УДК 615.07:615.32:543.544.943.3.068.7 DOI: 10.32352/0367-3057.2.20.07
К. О. ХОХЛОВА (htpps://orcid.org/0000-0002-7151-6763), канд. фарм. наук, доцент,
Л. І. ВИШНЕВСЬКА (htpps://orcid.org/0000-0002-6887-3591), д-р фарм. наук, проф.,
О. А. ЗДОРИК (htpps://orcid.org/0000-0002-2721-0281), д-р фарм. наук, доцент,
Л. А. КОВПАК (htpps://orcid.org/0000-0002-4914-2670)
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

ПОРІВНЯННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ПРОФІЛЕЙ ФЛАВОНОЇДІВ І ГІДРОКСИКОРИЧНИХ КИСЛОТ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДИНИ *LAMIACEAE*, ПРЕДСТАВЛЕНИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ РИНКУ УКРАЇНИ

Ключові слова: високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), *Lamiaceae,* ідентифікація, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти

K. O. KHOKHLOVA (htpps://orcid.org/0000-0002-7151-6763),
L. I. VYSHNEVSKA (htpps://orcid.org/0000-0002-6887-3591),
O. A. ZDORYK (htpps://orcid.org/0000-0002-2721-0281),
L. A. KOVPAK (htpps://orcid.org/0000-0002-4914-2670)
National University of Pharmacy, Kharkiv

COMPARISON OF CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF FLAVONOIDS AND HYDROXYCINNAMIC ACIDS OF SOME SPECIES FROM *LAMIACEAE* GENUS ON UKRAINIAN PHARMACEUTICAL MARKET

Key words: high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), *Lamiaceae*, identification, flavonoids, hydroxycinnamic acids

Рослини родини *Lamiaceae,* що включають понад 230 родів і 7 000 видів, широко розповсюджені в усьому світі. Їх застосовують у фармації, парфумерії, нутрицевтиці, харчуванні [1, 2]. В Україні рослини родини *Lamiaceae* є традиційними засобами народної та наукової медицини [3, 4]. На фармацевтичному ринку представлені як лікарська рослинна сировина (ЛРС) (фасована у пачки та у фільтр-пакетах); харчові продукти (фіточаї у пачках чи фільтр-пакетах); входять до складу моно- і багатокомпонентних препаратів для орального застосування (оральні розчини, настойки, сиропи); а також ефірні олії та ін. [5].

Багато представників родини є фармакопейними, а монографії на ЛРС включено до фармакопей світу і міжнародних компендіумів високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ) [6–13], зокрема і Державну фармакопею України (ДФУ) [14]. Так, у ДФУ 2.0 та перші 3 доповнення ДФУ 2.1-2.3 було включено близько 30 монографій на ЛРС чи лікарські рослинні препарати рослин видів *Lamiaceae*. При ідентифікації за методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) [14] для рослин роду *Lamiacaeae* переважно визначають хроматографічний профіль і маркерні речовини ефірних олій (монографії на лаванди вузьколистої квітки, лавандову олію, лаванди широколистої олію, материнки звичайної траву, меліси лікарської листя, м’яти перцевої листя, м’яти перцевої олію, м’ятну олію частково дементалізовану, розмаринову олію, розмарину листя, чебрецю повзучого траву, чебрецеву олію, тимольний тип, шавлії лікарської листя, шавлії настойку, шавлії трилопатевої листя, шавлії лавандолистої олію), флавоноїдних сполук і гідроксикоричних кислот (монографії на м’яточника чорного траву, ортосифону тичинкового листя, розмарину листя, чебрецю звичайного траву, меліси листя екстракт сухий, м’яти перцевої листя екстракт сухий), а також іридоїдів (монографії на вітексу священного плоди, собачої кропиви траву), іридоїдів і флавоноїдів (монографія на собачої кропиви траву^{N}; собачої кропиви настойку^{N}), дитерпенів (монографія на шандри звичайної траву), фенольних сполук і дитерпенів (монографія на шавлії червонокореневищної корені та кореневища).

© Колектив авторів, 2020

В останніх дослідженнях European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) було з'ясовано, що методики визначення ефірних олій м'яти перцевої листя, чебрецю звичайного і чебрецю повзучого трави методом ТШХ можуть давати фальспозитивні результати, для цієї ЛРС вони були замінені на більш специфічні та відтворювані – визначення флавоноїдів методом ВЕТШХ [7, 8]. Методики ідентифікації ТШХ/ВЕТШХ флавоноїдних сполук наведено також у монографіях на розмарин лікарський і васильок тонкоцвітний [9–11], чебрець повзучий і шавлію лікарську [12]. Окрім цього, розроблено низку методик ідентифікації і денситометричного визначення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот методами ТШХ/ВЕТШХ в інших рослинах роду [15–21]. Слід зазначити, що наведені умови хроматографування для визначення флавоноїдного профілю ЛРС *Lamiaceae* і у фармакопейних монографіях, і у наукових джерелах є різними, а хроматографічний профіль вітчизняної ЛРС, з огляду на мінливість складу залежно від кліматичних умов зростання/регіону, може відрізнятися і не проходити встановлені критерії прийнятності [22]. У фармакопейному аналізі світу для визначення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот методом ТШХ/ВЕТШХ у ЛРС родини *Lamiaceae* застосовують стаціонарні фази з різним розміром частинок – ТШХ (5–40 мкм)/ВЕТШХ (2–10 мкм); рухомі фази – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р із різним співвідношенням розчинників (8:1:1), (15:1:1), (75:15:15) і різного складу – етилацетат Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р, кислота оцтова Р (68:18:7:7) та ін. Окрім цього, відрізняються умови підготовки проби (метод і тривалість екстракції – екстракція зі зворотним холодильником, екстракція ультразвуком, струшування та ін.; екстрагент/розчинник – метанол, суміші метанолу і води, етанолу і води); використовувані стандартні зразки – кислота розмаринова, кислота кавова, лютеолін-7-глікозид, рутин, неоріцитрин, еріоцитрин, стандартизовані фармакопейні екстракти; умови виявлення (методи дериватизації – ручне та автоматичне оприскування, занурення); реагенти та їх приготування – розчини аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти та макроголу, алюмінію хлориду; виявлення за різних умов – за різних довжин хвиль до та після дериватизації) та ін. [6–14]. Застосовують різні підходи до оцінки результатів аналізу ТШХ/ВЕТШХ [6, 11].

Отже, визначення хроматографічних профілей флавоноїдних сполук ЛРС *Lamiaceae* флори України в уніфікованих умовах є важливим для міжнародної гармонізації умов до стандартизації і оптимізації застосовуваних методик і представляє науковий і практичний інтерес.

Завданням нашої роботи був вибір уніфікованих хроматографічних умов ВЕТШХ для визначення хроматографічних профілей флавоноїдів і гідроксикоричних кислот ЛРС деяких видів родини *Lamiaceae* флори України, представлених на вітчизняному фармацевтичному ринку: шавлії лікарської трави (*Salvia officinalis* L.), чебрецю повзучого трави (*Thymus serpyllum* L.), чебрецю звичайного трави (*Thymus vulgaris* L.), материнки звичайної трави (*Origanum vulgare* L.), розмарину звичайного листя (*Rosmarinus officinalis* L.), ортосифону тичинкового листя (*Orthosiphon stamineus* Benth.), м'яти перцевої листя (*Mentha × piperita* L.), лаванди вузьколистої листя (*Lavandula angustifolia* Mill.), лофанту анісового трави (*Agastache foeniculum* Kuntze), меліси лікарської листя (*Melissa officinalis* L.), гісопу лікарського трави (*Hyssopus officinalis* L.), шандри звичайної трави (*Marrubium* vulgare L.), собачої кропиви трави (*Leonurus cardiaca* L.) і порівняння їх хроматографічних відбитків.

Матеріали та методи дослідження

Дослідження було здійснено методом ВЕТШХ в автоматичній системі виробництва CAMAG, Швейцарія, на базі лабораторії CAMAG, Мутенц, Швейцарія, і лабораторії Навчально-наукового тренінгового центру хіміко-технологічних досліджень

Навчально-наукового інституту прикладної фармації (ННТЦХТД ННІПФ) НФаУ, Харків, Україна. Під час виконання експериментальних досліджень використовували таке обладнання: Analytical Balance MS 205 DU, Mettler-Toledo; Orbital Shaking Platform POS-300, Grand-Bio; Centrifuge EBA21, Hettich; Automatic TLC Sampler 4, CAMAG; Automatic Development Chamber ADC 2, CAMAG; Derivatizer, CAMAG; Chromatogram Immersion Device III, CAMAG; Visualizer, CAMAG. Результати обробляли у програмному забезпеченні VisionCats, CAMAG.

Як об'єкти дослідження використовували ЛРС родини *Lamiaceae*, представлену на фармацевтичному ринку України як ЛРС (пакування у пачки) чи дієтичні добавки (фіточаї у пачках чи фільтр-пакетах), яку було придбано у різних регіонах України, а саме: траву шавлії лікарської («Віола», Запоріжжя, сер.131019; ДД «Фітосвіт», Вінниця, сер. 09012019); траву чебрецю повзучого («Лікарські рослини», Харків, сер. 281019; «Ліктрави», Житомир, сер. 30919); траву чебрецю звичайного (ДД «Цілющі рецепти Карпат», м. Кропивницький, сер. 09082019); траву материнки звичайної (Харків, місце збору – Харківська обл., 2019; «Лікарські рослини», Харків, сер. 290719); листя розмарину звичайного (Харків, місце збору – Миколаївська обл.; ДД «Цілющі рецепти Карпат», м. Кропивницький, сер. 22042019); ортосифону тичинкового листя («Ліктрави», Житомир, сер. 10319; ДД «Еліксир», Вінниця, 2019); м'яти перцевої листя («Ліктрави», Житомир, сер. 61218); лаванди вузьколистої листя (Харків, місце збору – Миколаївська обл.); лофанту анісового трава (місце збору – Харківська обл., 2019; «Лечец», Харків, місце збору – Полтавська обл., 2019); меліси лікарської листя («Ліктрави», Житомир, сер. 30319; «Лечец», Харків, місце збору – Харківська обл., 2019); гісопу лікарського трава (місце збору – Харківська обл., 2019); шандри звичайної трава («Лечец», Харків, місце збору – Миколаївська обл., 2019); собачої кропиви трава («Лечец», Харків, місце збору – Миколаївська обл., 2019; ДД «Фітосвіт», Вінниця, сер. 06112017). У дослідження було включено зразки василька тонкоцвітного (*Ocimum tenuiflorum* L.) іноземного походження (Anchrom, сер. RHD-404 (India); Gaia Herbs, сер. 00016748). Як стандартні зразки (СЗ) використовували кислоту розмаринову (USP, Lot F0M076), рутин (USP, Lot H1I146), а також лютеолін (ДФУ, сер. 1), гіперозид (USP, сер. 33520F), кислоту хлорогенову (EDQM, A0290470). Для реагенту проявлення використовували: аміноетиловий ефір дифенілборної кислоти (Aldrich, сер. BCBR8658V), макрогол 400 (Sigma Aldrich, сер. MKBF9334V). Пластинки HPTLC Si 60 F254 (сер. 1.05642.0001, Merck).

Нижче наведено методику ВЕТШХ-визначення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот з уніфікованими умовами хроматографування для ЛРС родини *Lamiaceae*, обраними за результатами експерименту.

Методика

Випробовуваний розчин: 0,5 г здрібненої на порошок сировини струшують із 5 мл метанолу Р протягом 10 хв, центрифугують або фільтрують. Використовують надосадову рідину.

Розчини порівняння 1: 0,2 мг/мл СЗ кислоти розмаринової у метанолі Р, 0,5 мг/мл СЗ рутину у метанолі Р.

Розчин порівняння 2 (SST): 0,2 мг/мл СЗ кислоти розмаринової і СЗ лютеоліну у метанолі Р.

Стаціонарна фаза: HPTLC Si 60 F254 (Merck).

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

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

Насичення: 20 хв із фільтрувальним папером.

Відносна вологість: 33%, насичений розчин $MgCl_2$.

Температура: 22 ± 5 °C.

Об'єм нанесення: по 4 мкл для випробовуваного розчину і розчинів порівняння.

Виявлення: перед дериватизацією – 254 нм (A), 366 нм (B), біле світло (C), після дериватизації – 366 нм (D), біле світло (E).

Реагенти для дериватизації: реагент 1 – 5 мг/мл аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти в етилацетаті, реагент 2 – 50 мг/мл макроголу 400 в дихлорметані.

Використання (автоматичне оприскування). Нагрівають пластинку при 100 °C протягом 3 хв, після охолодження проводять автоматичне оприскування сумішшю реагентів 1 і 2 (1:1).

Використання (автоматичне занурення). Нагрівають пластинку при 100 °C протягом 3 хв, занурюють ще теплу пластинку у реагент 1, висушують протягом 2 хв; потім занурюють пластинку у реагент 2, висушують протягом 2 хв і фотографують пластинку.

Результати дослідження та обговорення

У нашій роботі для визначення і порівняння ЛРС роду *Lamiaceae* як стаціонарну фазу використовували пластинки HPTLC Si 60 F254. У результаті виконаних експериментальних досліджень було обрано рухому фазу 1: етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (8:1:1), що застосовується в монографії на розмарин лікарський листя ВЕТШХ Асоціації [13] і меліси лікарської листя DAC [23], запропоновану як альтернативну в компендіум USP DSC 2019 (non-USP method) [11]. Як речовини порівняння, відносно яких здійснювали опис результатів, було обрано рутин і кислоту розмаринову, що у цій рухомій фазі при стандартизованих умовах мають $R_F \approx 0{,}2$ і $R_F \approx 0{,}8$ відповідно (рис. 1). Саме в цьому діапазоні розділяється максимальна кількість речовин, що представляють інтерес/є специфічними для цієї групи рослин. Для порівняння, в рухомій фазі 2 – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (15:1:1) [6–14] кислота розмаринова має $R_F \approx 0{,}7$, а рутин розміщується близько до старту ($R_F \approx 0{,}05$), тобто частина характеристичних речовин багатьох ЛРС роду зміщена у нижню частину пластини; у рухомій фазі 3 – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (75:15:15) [12] і рухомій фазі 4 – етилацетат Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р, кислота оцтова Р (68:18:7:7) [8, 14] рутин і кислота розмаринова зміщені у верхню частину пластини, діапазон для розділення специфічних речовин роду є суттєво меншим порівняно з рухомою фазою 1 (рис. 1).

При підготовці проб ЛРС робили екстрагування методом автоматичного струшування протягом 10 хв, дані умови забезпечували відтворювані результати хроматографічних відбитків.

Для нівелювання впливу кліматичних і сезонних факторів на результати хроматографічного аналізу ВЕТШХ, використовували стандартизовані умови для нанесення зразків і їх розміщення на пластинці; проводили – прекондиціювання пластинки за відносної вологості 33% і температури 22 ± 5 °C і хроматографування у насиченій протягом 20 хв камері відповідно до загальних розділів 2.8.25. «Високоефективна тонкошарова хроматографія» Європейської фармакопеї та ДФУ [6, 14] і <203> Процедура високоефективної тонкошарової хроматографії для ідентифікації засобів рослинного походження Американської фармакопеї [11].

Дериватизацію здійснювали як методом автоматичного оприскування сумішшю реагентів 1 і 2, так і шляхом послідовного занурення у реагенти 1 і 2 відповідно (залежно від наявного обладнання, див. методику).

Виявлення виконували до дериватизації – при 254 нм, 366 нм, білому світлі; і після дериватизації – при 366 нм, білому світлі.

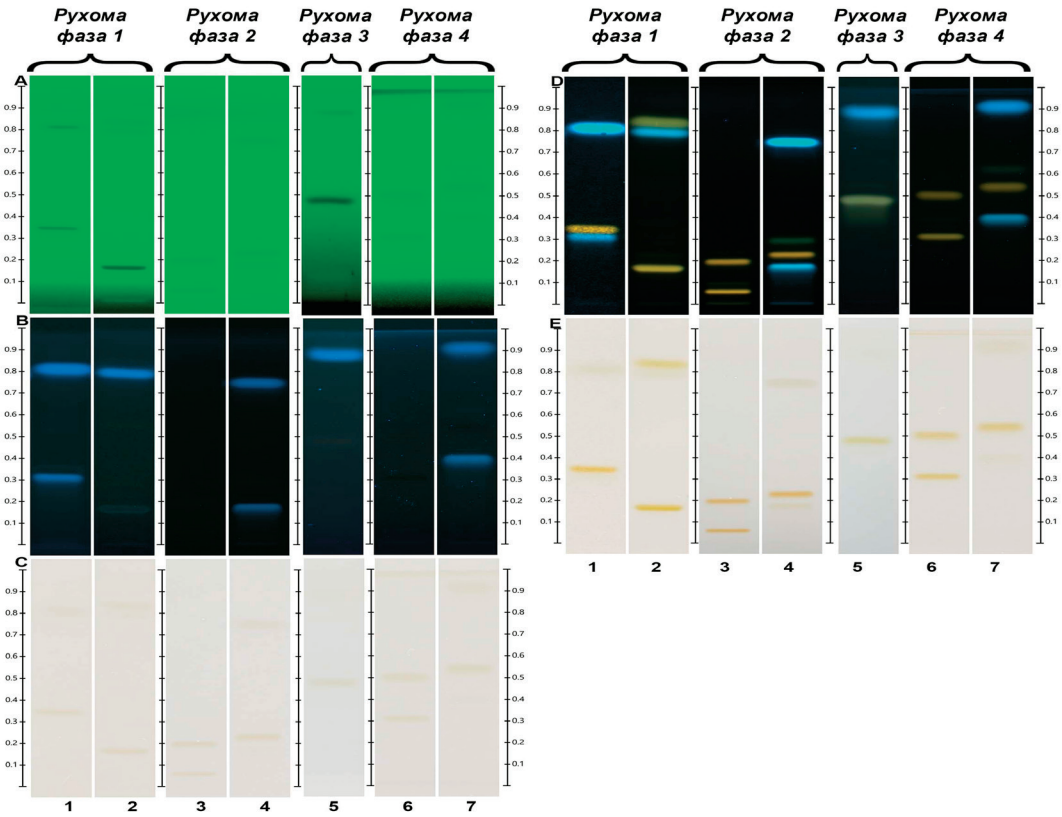

Рис. 1. **Вибір рухомої фази і стандартних зразків:**
рухома фаза 1 – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (8:1:1);
рухома фаза 2 – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (15:1:1);
рухома фаза 3 – етилацетат Р, кислота мурашина безводна Р, вода Р (75:15:15);
рухома фаза 4 – етилацетат Р, вода Р, кислота мурашина безводна Р,
кислота оцтова Р (68:18:7:7). Треки: 1 – кислота хлорогенова, гіперозид,
кислота кавова; 2 – рутин, кислота розмаринова, лютеолін; 3, 6 – рутин, гіперозид;
4, 7 – кислота хлорогенова, кверцетин, вітексин, кислота кавова; 5 – рутин, кислота
розмаринова. Виявлення: при 254 нм (*A*), 366 нм (*B*), білому світлі (*C*) перед
дериватизацією; і 366 нм (*D*), білому світлі (*E*) після дериватизації

Результати визначення хроматографічних профілів зразків вітчизняної ЛРС родини *Lamiaceae* наведено на рис. 2 (знімки) і рис. 3 (профілі). Наведено результати, отримані для різних зразків видів сировини, у різні місяці, у різних лабораторіях, на пластинках різних серій. У міжлабораторних випробуваннях коливання R_F для кислоти розмаринової становило $\Delta R_F \leq 0{,}05$.

Як можна побачити з рис. 2 (виявлення *B* і *D*), майже усі досліджувані рослини роду містять зону блакитної флуоресценції з $R_F \approx 0{,}8$, що відповідає за розміщенням і кольором СЗ кислоти розмаринової; окрім зразка шандри (зразок 23), для якої зона з $R_F \approx 0{,}8$ у виявленні *D* відрізняється за кольором флуоресценції (синя замість блакитної). Згідно з інтенсивністю зони, що відповідає СЗ кислоти розмаринової, при виявленні *B* і *D*, більшість зразків ЛРС має інтенсивність більшу – зразки шавлії лікарської, чебрецю звичайного, материнки звичайної, розмарину лікарського, м'яти перцевої, гісопу лікарського, меліси лікарської, лофанту анісового (3, 4, 7–11, 16, 18–22) чи близьку – зразки чебрецю повзучого, васильку тонкоцвітного (треки 5, 6, 12, 13) порівняно зі СЗ кислоти розмаринової; меншою інтенсивністю характе-

ризуються зразки ортосифону тичинкового, лаванди вузьколистої і собачої кропиви (треки 14, 15, 17, 24, 25) (рис. 2, рис. 3), що дає змогу оцінити приблизну кількість кислоти розмаринової у зразках ЛРС і пропонувати кислоту розмаринову як речовину порівняння для більшості ЛРС рослин виду як для ідентифікації, так і для ліміттесту, а також для оцінювання придатності хроматографічної системи. Вище зони, що відповідає кислоті розмаринової, усі досліджувані зразки мають 1 чи 2 червоні зони (зона червоної флуоресценції біля фронту відповідає хлорофілам).

Як ми бачимо при виявленні *D*, зразки собачої кропиви (треки 24, 25), м'яти перцевої (трек 16) та гісопу лікарського (трек 22) містять жовто-оранжеву флуоресціюючу зону різної інтенсивності з $R_F \approx 0{,}2$, що відповідає за розміщенням та кольором СЗ рутину; зразки шавлії лікарської і чебрецю повзучого містять пару жовто-оранжевих зон слабкої інтенсивності на рівні зони, що відповідає СЗ рутину. У зразку м'яти перцевої (трек 16) над зоною рутину розміщена червона флуоресціююча зона (неоеріоцитрин/еріоцитрин), що також проявляється і при виявленні *E*.

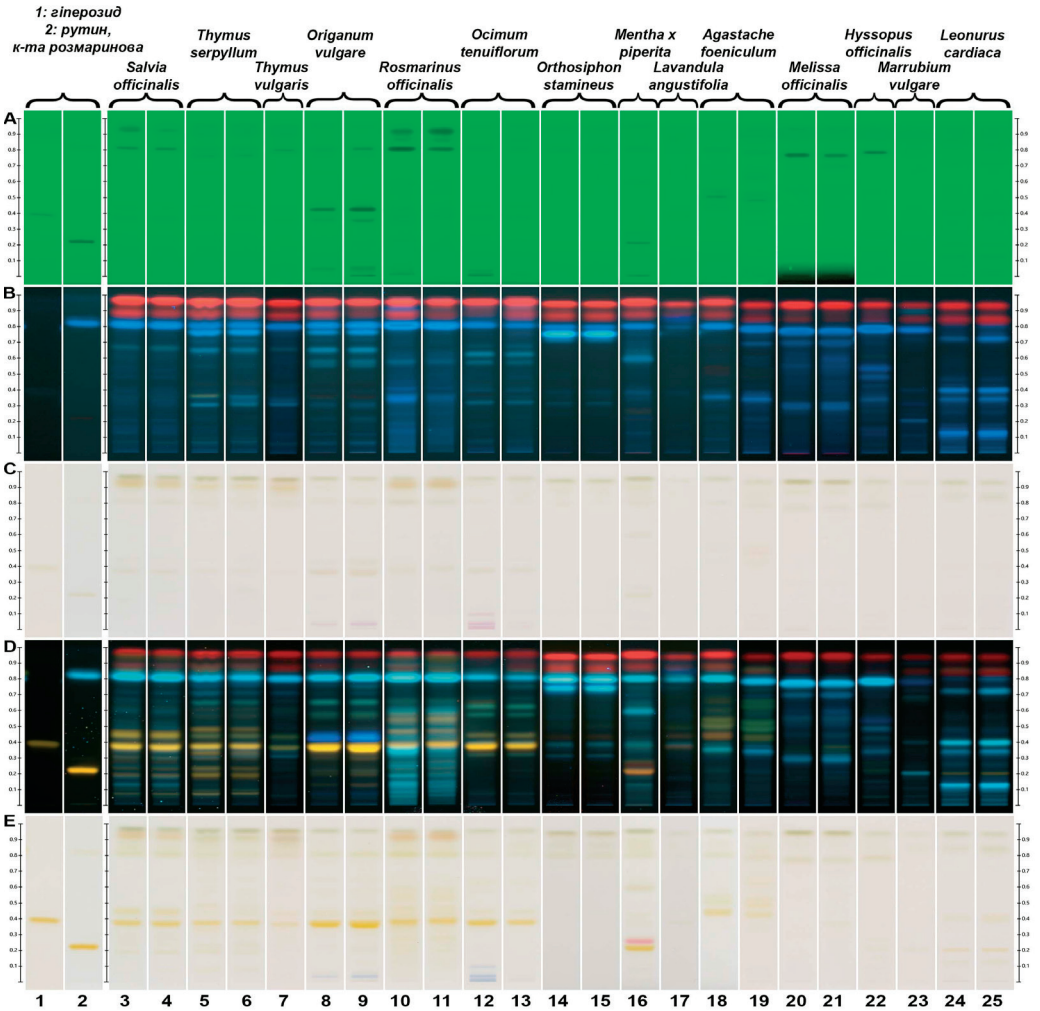

Рис. 2. **ВЕТШХ – хроматографічні профілі (знімки) ЛРС деяких видів родини *Lamiaceae* флори України при 254 нм (А), 366 нм (*B*), білому світлі (*C*) перед дериватизацією; 366 нм (*D*), білому світлі (*E*) після дериватизації***

Придатність хроматографічної системи (виявлення *D*): кислота розмаринова – зона блакитної флуоресценції з $R_F \approx 0{,}8$; рутин – зона жовто-оранжевої флуоресценції з $R_F \approx 0{,}2$.

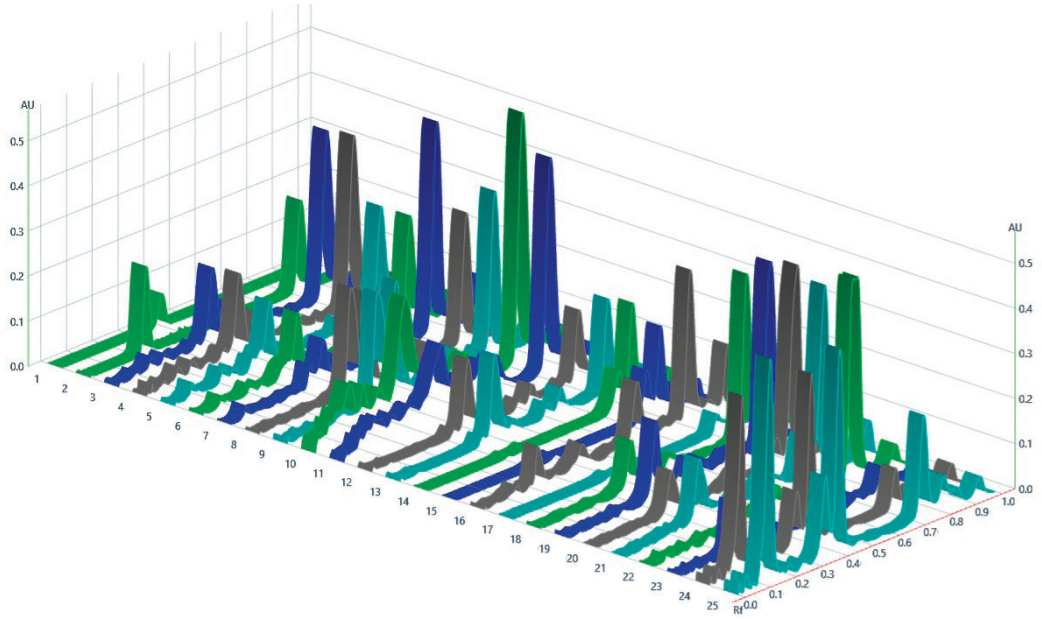

Рис. 3. **ВЕТШХ – хроматографічні профілі ЛРС деяких видів родини *Lamiaceae* флори України при 366 нм (*D*) після дериватизації:**
треки – 1 – гіперозид; 2 – рутин, кислота розмаринова; 3, 4 – *Salvia officinalis*; 5, 6 – *Thymus serpyllum*; 7 – *Thymus vulgaris*; 8, 9 – *Origanum vulgare*; 10, 11 – *Rosmarinus officinalis*; 12, 13 – *Ocimum tenuiflorum*; 14, 15 – *Orthosiphon stamineus*; 16 – *Mentha piperita*; 17 – *Lavandula angustifolia*; 18, 19 – *Agastache foeniculum*; 20, 21 – *Melissa officinalis*; 22 – *Hyssopus officinalis*; 23 – *Marrubium vulgare*; 24, 25 – *Leonurus cardiaca*

При виявленні *D*, у середній частині пластини більшість ЛРС роду *Lamiaceae* містить характеристичні відбитки із зон різної інтенсивності, що відповідають флавонам – зони жовто-оранжевої флуоресценції (глікозиди лютеоліну) і жовто-зеленої флуоресценції (глікозиди апігеніну). Так, у зразках шавлії лікарської (треки 3, 4) і чебрецю звичайного (трек 7), а також василька тонкоцвітного (треки 12, 13) у середній частині пластини виявляється характерна пара жовто-оранжевих зон різної інтенсивності ($R_F \approx$ 0,37 і $R_F \approx$ 0,45 відповідно); із них верхня зона, ймовірно лютеолін-7-О-глюкозид, у невеликій кількості наявна також у зразках меліси лікарської (трек 20, 21). При цьому, зразки василька тонкоцвітного мають специфічну пару зеленуватих зон, розміщених між парою жовто-оранжевих зон і розмариновою кислотою, а зразки шавлії лікарської й чебрецю звичайного мають дуже близькі хроматографічні профілі. Інтенсивна жовто-оранжева флуоресціююча зона з $R_F \approx$ 0,37 виявляється також у зразках чебрецю повзучого (треки 5, 6), материнки звичайної (треки 8, 9), розмарину лікарського (треки 10, 11). У діапазоні між цією зоною і зоною, що відповідає кислоті розмариновій, зразки чебрецю повзучого мають характеристичний відбиток із жовто-зеленуватої, оранжевої, зеленуватої зон; зразки материнки звичайної – з інтенсивної блакитної та двох зеленуватих зон; зразки розмарину лікарського – із двох жовто-оранжевих, декількох блакитних і зеленуватої зони. Зразки лофанту анісового (треки 18, 19) у верхній половині пластини містять характеристичний відбиток з блакитної, жовто-оранжевої та пари зеленуватих зон, інші зеленуваті зони можуть бути наявними. Зразки собачої кропиви (треки 24, 25) містять пару інтенсивних блакитних зон у середній частині пластинки між зонами, що відповідають СЗ рутину і СЗ кислоти розмаринової.

При виявленні *B* зразки ортосифону тичинкового мають інтенсивну зону блакитної флуоресценції з $R_F \approx 0{,}78$ (ймовірно, синенсетин), розміщену під зоною, що відповідає СЗ кислоти розмаринової. При виявленні *D* ця зона має яскраву блакитну флуоресценцію. Виявлена зона є специфічною для ЛРС ортосифону тичинкового і відрізняється від зони блакитної флуоресценції з $R_F \approx 0{,}78$, що виявляється у низці рослин роду *Lamiaceae* при виявленні *D* (собача кропива, треки 24, 25; меліса лікарська, треки 20, 21 та ін.).

Хроматографічний профіль лаванди вузьколистої, шандри звичайної й гісопу лікарського не містив специфічних інтенсивних зон жовто-оранжевої чи зелено-жовтої флуоресценції, притаманної флавоноїдним речовинам.

Слід зазначити, що наведені хроматографічні профілі відповідають зразкам ЛРС, використаним в аналізі. Профілі інших зразків можуть відрізнятися внаслідок природної мінливості сировини й при встановленні тотожності ЛРС аналітик має виокремити/валідувати найбільш характерні зони ЛРС.

Висновки

1. Підібрано уніфіковані умови хроматографування для виявлення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот за методом ВЕТШХ у ЛРС родини *Lamiaceae*, а саме: стаціонарна фаза – HPTLC Si 60 F254; рухома фаза – етилацетат Р, мурашина кислота безводна Р, вода Р (8:1:1); пробопідготовка – екстрагент метанол; метод екстракції – струшування, час – 10 хв; відносна вологість – 33%, температура – 22 ± 5 °С; дериватизація з реагентами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти й макроголу; виявлення – 254 нм, 366 нм, біле світло до дериватизації, 366 нм, біле світло – після дериватизації, що забезпечують відтворюваність результатів з $\Delta R_F \leq 0{,}05$.

2. Встановлено, що характерною речовиною для більшості досліджуваних видів роду *Lamiaceae* є кислота розмаринова, що дає змогу пропонувати її як речовину порівняння як для «Ідентифікації», так і для «Ліміт-тесту», а також для оцінювання придатності хроматографічної системи. Виокремлені маркерні зони досліджуваних видів роду флори України можуть бути використані під час встановлення критеріїв прийнятності тестів «Ідентифікація» і «Домішки».

3. Результати дослідження ВЕТШХ-профілю флавоноїдів і гідроксикоричних кислот ЛРС родини *Lamiaceae* можуть слугувати базою у разі розроблення додаткових чи альтернативних методик у тестах «Ідентифікація», «Домішки», «Ліміт-тест». Одержані хроматографічні профілі ВЕТШХ можуть бути використані як референтні знімки під час контролю якості і як ілюстративний матеріал для полегшення інтерпретації табличних результатів ВЕТШХ-аналізу.

4. Для валідації виділених маркерних зон необхідно проведення подальших досліджень зі залученням більшої кількості зразків кожного виду сировини з різних регіонів зростання України.

Список використаної літератури

1. *Benedec D., Hanganu D., Oniga I. et al.* Assessment of rosmarinic acid content in six *Lamiaceae* species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential // Pakistan J. Pharmac. Sci. – 2015. – V. 28 (6) (Suppl.). – P. 2297–2303.

2. *Sakkas H., Papadopoulou C.* Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils // J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – V. 27 (3). – P. 429–438. https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024

3. *Прокопенко С. А.* Исследование биологически активных веществ растений семейства Яснотковых флоры Украины и создание на их основе лекарственных средств: автореф. дис. … д-р фарм. наук: 15.00.02. Харьков. гос. фармац. ин-т. – Харьков, 1988. – 44 с.

4. Лікарські рослини: енциклопед. дов. / За ред. *А.* М. Гродзинського. – К., 1990. – 544 с.

5. Державний реєстр лікарських засобів України. URL: http://www.drlz.com.ua/МОЗ України

6. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014. – 3655 p.

7. Pharmeuropa Archives. Texts for comment 24.4. EDQM, 2012. – URL: https://pharmeuropa.edqm.eu/app/Archives/content/Archives-37164/Pharmeuropa_24.04E.pdf

8. Pharmeuropa Archives. Texts for comment Pharmeuropa 27.3. EDQM, 2015. – URL: https://pharmeuropa.edqm.eu/app/Archives/content/Archives-37178/Pharmeuropa_27.03E.pdf

9. Rosemary / USP 39. Dietary Supplements. – Rockville: USP, 2016. – P. 6813–6814.

10. Holy Basil / USP 39. Dietary Supplements. – Rockville: USP, 2016. – P. 6713–6715.

11. USP Dietary Supplements Compendium. 2019. – URL: https://www.usp.org/products/dietary-supplements-compendium

12. Russia State Pharmacopoeia 13 (XIII) online. – URL: http://pharmacopoeia.ru/en/

13. Method collection // HPTLC Association. – URL: https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm.

14. Державна фармакопея України 2.0. В 3 т. – Харків: ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. – Т. 3. – 732 с.

15. *Janicsák G., Háznagy-Radnai E., Engel R. et al.* TLC-densitometry of rosmarinic and caffeic acids in the evaluation of *Lamiaceae* species growing in central Europe // J. Planar Chromatography – Modern TLC. – 2013. – V. 26 (2). – P. 132–136. https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.2.5

16. *Bazylko A., Strzelecka H*. A HPTLC densitometric determination of luteolin in Thymus vulgaris and its extracts, // Fitoterapia. – 2007. – V. 78 (6). – P. 391–395. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.007

17. *Benedec D., Oniga I., Kozma-Imre A. et al.* Determination of rosmarinic acid by HPTLC-image analysis in medicinal teas and their biological properties // Farmacia. – 2017. – V. 65 (4). – P. 605–609.

18. *Fecka I., Turek S.* Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques // Food Chemistry. – 2008. – V. 108 (3). – P. 1039–1053.

19. *Bardakci H., Akaydin G., Kirmizibekmez H., Yesilada E.* Validated HPTLC Method for the Quantitative Analysis of Rosmarinic Acid in Several Salvia Sp // Turk. J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 11 (3). – P. 245–254.

20. *Asha D., Lizzy M.* Chemical profiling of Thymus vulgaris L. using HPTLC // J. Pharmacognosy and Phytochem. – 2017. – V. 6 (4). – P. 1017–1023.

21. *Asha D., Lizzy M., Rishad K. S.* Evaluation of HPTLC Fingerprints of Flavonoids and Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants of *Lamiaceae* Family // Inter. J. Pharmacognosy and Phytochem. Res. – 2015. – V. 7 (2). – P. 240–245.

22. *Reich E., Schibli A.* High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p.

23. Deutscher Arzneimittel – Codex. Neues Rezeptur-Formularium. – URL: https://dacnrf.pharmazeutische-zeitung.de/

References

1. *Benedec D., Hanganu D., Oniga I. et al.* Assessment of rosmarinic acid content in six *Lamiaceae* species extracts and their antioxidant and antimicrobial potential // Pakistan J. Pharmac. Sci. – 2015. – V. 28 (6) (Suppl.). – P. 2297–2303.

2. *Sakkas H., Papadopoulou C.* Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils // J. Microbiol. Biotechnol. – 2017. – V. 27 (3). – P. 429–438. https://doi.org/10.4014/jmb.1608.08024

3. *Prokopenko S. A.* Issledovanie biologicheski aktivnyh veshchestv rastenij semejstva YAsnotkovyh flory Ukrainy i sozdanie na ih osnove lekarstvennyh sredstv: avtoref. dis. … d-r farm. nauk: 15.00.02. Har'kov. gos. farmac. in-t. – Har'kov, 1988. – 44 s.

4. Likarski roslyny: entsykloped. dov. / Za red. *A. M. Hrodzynskoho*. – K., 1990. – 544 s.

5. Derzhavnyi reiestr likarskykh zasobiv Ukrainy. – URL: http://www.drlz.com.ua/MOZ Ukrainy

6. European Pharmacopoeia 8.0. – Strasbourg: EDQM, 2014. – 3655 p.

7. Pharmeuropa Archives. Texts for comment 24.4. EDQM, 2012. – URL: https://pharmeuropa.edqm.eu/app/Archives/content/Archives-37164/Pharmeuropa_24.04E.pdf

8. Pharmeuropa Archives. Texts for comment Pharmeuropa 27.3. EDQM, 2015. – URL: https://pharmeuropa.edqm.eu/app/Archives/content/Archives-37178/Pharmeuropa_27.03E.pdf

9. Rosemary / USP 39. Dietary Supplements. – Rockville: USP, 2016. – P. 6813–6814.

10. Holy Basil / USP 39. Dietary Supplements. – Rockville: USP, 2016. – P. 6713–6715.

11. USP Dietary Supplements Compendium. 2019. – URL: https://www.usp.org/products/dietary-supplements-compendium

12. Russia State Pharmacopoeia 13 (XIII) online. – URL: http://pharmacopoeia.ru/en/

13. Method collection // HPTLC Association. – URL: https://www.hptlc-association.org/methods/methods.cfm.

14. Derzhavna farmakopeia Ukrainy 2.0. V 3 t. – Kharkiv: DP «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2015. – T. 3. – 732 c.

15. *Janicsák G., Háznagy-Radnai E., Engel R. et al.* TLC-densitometry of rosmarinic and caffeic acids in the evaluation of *Lamiaceae* species growing in central Europe // J. Planar Chromatography – Modern TLC. – 2013. – V. 26 (2). – P. 132–136. https://doi.org/10.1556/JPC.26.2013.2.5

16. *Bazylko A., Strzelecka H.* A HPTLC densitometric determination of luteolin in Thymus vulgaris and its extracts, // Fitoterapia. – 2007. – V. 78 (6). – P. 391–395. https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.01.007

17. *Benedec D., Oniga I., Kozma-Imre A. et al.* Determination of rosmarinic acid by HPTLC-image analysis in medicinal teas and their biological properties // Farmacia. – 2017. – V. 65 (4). – P. 605–609.

18. *Fecka I., Turek S.* Determination of polyphenolic compounds in commercial herbal drugs and spices from *Lamiaceae*: thyme, wild thyme and sweet marjoram by chromatographic techniques // Food Chemistry. – 2008. – V. 108 (3). – P. 1039–1053.

19. *Bardakci H., Akaydin G., Kirmizibekmez H., Yesilada E.* Validated HPTLC Method for the Quantitative Analysis of Rosmarinic Acid in Several Salvia Sp // Turk. J. Pharm. Sci. – 2014. – V. 11 (3). – P. 245–254.

20. *Asha D., Lizzy M.* Chemical profiling of Thymus vulgaris L. using HPTLC // J. Pharmacognosy and Phytochem. – 2017. – V. 6 (4). – P. 1017–1023.

21. *Asha D., Lizzy M., Rishad K. S.* Evaluation of HPTLC Fingerprints of Flavonoids and Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plants of *Lamiaceae* Family // Inter. J. Pharmacognosy and Phytochem. Res. – 2015. – V. 7 (2). – P. 240–245.

22. *Reich E., Schibli A.* High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. – New-York: Thieme, 2007. – 264 p.

23. Deutscher Arzneimittel – Codex. Neues Rezeptur-Formularium. – URL: https://dacnrf.pharmazeutische-zeitung.de/

Надійшла до редакції 13 березня 2020 р.
Прийнято до друку 23 березня 2020 р.

К. О. Хохлова (htpps://orcid.org/0000-0002-7151-6763),
Л. І. Вишневська (htpps://orcid.org/0000-0002-6887-3591),
О. А. Здорик (htpps://orcid.org/0000-0002-2721-0281),
Л. А. Ковпак (htpps://orcid.org/0000-0002-4914-2670)
Національний фармацевтичний університет, м. Харків

ПОРІВНЯННЯ ХРОМАТОГРАФІЧНИХ ПРОФІЛЕЙ ФЛАВОНОЇДІВ І ГІДРОКСИКОРИЧНИХ КИСЛОТ ДЕЯКИХ ВИДІВ РОДИНИ *LAMIACEAE*, ПРЕДСТАВЛЕНИХ НА ФАРМАЦЕВТИЧНОМУ РИНКУ УКРАЇНИ

Ключові слова: високоефективна тонкошарова хроматографія (ВЕТШХ), *Lamiaceae*, ідентифікація, флавоноїди, гідроксикоричні кислоти

А Н О Т А Ц І Я

Рослини родини *Lamiaceae* є традиційними засобами народної та наукової медицини. Вони представлені на вітчизняному фармацевтичному ринку як лікарська рослинна сировина, харчові продукти, засоби аромотерапії, входять до складу препаратів для орального застосування та ін. З огляду на сучасний напрям міжнародної гармонізації умов до стандартизації фітозасобів, актуальним завданням є розроблення уніфікованих методик ідентифікації ВЕТШХ для лікарської рослинної сировини, зокрема і родини *Lamiaceae*.

Метою роботи був вибір уніфікованих хроматографічних умов ВЕТШХ для визначення хроматографічних профілей флавоноїдів і гідроксикоричних кислот лікарської рослинної сировини видів родини *Lamiaceae* флори України, представлених на вітчизняному фармацевтичному ринку: шавлії лікарської, чебрецю повзучого, чебрецю звичайного, материнки звичайної, розмарину звичайного, ортосифону тичинкового, м'яти перцевої, лаванди вузьколистої, лофанту анісового, меліси лікарської, гісопу лікарського, шандри звичайної, собачої кропиви; і порівняння їх хроматографічних відбитків.

Об'єктами дослідження була лікарська рослинна сировина родини *Lamiaceae* з вітчизняного фармацевтичного ринку. Дослідження здійснювали методом ВЕТШХ в автоматичній системі виробництва CAMAG, Швейцарія, на базі лабораторії CAMAG, Мутенц, Швейцарія, і лабораторії ННТЦХТД ННІПФ НФаУ, Харків, Україна.

Здійснено вибір уніфікованих умов хроматографування для виявлення флавоноїдів і гідроксикоричних кислот за методом ВЕТШХ у лікарській рослинній сировині родини *Lamiaceae*: стаціонарна фаза – HPTLC Si 60 F254; рухома фаза – етилацетат Р, мурашина кислота безводна Р, вода Р (8:1:1); пробо під-

готовка – екстрагент метанол, метод екстракції – струшування, час – 10 хв; відносна вологість – 33 %, температура – 22 ± 5 °С; дериватизація з реагентами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти й макроголу; виявлення – 254 нм, 366 нм, біле світло до дериватизації; 366 нм, біле світло – після дериватизації. Ці умови забезпечували відтворюваність результатів із $\Delta R_F \leq 0{,}05$. Встановлено, що майже для всіх досліджуваних видів роду виявляється зона, що відповідає за розміщенням і кольором кислоті розмаринової, що дає змогу пропонувати її як речовину порівняння як для «Ідентифікації», так і для «Ліміт-тесту», а також для оцінювання придатності хроматографічної системи. Для досліджуваних зразків вітчизняної сировини виокремлені специфічні зони, що можуть бути використані під час встановлення критеріїв прийнятності тестів «Ідентифікація» і «Домішки». Після проведення валідаційних досліджень зі залученням більшої кількості зразків кожного виду сировини з різних регіонів України, отримані хроматографічні профілі ВЕТШХ можуть бути рекомендовані як референтні знімки у разі контролю якості вітчизняної лікарської рослинної сировини родини *Lamiaceae.*

Е. А. Хохлова (htpps://orcid.org/0000-0002-7151-6763),
Л. И. Вишневская (htpps://orcid.org/0000-0002-6887-3591),
А. А. Здорик (htpps://orcid.org/0000-0002-2721-0281),
Л. А. Ковпак (htpps://orcid.org/0000-0002-4914-2670)
Национальный фармацевтический университет, г. Харьков

СРАВНЕНИЕ ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ ПРОФИЛЕЙ ФЛАВОНОИДОВ И ГИДРОКСИКОРИЧНЫХ КИСЛОТ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE*, ПРЕДСТАВЛЕННЫХ НА ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОМ РЫНКЕ УКРАИНЫ

Ключевые слова: высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), *Lamiaceae*, идентификация, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты

А Н Н О Т А Ц И Я

Растения семейства *Lamiaceae* являются традиционными средствами народной и научной медицины. Они представлены на отечественном фармацевтическом рынке как лекарственное растительное сырье, пищевые продукты, средства аромотерапии, входят в состав препаратов для орального применения и др. Следуя современному направлению международной гармонизации условий к стандартизации фитосредств, актуальным заданием представляется разработка унифицированных методик идентификации ВЭТСХ для лекарственного растительного сырья, в том числе и для семейства *Lamiaceae*.

Целью работы был выбор унифицированных хроматографических условий ВЭТСХ для определения хроматографических профилей флавоноидов и гидрокискоричных кислот лекарственного растительного сырья видов семейства *Lamiaceae* флоры Украины, представленных на отечественном фармацевтическом рынке: шалфея лекарственного, чабреца ползучего, чабреца обычного, душицы обычной, розмарина обыкновенного, ортосифона тычиночного, мяты перечной, лаванды узколистной, лофанта анисового, мелиссы лекарственной, иссопа лекарственного, шандры обыкновенной, пустырника сердечного; и сравнение их хроматографических профилей.

Объектами исследования было лекарственное растительное сырье семейства *Lamiaceae* с отечественного фармацевтического рынка. Исследование осуществляли методом ВЭТСХ в автоматической системе производства CAMAG, Швейцария, на базе лаборатории CAMAG, Муттенц, Швейцария, и лаборатории УНТЦХТИ УНИПФ НФаУ, Харьков, Украина.

Проведен выбор унифицированных условий хроматографирования для определения флавоноидов и гидроксикоричных кислот методом ВЭТСХ в ЛРС семейства *Lamiaceae*: стационарная фаза – HPTLC Si 60 F254; подвижная фаза – этилацетат Р, кислота муравьиная безводная Р, вода Р (8:1:1); пробоподготовка – экстрагент метанол; метод экстракции – струшивание, длительность – 10 мин; относительная влажность – 33%, температура – 22 ± 5 °С; дериватизация с реагентами аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты и макрогола; обнаружение – 254 нм, 366 нм, белый свет до дериватизации; 366 нм, белый свет – после дериватизации. Эти условия обеспечивали воспроизводимость результатов с $\Delta R_F \leq 0{,}05$. Установлено, что почти для всех исследуемых видов рода обнаруживается зона, соответствующая по размещению и цвету кислоте розмариновой, что позволяет рекомендовать ее в качестве вещества сравнения как для «Идентификации», так и для «Лимит-теста», а также для определения пригодности хроматографической системы. Для исследуемых образцов отечественного сырья определены специфические зоны, которые могут быть использованы при установлении критериев пригодности тестов «Идентификация» и «Примеси». После проведения валидационных исследований с привлечением большего количества образцов каждого вида сырья из различных регионов произрастания Украины, полученные хроматографические профили ВЭТСХ могут быть рекомендованы для контроля качества отечественного лекарственного растительного сырья семейства *Lamiaceae*.

K. O. Khohklova (htpps://orcid.org/0000-0002-7151-6763),
L. I. Vyshnevska (htpps://orcid.org/0000-0002-6887-3591),
O. A. Zdoryk (htpps://orcid.org/0000-0002-2721-0281),
L. A. Kovpak (htpps://orcid.org/0000-0002-4914-2670)
National University of Pharmacy, Kharkiv

COMPARISON OF CHROMATOGRAPHIC PROFILES OF FLAVONOIDS AND HYDROXYCINNAMIC ACIDS OF SOME SPECIES FROM LAMIACEAE GENUS ON UKRAINIAN PHARMACEUTICAL MARKET

Key words: high-performance thin-layer chromatography (HPTLC), *Lamiaceae*, identification, flavonoids, hydroxycinnamic acids

A B S T R A C T

The plants from the *Lamiaceae* family are traditional remedies of folk and scientific medicine. They are present at the domestic pharmaceutical market as herbal raw material (HRM); dietary supplements; aromatherapy; as well as being included in the composition of drugs for oral use etc. According to the modern direction of international harmonization of conditions for standardizations of herbal drugs, the topical issue is the development of unified methods of HPTLC identification for HRM, including the *Lamiaceae* family.

The aim of the work was the selection of the unified HPTLC chromatographic conditions for identification of chromatographic profiles of flavonoids and hydroxycinnamic acids of HRM of some *Lamiaceae* species of Ukraine's flora, presented at domestic pharmaceutical market, such as Sage, Wild Thyme, Thyme, Oregano, Rosemary, Java tea, Peppermint, Lavender, Anise hyssop, Melissa, Hyssop, White horehound, Motherwort; and comparison of their chromatographic fingerprints.

As objects of investigation, the HRM of *Lamiaceae* family presented at the Ukrainian pharmaceutical market were used. The investigation was conducted by HPTLC procedure using an automatic herbal system of CAMAG, Switzerland at the base of CAMAG laboratory, Muttenz, Switzerland and laboratory of ESTCCTI ESIPP, NUPh, Kharkiv, Ukraine.

The harmonized chromatographic conditions for determination of flavonoids and hydroxycinnamic acids for HRM of *Lamiaceae* species were chosen, these were: stationary phase – HPTLC Si 60 F254; mobile phase – ethyl acetate, formic acid anhydrous, water (8:1:1); sample preparation: solvent – methanol; method of extraction – shaking for 10 min; relative humidity: 33%, temperature 22 ± 5 °C; derivatization with Natural product and PEG reagents; detection – 254 nm, 366 nm, white light before derivatization: 366 nm and white light after derivatization. The reproducibility of results in these chromatographic conditions was $\Delta R_F \leq 0{,}05$. It was established, that for all investigated species of the family the zone corresponding with the position and colour to rosmarinic acid was detected, thus it can be used as standard substance for «Identification», «Limit-test» and for chromatographic system suitability test. For investigated samples of domestic HRM, the specific zones that can be used for setting acceptance criteria of the «Identification» and «Foreign matters» tests were conducted. After validation investigation involving greater numbers of samples of each species from different growing regions of Ukraine, the obtained HPTLC chromatographic fingerprints could be recommended as reference images for quality control of home-grown HRM of *Lamiaceae* family.

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