають бути відсутні ехінакозид та цинарин, характерні для коренів ехінацеї блідої), за ß-ситостерином і N-ізобутилдодекатетраенамідом (ідентифікація, ТШХ), сумою кафтарової та цикорієвої кислот (ВЕРХ). У гармонізованій монографії з ЄФ/ДФУ на корені ехінацеї пурпурової у разі ідентифікації ТШХ фенольних речовин використовують рухому фазу Б, у той час як у національних монографіях на настойку ехінацеї пурпурової і корені ехінацеї пурпурової використовують іншу рухому фазу: кислота мурашина безводна Р, вода Р, толуол Р, етилацетат Р (2:2:1:20). Рухому фазу Б пропонує і Асоціацією ВЕТШХ для ВЕТШХ аналізу коренів ехінацеї пурпурової для включення в USP 41-NF36, USPDSC 2019, EPh 8.0 [6].

Нами було порівняно ВЕТШХ хроматограми та профілі піків хроматограм настойки ехінацеї пурпурової зі свіжої сировини в уніфікованих рухомих фазах А і Б (рис. 7).

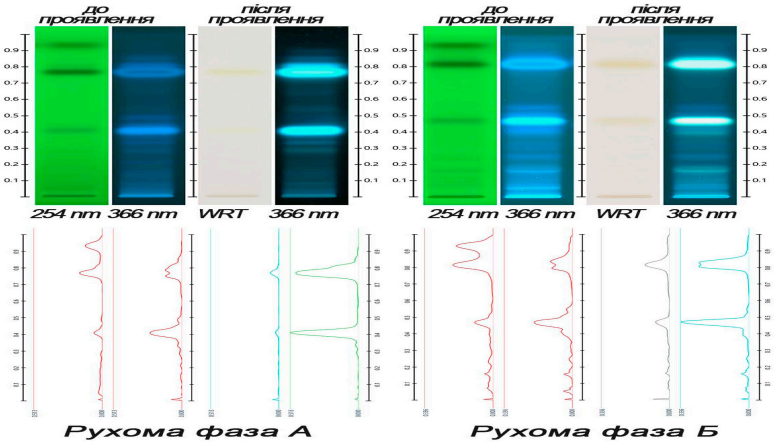

Рис. 7. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки ехінацеї пурпурової**
Специфічні маркери: кислота кафтарова, кислота цикорієва
Зовнішні маркери: кислота хлорогенова, кислота кофейна

Як ми бачимо з рис. 7, хроматограми, одержані у двох рухомих фазах, мають подібне розділення речовин – після проявлення при 366 нм на хроматограмах чітко виявляються дві інтенсивні зони блакитної флуоресценції, що відповідають за розміщенням кислотам кафтаровій і цикорієвій. Як зовнішні маркери можуть бути використані кислоти хлорогенова і кофейна, що мають на хроматограмі R_F близькі до розміщення специфічних речовин.

Настойка валеріани. Виготовляють із коренів валеріани лікарської (*Valeriana officinalis)* у співвідношенні 1:5, екстрагент – 70%-й етанол. Пропозиції настойки валеріани надходять від 7 виробників України [1]. У ДФУ наявні національна монографія на настойку валеріани[N], національна і гармонізована монографія на корені валеріани, сухі екстракти валеріани – водний і водно-спиртовий. Згідно з ДФУ, стандартизація настойки валеріани, а також сухих екстрактів валеріани, відбувається за сесквітерпеновими кислотами (ідентифікація, ТШХ), сумою сесквітерпенових кис-

лот (кількісне визначення, ВЕРХ). У монографіях на сировину валеріани також визначається і вміст ефірних олій (кількісне визначення, метод перегонки з водяним паром) [2]. Відомо, що в коренях валеріани містяться поліфенольні речовини [8].

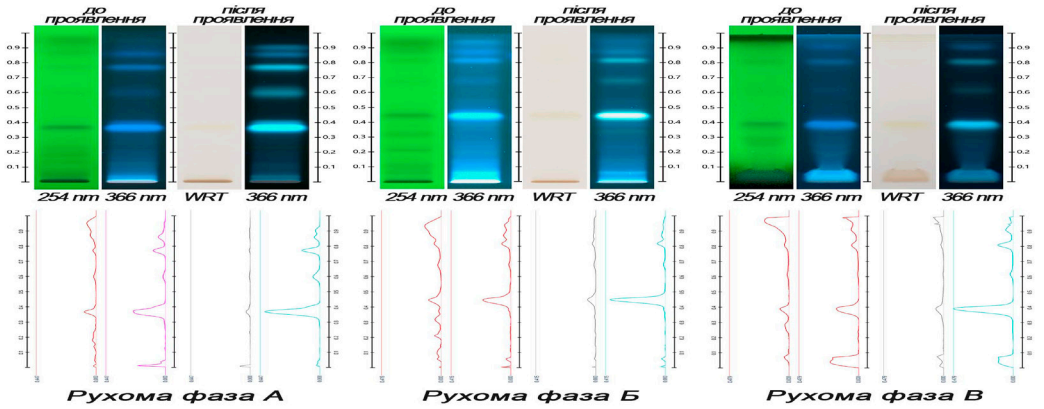

Рис. 8. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки валеріани**
Специфічний маркер: кислота хлорогенова, кислота кофейна

Одержані результати ВЕТШХ настойки валеріани, одержані в 3 уніфікованих фазах, виявили наявність на хроматограмах блакитних флуоресціюючих зон (фенілпропаноїди). Найкраще розділення спостерігалося у рухомій фазі А, де після проявлення при 366 нм виявилася інтенсивна зона блакитної флуоресценції, що відповідає кислоті хлорогеновій, вище неї виявились 4 блакитні флуоресціюючі зони (одна з них відповідає кислоті кофейній).

Настойка півонії. Настойка півонії містить сухі траву і кореневище з коренями півонії відхиленої (*Paeonia anomala*), виготовлена у співвідношенні 1:10 зі застосуванням етанолу 40%-го. Настойку півонії виробляють 4 українські виробники [1]. На сьогодні відсутні як монографії на настойку півонії, так і монографії на вихідну сировину півонії відхиленої. Згідно з відомими МКЯ стандартизація настойки півонії відбувається за фенольними сполуками (якісна реакція), флавоноїдами (ідентифікація, ТШХ), кислотою бензойною (ідентифікація, ТШХ), сумою фенольних сполук (кількісне визначення, СФ). Згідно з відомою методикою ідентифікації ТШХ, визначення відбувається у рухомій фазі – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (70:15:15).

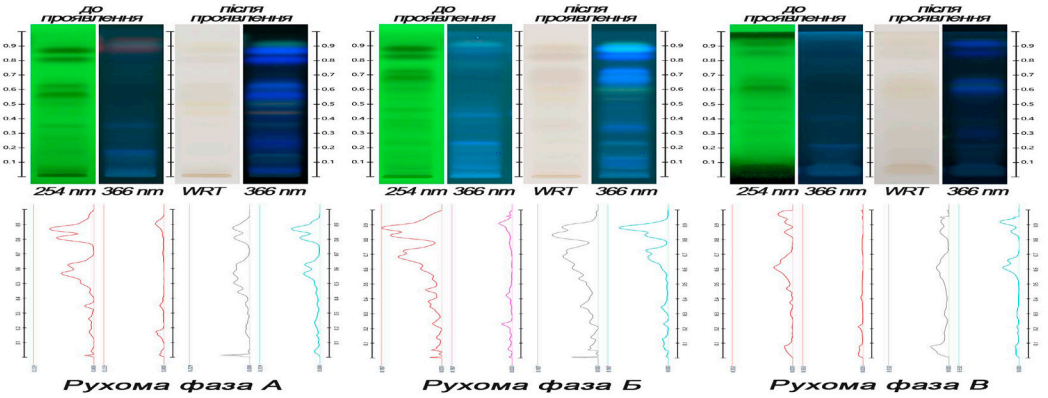

Рис. 9. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки півонії**
Зовнішній маркер: гіперозид

Згідно з отриманими результатами порівняння настойки півонії в 3 уніфікованих рухомих фазах на речовини флавоноїдної природи, найкраще розділення відбувається у рухомих фазах А і Б – у верхній половині пластини виявляються у порядку зростання R_F оранжева флуоресціююча зона (у рухомій фазі А ця зона за розміщенням відповідає гіперозиду, у рухомій фазі Б ця зона розміщується вище зони, що відповідає гіперозиду), вище неї ще одна жовто-оранжева зона, вище неї 4 сині флуоресціюючі зони, що розміщуються парами. Чіткіші результати розділення були одержані у рухомій фазі А (рис. 9).

Настойка евкаліпта. Настойку евкаліпта одержують із сухого листя евкаліпта прутовидного (*Eucalyptus vitaminalis*) у співвідношенні (1:5), як екстрагент використовують етанол 70%-й [1]. Монографія ДФУ на настойку – відсутня, наявні монографії на листя евкаліпта прутовидного і евкаліптову олію. Згідно з цими монографіями стандартизація листя евкаліпта відбувається за ефірними оліями (ідентифікація, ТШХ) і ефірними оліями (кількісне визначення методом перегонки з водяним паром), олії евкаліпту – за ефірними оліями (кількісне визначення, газова хроматографія) [2]. Згідно з відомими МКЯ, у разі стандартизації настойки евкаліпта визначають фенольні речовини (якісна реакція), ефірні олії (ідентифікація, ТШХ) і ефірні олії (кількісне визначення методом перегонки з водяним паром).

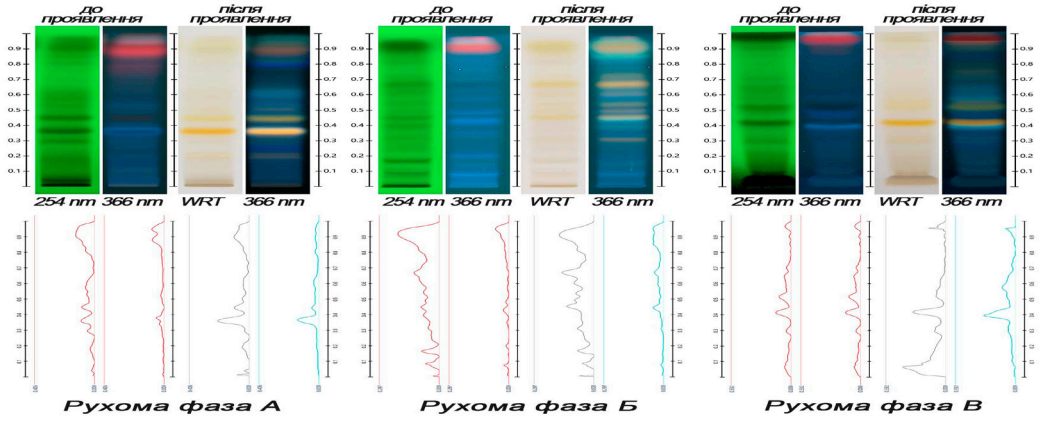

Рис. 10. **Хроматограми ВЕТШХ та профілі піків знімків хроматограм флавоноїдів і фенілпропаноїдів настойки евкаліпта:**
рухомі фази А і В – зразок 1, рухома фаза Б – зразок 2
Зовнішній маркер – гіперозид

Як ми бачимо з рис. 10, зразки настойки евкаліпта містять у своєму складі речовини поліфенольної природи, що у всіх трьох рухомих фазах виявляються на ВЕТШХ пластинці жовто-оранжевими флуоресціюючими зонами. Після проявлення при 366 нм, у нижній третині пластинки виявляється оранжева флуоресціююча зона слабкої інтенсивності на рівні зони, що відповідає рутину; у середній частині пластини різні зразки настойки виявили 2–4 жовто-оранжевої зони різної інтенсивності, близько фінішу виявилися декілька зон, що мали різне забарвлення, що може свідчити, наприклад, про мінливість складу флавоноїдів евкаліпта прутовидного залежно від місця заготівлі.

Порівнюючи хроматографічні відбитки всіх настойок, одержаних в уніфікованих умовах, можна сказати, що рухома фаза А, порівняно із рухомими фазами Б і В, має переваги у розділенні речовин, що виявляються у верхній третині пластини (фенілпропаноїди), а діапазон R_F від СЗ рутину до СЗ кислоти кофейної, де розділюються специфічні зони, є найбільшим. Так, у рухомій фазі А кожна настойка має характерні

зони, що дає змогу відрізнити їх одна від одної. Отже, рухома фаза А є найбільш придатною для паралельного аналізу досліджуваних настойок на одній пластині.

Рухомі фази Б і В мають переваги у розділенні речовин у нижній половині пластини і можуть бути рекомендовані для паралельного аналізу деяких настойок. Так, у рухомій фазі Б настойки глоду і софори мають кращі результати розділення, ніж у рухомій фазі А; прийнятні результати розділення виявлені також для настойок нагідок і собачої кропиви. Однак, настойки ехінацеї і валеріани у цих умовах відрізнити складно, оскільки характерні для цих настойок зони блакитної флуоресценції, що відповідають різним речовинам, мають близькі значення R_F. Окрім цього, рухома фаза Б містить у своєму складі прекурсор – метилетилкетон. До переваг рухомої фази В можна віднести ліпше розділення маркерних речовин настойки нагідок, прийнятні результати розділення виявлені також для настойок софори японської і м'яти перцевої.

Висновки

1. У роботі вперше виконано розширений систематичний аналіз ВЕТШХ флавоноїдів і фенілпропаноїдів 10 настойок в уніфікованих хроматографічних умовах – одержано характеристичні ВЕТШХ-хроматограми і їх профілі, виокремлено специфічні маркерні зони.

2. Встановлено, що рухома фаза А може бути рекомендована для виконання паралельного аналізу на одній пластинці всіх досліджуваних настойок, однак настойки глоду і софори мають кращі результати розділення речовин у рухомій фазі Б. Окрім цього, у рухомій фазі Б прийнятні результати розділення виявлені також для настойок нагідок і собачої кропиви. У рухомій фазі В ліпше розділення спостерігалося для маркерних речовин настойки нагідок, прийнятні результати розділення виявлені також для настойок софори японської і м'яти перцевої.

3. Розроблені із використанням сучасних методів і підходів методики ВЕТШХ дають змогу скоротити обсяг і час виконання аналізу, оптимізувати економічні і трудові витрати, що є особливо важливим у разі необхідності аналізу великої кількості зразків на фармацевтичних підприємствах чи у лабораторіях контролю якості.

Список використаної літератури

1. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: http://www.drlz.com.ua/МОЗ України
2. Державна фармакопея України 2.0. В 3 т. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 3. – 732 с.
3. *Куркин В. А.* Фенилпропаноиды как важнейшая группа биологически активных соединений лекарственных растений // Межд. журн. прикладных и фундаментальных исследований. – 2015. – № 12 (ч. 7) – С. 1338–1342.
4. *Karak P*. Biological activities of flavonoids: an overview // Int. J. Pharm. Sci. Res. 2019. – V. 10, N 4. – P. 1567–1574. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232
5. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014. – 3655 p.
6. Method collection. HPTLC Association. URL: https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm
7. *Хохлова К. О., Вишневська Л. І., Здорик О. А., Ковпак Л. А.* Порівняння хроматографічних профілей флавоноїдів і гідроксикоричних кислот деяких видів родини *Lamiaceae*, представлених на фармацевтичному ринку України // Фармац. журн. – 2020.– № 2. – С. 67–78. https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.20.07
8. *Barnes J. Anderson L. A., Phillipson J. D.* Herbal Medicines. 3rd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2007. – 710 p.

References

1. Derzhavnyi reiestr likarskykh zasobiv Ukrainy. URL: http://www.drlz.com.ua/MOZ Ukrainy
2. Derzhavna farmakopeia Ukrainy (2nd ed.). – Kharkiv: DP «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2015. – T. 3. – 732 s.
3. *Kurkin V. A.* Fenilpropanoidyi kak vazhneyshaya gruppa biologicheski aktivnyih soedineniy lekarstvennyih rasteniy // Mezhd. zhurn. prikladnyih i fundamentalnyih issledovaniy. – 2015. – № 12 (7) – S. 1338–1342.

4. *Karak P*. Biological activities of flavonoids: an overview // Int. J. Pharm. Sci. Res. 2019. – V. 10, N 4. – P. 1567–1574. https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.
5. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014.
6. HPTLC Association. Method collection. URL: https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm
7. *Khokhlova K. O., Vyshnevska L. I., Zdoryk O. A., Kovpak L. A.* Porivniannia khromatohrafichnykh profilei flavonoidiv i hidroksykorychnykh kyslot deiakykh vydiv rodyny *Lamiaceae*, predstavlenykh na farmatsevtychnomu rynku Ukrainy // Farmats. zhurn. – 2020. – № 2. – S. 67–78. https://doi.org/10.32352/0367-3057.2.20.07
8. *Barnes J. Anderson L. A., Phillipson J. D.* Herbal Medicines. 3rd ed. – London: Pharmaceutical Press, 2007. – 710 p.

Надійшла до редакції 20 серпня 2020 р.
Прийнято до друку 28 серпня 2020 р.

К. О. Хохлова (http://orcid.org/0000-0002-7151-6763)
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

РОЗРОБЛЕННЯ УНІФІКОВАНИХ ВЕТШХ МЕТОДИК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У НАСТОЙКАХ

Ключові слова: настойка, високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), ідентифікація, флавоноїди, фенілпропаноїди

А Н О Т А Ц І Я

Традиційною рідкою лікарською формою для фармацевтичного ринку України є настойки. На сьогодні асортимент настойок вітчизняного виробництва налічує 21 найменування, у той час як у Державній фармакопеї України наявно лише 6 окремих монографій на різні настойки. Під час стандартизації настойок використовують різні комбінації специфічних і неспецифічних фізико-хімічних методів. Сучасним і специфічним хроматографічним методом, що може застосовуватися для ідентифікації поліфенольних речовин, які відповідають за широкий спектр фармакологічної дії настойок, є метод високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ).

Метою роботи було визначення і порівняння хроматографічних відбитків ВЕТШХ (знімків хроматограм і профілей піків знімків) флавоноїдів і фенілпропаноїдів 10 настойок вітчизняного виробництва в уніфікованих рухомих фазах, виокремлення маркерних зон кожної настойки, визначення придатності використання заданих хроматографічних умов для стандартизації та можливості проведення в цих умовах паралельного контролю якості декількох різних настойок.

Об'єктами дослідження були настойки глоду, м'яти перцевої, шавлії, собачої кропиви, нагідок, софори японської, ехінацеї пурпурової, валеріани, півонії, евкаліпта. Дослідження здійснювали методом ВЕТШХ в автоматичній системі виробництва CAMAG, Швейцарія, на базі двох лабораторій.

Для кожної досліджуваної настойки нами було визначено і порівняно хроматографічні відбитки ВЕТШХ (знімки і профілі піків знімків) флавоноїдів і фенілпропаноїдів, одержаних у різних уніфікованих рухомих фазах. В уніфікованих хроматографічних умовах визначено відмінності у розділенні біологічно активних речовин настойок; виявлено характерні маркерні речовини настойок; визначена доцільність використання тієї чи іншої рухомої фази для індивідуального аналізу настойки чи паралельного аналізу декількох настойок на одній пластині; встановлено можливість, у разі необхідності, заміни однієї рухомої фази іншою.

Розроблені із використанням сучасних методів і підходів методики ВЕТШХ дають змогу скоротити обсяг і час виконання аналізу, оптимізувати економічні і трудові витрати, що є особливо важливим у разі необхідності аналізу великої кількості зразків на фармацевтичних підприємствах чи в лабораторіях контролю якості.

Е. А. Хохлова (http://orcid.org/0000-0002-7151-6763)
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

РАЗРАБОТКА УНИФИЦИРОВАННЫХ МЕТОДИК ВЭТСХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В НАСТОЙКАХ

Ключевые слова: настойка, высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), идентификация, флавоноиды, фенилпропаноиды

А Н Н О Т А Ц И Я

Традиционной жидкой лекарственной формой для фармацевтического рынка Украины являются настойки. Сегодня ассортимент настоек отечественного производства насчитывает 21 наименование, в то время как в Государственную фармакопею Украины входит 6 частных монографий на разные настойки. При стандартизации настоек используют различные комбинации специфических и неспецифических физико-химических методов. Современным и специфическим хроматографическим методом, который может применяться для идентификации полифенольных веществ, отвечающих за широкий спектр фармакологической активности настоек, является метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ).

Целью исследования было определение и сравнение хроматографических отпечатков (снимков хроматограмм и профилей пиков снимков) флавоноидов и фенилпропаноидов 10 настоек отечественного производства в унифицированных подвижных фазах, выбор маркерных зон каждой настойки, определение пригодности использования заданных хроматографических условий для стандартизации и возможности выполнения в этих условиях параллельного контроля качества нескольких разных настоек.

Объектами исследования были настойки боярышника, мяты перечной, шалфея, пустырника, календулы, софоры японской, эхинацеи пурпурной, валерианы, пиона, эвкалипта. Исследования проводили с использованием метода ВЭТСХ в автоматической системе производства CAMAG, Швейцария, на базе двух лабораторий.

Для каждой исследуемой настойки нами было проведено определение и сравнение хроматографических отпечатков ВЭТСХ (снимки и профили пиков снимков) флавоноидов и фенилпропаноидов, полученных в разных унифицированных подвижных фазах. В унифицированных хроматографических условиях определены отличия в разделении биологически активных веществ настоек; выявлены характерные маркерные вещества настоек; определена целесообразность использования той или иной подвижной фазы для индивидуального анализа настойки или параллельного анализа нескольких настоек на одной пластине; определена возможность, при необходимости, замены одной подвижной фазы на другую.

Разработанные с использованием современных методов и подходов методики ВЭТСХ позволяют сократить объем и время проведения анализа, оптимизировать экономические и трудовые затраты, что особенно важно при необходимости анализа большого количества образцов на фармацевтических предприятиях или в лабораториях контроля качества.

K. O. Khokhlova (http://orcid.org/0000-0002-7151-6763)
National University of Pharmacy, Kharkiv

DEVELOPMENT OF HARMONIZED HPTLC METHODS FOR DETERMINATION OF POLYPHENOLIC COMPOUNDS OF TINCTURES

Key words: tincture, high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), identification, flavonoids, phenylpropanoids

A B S T R A C T

The tincture is a traditional liquid dosage form for the pharmaceutical market of Ukraine. Today, the range of the tinctures of Ukrainian manufacturers has 21 different items, while only six monographs on different tinctures are included in the State Pharmacopoeia of Ukraine. For standardization of tinctures, different combinations of specific and non-specific physical and chemical methods are used. The high-performance thin-layer chromatography (HPTLC) is a modern and specific chromatographic method, that can be used for the identification of polyphenolic substances responsible for a wide range of pharmacological activities of the tinctures.

The purpose of the study was to identify and compare chromatographic fingerprints (images of chromatograms and peak profiles from images) of flavonoids and phenylpropanoids of 10 tinctures of Ukrainian production in the harmonized mobile phases, to select for each tincture the specific marker zones, to determine the suitability of the specified chromatographic conditions for standardization of the tincture and the possibility to perform in these conditions the quality control for several different tinctures in-parallel.

The objects of the investigation were Hawthorn tincture, Peppermint tincture, Sage tincture, Motherwort tincture, Calendula tincture, Sophora tincture, Echinacea purpurea tincture, Valerian tincture, Peony tincture, Eucalyptus tincture. The research was carried out using the HPTLC method in the HPTLC automatic herbal system (CAMAG, Switzerland) on the base of two laboratories.

For each investigated tincture, the determination and comparison of HPTLC chromatographic fingerprints (images and peak profiles of images) of flavonoids and phenylpropanoids obtained in different harmonized mobile phases were performed.

In the harmonized chromatographic conditions the difference in separation of the bioactive substances was determined; the characteristic marker substances of the tinctures were identified; the suitability of the mobile phase for individual analysis of the tincture or in-parallel analysis of different tinctures on the same plate were determined; the possibility to replace one mobile phase by another, if needed, was determined.

Proposed HPTLC methods were developed using modern procedure and approach. These allow to reduce of the scope and time of analysis, optimize the economical and labor costs. The findings are of special importance for the pharmaceutical manufacturers and quality control laboratories that perform analysis on a large scale.

Електронна адреса для листування з авторами: khokhlova_kateryna@ukr.net
(Хохлова К. О.)