

УДК: 615.07: 615.32:615.451.1

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА НАСТОЙКИ БОЯРЫШНИКА МЕТОДОМ ВЭТСХ

Хохлова Е.А.

Национальный фармацевтический университет,
Харьков
kateryna_khokhlova@ukr.net

Вступление. Настойка боярышника – это один из наиболее часто используемых фитопрепаратов на отечественном фармацевтическом рынке. Согласно Государственному регистру лекарственных средств на фармацевтический рынок Украины поступают предложения от 13 отечественных производителей [1].

Исходным сырьем при производстве настойки боярышника являются плоды боярышника. Плоды боярышника широко распространены на территории Украины [2, 3] и являются фармакопейным сырьем [4-7]. По данным публикации [3] на территории Украины встречается около 30 видов боярышника. Вместе с тем различные исследователи выделяют формы и гибриды боярышника в отдельные виды, что значительно увеличивает число видов [8, 9]. В монографию фармакопеи Украины «Плоды боярышника» и частную статью ГФ СССР 11 изд. включено 12 различных видов боярышника [4, 7], ареал распространения данных видов охватывает Центральную и Восточную Европу, Европейскую часть Сибири (Средний Восток) и др.

В отличие от синтетических лекарственных препаратов, активные ингредиенты которых имеют постоянную химическую структуру, качественный и количественный состав биологически активных веществ (БАВ) лекарственного растительного сырья (ЛРС) и растительных препаратов может отличаться, что обусловлено рядом факторов: место произрастания, срок сбора ЛРС и др. [10]. Данная «естественная» вариабельность БАВ плодов боярышника одного вида и возможность использования большого количества различных видов в производстве готовых препаратов, создает трудности в стандартизации растительных препаратов в общем, и настойки боярышника, в частности, и должна быть учтена при разработке их методов контроля качества.

Так, для разработки специфичной и воспроизводимой методики идентификации необходимо обеспечение ряда параметров: использование метода и соответствующего оборудования, обеспечивающего воспроизводимые результаты; использование большой выборки (большого количества различных образцов); тщательное соблюдение процедуры выполнения метода. Как метод идентификации был выбран метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) – современный, автоматизированный метод, пригодный для анализа ЛРС и растительных

препаратов, который является более чувствительным, чем традиционная ТСХ, при соблюдении стандартизированной процедуры и использования соответствующего оборудования способен обеспечивать воспроизводимые результаты [11].

Целью данной работы была разработка методики идентификации настойки боярышника методом ВЭТСХ, которую можно было бы использовать для изучения стабильности препарата и установления его сроков годности.

Материалы и методы. В нашем исследовании было проанализировано 13 образцов настойки боярышника от 8 производителей из Украины и России. Образцы настойки боярышника: <Здоровье>, сер.: 20214; 10114; 50415, Украина; <Виола>, сер.: 69063, Украина; <Красная звезда>, сер.: 450715, Украина; <Тернофарм>, сер.: 430513; 80910; 90910; 110910, Украина; <Флора Кавказа>, сер.: 120315, Россия; <Фармацевтическая фабрика>, сер.: 160415, Украина; <Лубныфарм>, сер.: 741114, Украина; <Фитофарм>, сер.: 630115, Украина.

Исследование было проведено на базе лаборатории «САМАГ», Муттенц, Швейцария в октябре 2015 г. *Пластины:* HPTLC glass, 20x10 cm, Si 60 F₂₅₄, Merck, сер.: 1.05642.0001. *Оборудование:* Automatic TLC Sampler 4, CAMAG; Twin Trough Chamber, 20x10 cm, CAMAG; Chromatogram Immersion Device III, CAMAG; TLC Plate Heater III, CAMAG; Automatic Development Chamber ADC 2, CAMAG; Visualizer, CAMAG; TLC Scanner, CAMAG; фильтровальная бумага для насыщения камеры, CAMAG; центрифуга EBA21, Hettich; ультразвуковая баня SW 3H, Sono Swiss; аналитические весы MS 205 DU, Mettler-Toledo. *Реактивы:* дихлорметан, Acros Organics, for HPLC, сер.: 1335297; метанол, Roth, HPLC Ultra Gradient Grade, сер.: 1042801; муравьиная кислота, Acros Organics, 98%, сер.: AO343914; этилацетат, Acros Organics, 99.5%, сер.: AO355705; этанол абс., Merck, 99.8%, сер.: 9500090; аминоэтиловый эфир дифенилборной кислоты, TCI Europe, Batch: D0281. *Стандартные образцы:* гиперозид, USP, сер. 33520F; рутин, EDQM, сер. A0299493; кислота хлорогеновая, EDQM, сер. A0290470.

Для идентификации настойки боярышника методом ВЭТСХ как группа биологически активных веществ были выбраны флавоноиды. Данная группа БАВ используется для контроля качества исходного сырья настойки в монографии плоды боярышника [4-7]. Методика была разработана, учитывая формат и стиль изложения методик ТСХ, приведенных в монографиях на плоды боярышника в европейской и украинской фармакопеях. При разработке методики идентификации настойки боярышника были предложены: *условия приготовления испытуемого раствора и раствора сравнения, раствор на специфическую пригодность системы, маркер интенсивности, нанесение, элюирование, описание результатов.*

Для изучения *специфичности* методом ВЭТСХ сравнивали хроматографические отпечатки 13 образцов настойки боярышника промышленного

производства с лабораторным образцом настойки боярышника, приготовленным из аутентичного сырья *C. laevigata* (*C. oxyacantha*) *fructus* (растворитель – 70 % этанол, соотношение – 1:10) и *C. laevigata* (*C. oxyacantha*) *fructus* (растворитель – метанол, соотношение – 1:10). Для обеспечения воспроизводимых результатов анализ был проведен в соответствии с процедурой <203> «Процедура высокоэффективной тонкослойной хроматографии для идентификации средств растительного происхождения» [11]. Визуальную оценку результатов хроматограмм испытуемых растворов проводили в сравнении с растворами сравнения (положение, окраска), интенсивность оценивалась по сравнению с маркером интенсивности раствора сравнения.

Результаты и обсуждение.

Разработанная методика идентификации методом ВЭТСХ.

Раствор на специфическую пригодность системы (СПС): 3.0 мг кислоты хлорогеновой и 2.5 мг гиперозида растворяют в 10 мл метанола.

Испытуемый раствор: После центрифугирования или фильтрования 5 мл настойки используют фильтрат или надосадочную жидкость как испытуемый раствор.

Раствор сравнения А. 2.5 мг гиперозида и 3.5 мг рутина растворяют в 10 мл метанола.

Раствор сравнения В. 2.5 мл стандартного раствора А разводят метанолом до получения 10 мл раствора.

Маркер интенсивности: гиперозид (для желтых или оранжевых флуоресцирующих зон), рутин (для желтых или оранжевых флуоресцирующих зон).

Неподвижная фаза: ВЭТСХ Si 60 F₂₅₄.

Подвижная фаза: кислота муравьиная безводная, вода, метилэтилкетон, этилацетат (10:10:30:50).

Нанесение: по 4 мкл для растворов сравнения А, В и СПС, по 6 мкл для испытуемого раствора.

Элюирование: 62 мм от линии старта.

Высушивание: 5 мин в потоке холодного воздуха.

Визуализация: нагревают пластинку в течение 5 мин при 100-105°C; нагретую пластинку обрызгивают раствором 10 г/л аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты Р в метаноле Р (или 5 г/л аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты Р в этилацетате Р); потом раствором 50 г/л макрогола 400 Р в метаноле Р (или 50 г/л макрогола 400 Р в дихлорметане Р), высушивают на воздухе в течение 30 мин и оценивают в УФ свете при 366 нм.

Специфическая пригодность системы: в средней части хроматограммы присутствуют две близкие, но отдельные зоны. Нижняя зона (кислота хлорогеновая) имеет голубую флуоресценцию, верхняя зона (гиперозид) имеет желтую или оранжевую флуоресценцию.

Ниже приведен ВЭТСХ-снимок идентификации флавоноидных соединений настойки боярышника (Рис. 1).

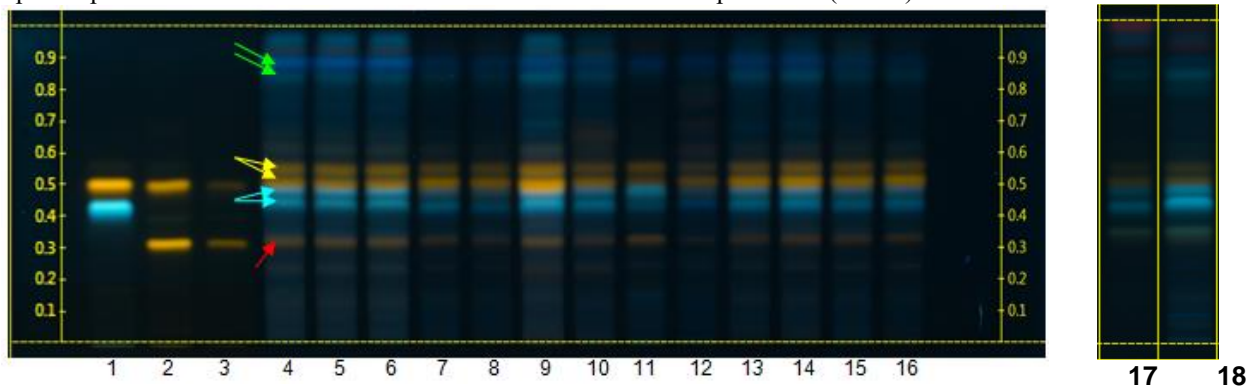


Рис. 1. Идентификация настойки боярышника. Флавоноиды

Подвижная фаза: кислота муравьиная безводная, вода, метилэтилкетон, этилацетат (10:10:30:50); проявитель: реагент – аминоэтиловый эфир дифенилборной кислоты/макрогол; оценивание: УФ 366 нм, 30 мин после проявления. 1 – раствор на специфическую пригодность системы: кислота хлорогеновая, гиперозид; 2 – R: рутин, гиперозид; 3 – R_{1/4}: рутин, гиперозид; 4-16 – образцы настойки боярышника от разных производителей; 17 – плоды *Crataegi laevigata*, растворитель – метанол; 18 – настойка боярышника, лабораторный образец.

На хроматограмме (рис. 1) стрелками выделены маркерные зоны, специфичные для настойки боярышника. Как мы видим хроматографические отпечатки 13 образцов настойки боярышника довольно однородны по расположению, цвету и интенсивности маркерных зон. Допускаются небольшие изменения в интенсивности хроматографических отпечатков (Рис. 1: 12) и наличие дополнительных зон слабой интенсивности (Рис. 1: 10, 12). Все образцы настойки боярышника проходят тест ВЭТСХ в допустимых пределах.

Сравнение хроматографических отпечатков 13 образцов промышленного производства, лабораторного образца настойки приготовленного из аутентичного ЛРС – плодов боярышника и испытуемого раствора плодов боярышника (рис. 1: 17, 18) показало однородность результатов по отношению к размещению и цвету зон, что свидетельствует о специфичности методики. Наличие дополнительной зоны бледно-зеленого цвета с R_f-0.33 на хроматограмме образцов, приготовленных в лабораторных условиях, и ее отсутствие на

хроматограмме образцов настойки промышленного производства объясняется естественной изменчивостью растительного сырья.

Описание результатов разработанной методики. В нижней части хроматограммы присутствует желтая или оранжевая флуоресцирующая зона слабой или очень слабой интенсивности с $R_f \sim 0.32$, что соответствует стандартному образцу рутину (красная стрелка). В средней части хроматограммы присутствует желтая или оранжевая флуоресцирующая зона слабой или одинаковой интенсивности с $R_f \sim 0.52$, что соответствует стандартному образцу гиперозиду, а также желтая или оранжевая флуоресцирующая зона

слабой интенсивности с $R_f \sim 0.56$, расположенная над зоной соответствующей гиперозиду (желтые стрелки); две голубые флуоресцирующие зоны слабой интенсивности: с $R_f \sim 0.43$ (кислота хлорогеновая) и с $R_f \sim 0.47$, расположенная ниже зоны соответствующей стандартному образцу гиперозиду (голубые стрелки). Возле фронта растворителя присутствуют одна или две голубые флуоресцирующие зоны (зеленые стрелки). Для маркерных зон $\Delta R_f \leq 0.01$.

Внизу, для облегчения описания результатов, приведена таблица хроматограммы настойки боярышника (*Crataegi tincture*) (Табл. 1).

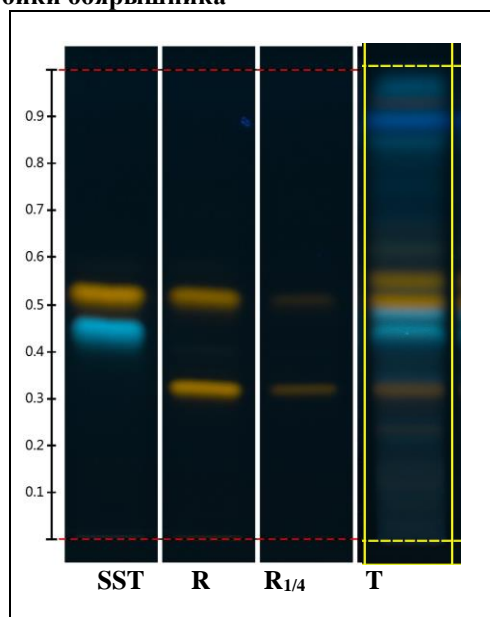
Таблица 1. Таблица и пример типовой хроматограммы настойки боярышника

Верхний край пластинки	
	Одна или две голубые фл зоны

гиперозид: желтая или оранжевая фл. зона	Желтая или оранжевая фл. зона слабой интенсивности Желтая или оранжевая фл. зона слабой или одинаковой интенсивности (гиперозид) Одна или две голубые фл зоны

рутин: желтая или	Желтая или оранжевая фл. зона
Раствор сравнения	Испытуемый раствор

_____ : Отметка между верхней, средней и нижней частями хроматограмм



Пример хроматограммы:
SST: System suitability solution
R: Раствор сравнения (A)
R_{1/4}: Раствор сравнения (B). R разведенная в 4 раза
T: Испытуемый раствор (T1)

Несмотря на то, что срок годности настойки боярышника 3 года, хроматограммы всех исследуемых образцов, включая те, которые были изготовлены в 2010 году (Рис. 1: 9, 13, 14), довольно однородны, на них присутствуют все маркерные зоны, все образцы проходят ВЭТСХ-тест. Данные результаты свидетельствуют о химической стабильности маркерных веществ настойки в течение установленного срока годности (3 года) и дольше (5 лет), и обуславливают актуальность изучения стабильности других спецификаций настойки боярышника во времени.

Выводы:

1. Разработана специфичная и воспроизводимая методика идентификации настойки боярышника методом ВЭТСХ, которая может быть использована в дополнение или как альтернатива методике ТСХ.
2. Снимок ВЭТСХ хроматограммы может быть использован как снимок-сравнения при контроле

качества настойки боярышника методом ВЭТСХ и быть включен в ГФУ или другой ВЭТСХ атлас/компендиум.

3. Разработанная ВЭТСХ методика идентификации настойки боярышника показала, что маркерная группа БАВ (флавоноиды) стабильна в течение установленного срока годности. Данная методика может быть использована для изучения химической стабильности при установлении сроков годности препарата.

References:

1. The State register of medicinal products of Ukraine (01.01.2015) [Electronic source]. – K., 2015. : <http://www.drlz.kiev.ua> (in Ukr.).
2. Medicinal plants: encyclopaedic reference book [Text] / edited by A. M. Grodzinskij. – K., 1990. – 544 p. (in Ukr.).

3. Identification guide of higher plants of Ukraine [Text] / edited by Yu. N. Prokudin, D. N. Dobrochaev, B. V. Zaverha. – K., 1987. – 546 p. (in Russ.).
4. The State Pharmacopoeia of Ukraine [Text]. – 1st ed., Issue 2. – Kharkiv: RIREG, 2008. – 620 p. (in Ukr.).
5. European Pharmacopoeia [Text]. – 6th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – 3261 p.
6. USP Dietary Supplements Compendium [Text]. – Rockville, 2012. – Vol. 1. – 1935 p.
7. State Pharmacopoeia of the USSR [Text] / Ministry of Public Health. – 11th ed. – M.: Medicine, 1989. – Vol. 2. General methods of analysis. Herbal drugs. – 400 p. (in Russ.).
8. Flora of Ukrainian Soviet Socialist Republic [Text]. – Vol. VI / edited by Zerov D. K. – Kiev, 1954. – 608 p. (in Russ.).
9. Tzerepanov S. K. Vascular plants of USSR [Text] / edited by An. A. Fedorova. – L., 1981. – 509 p. (in Russ.).
10. Development and validation of thin layer chromatography method of identification of isoflavonoids and triterpenoids in the tincture «Atherophyt-norma» [Text] / Khokhlova K. O. [et al.] // Farmacom. – 2013. – № 1. – P. 38–51. (in Ukr.).
11. USP Herbal Medicines Compendium [Electronic source] : <http://hmc.usp.org/>.

UDC: 615.07: 615.32:615.451.1

QUALITY CONTROL OF HAWTHORN TINCTURE BY HPTLC METHOD

Khokhlova K.O.

Introduction. Hawthorn tincture is one of the most used herbal drugs at the domestic pharmaceutical market. According to the State register of drugs at the pharmaceutical market of Ukraine, there are 13 commercial offers of Hawthorn tincture from home-produced manufactures. The initial herbal raw materials for Hawthorn tincture are Hawthorn fruits, which are widespread at the territory of Ukraine. These are pharmacopoeial herbal raw material. Thus, 12 different species of Hawthorn fruits are included into monograph <Hawthorn fruits> of Ukrainian State Pharmacopoeia (SPhU) and State Pharmacopoeia of USSR XI ed. On the territory of Ukraine there are near 30 different species of Hawthorn, and the quantity of species is much arises due to its forms and hybrids. The ‘natural variability’ of bioactive substances of Hawthorn fruits of the same species and possibility of usage of many different species during manufacturing process of herbal drugs lead to the pitfalls in standardization of herbal drugs in general, and Hawthorn tincture particularly, and should be taken in mind while development of its quality control methods. For development of specific and reproducible identification method, it is necessary to ensure the number of parameters: usage of method and equipment that give reproducible results; big selections of different samples; rigorously observation of method’s procedure of implementation. The modern, automated HPTLC method of analysis was chosen for identification purpose. If standardize procedure and suitable equipment are used, the reproducible results of the method have to be obtained. The **aim** of this paper was development of

HPTLC method for identification of Hawthorn tincture, which could be appropriated for stability study and establishment of its expire date. **Materials and Methods.** In research 13 samples of Hawthorn tinctures from 8 manufactures from Ukraine and Russia were analyzed. These samples were manufactured in 2010, 2014, 2015 years. The research was conducted on the base of CAMAG laboratory, Muttentz, Switzerland. *Plates used:* HPTLC glass 20x10 cm, Si 60 F₂₅₄, Merck, Lot: 1.05642.0001. *Material used:* Automatic TLC Sampler 4, CAMAG; Twin Trough Chamber 20x10 cm, CAMAG; Chromatogram Immersion Device III, CAMAG; TLC Plate Heater III, CAMAG; Automatic Development Chamber ADC 2, CAMAG; Visualizer, CAMAG; TLC Scanner, CAMAG; Filter paper for chamber saturation, CAMAG; Centrifuge EBA21, Hettich; Ultrasonic Bath SW 3H, Sono Swiss; Analytical Balance MS 205 DU, Mettler-Toledo. *Chemicals used* were pharmacopoeial quality. *Reference substances used:* hyperoside, USP, batch: 33520F; rutin, EDQM, batch: A0299493; chlorogenic acid, EDQM, batch: A0290470. For identification of Hawthorn tincture by HPTLC the flavonoids were chosen as a group of bioactive substances. The method was developed using format and style of description, which are used for TLC Identification method for Crataegi fructus in European Pharmacopoeia and SPhU. For new identification method of Hawthorn tincture preparation of *test solution*, *reference solutions*, *system suitability solution (SST)*, *intensity marker*, its *application*, *development* and *results* were proposed. For *specificity* study HPTLC-fingerprints of 13 samples of Hawthorn tinctures, which were produced by manufactures, were compared with HPTLC-fingerprints of laboratory sample of Hawthorn tincture, prepared from properly authenticated herbal raw material of *C. laevigata (C. oxyacantha) fructus* (solvent – 70% ethanol, ratio – 1:10) and HPTLC-fingerprints of *C. laevigata (C. oxyacantha) fructus* (solvent – methanol, ratio – 1:10). For *reproducible* results the research was conducted according to standardized procedure USP <203> High-performance thin-layer chromatography procedure for identification of articles of botanical origin. Visual evaluation of chromatogram of test solutions was conducted with respect to zone position and colour of reference solutions, intensity was evaluated respect to intensity marker of reference solution. **Results and Discussion.** According to the proposed identification method by HPTLC, the fingerprints of 13 different samples of Hawthorn tincture are quite consistent respect to zone position, color and intensity. All analyzed samples of tinctures are met the requirements of proposed HPTLC-test. Comparison of HPTLC-fingerprints of 13 samples of Hawthorn tincture with the test solutions of laboratory samples of Hawthorn tincture and Crataegi fructus has shown quite similar fingerprints respect to zones position and color. This, prove the specificity of the method. Description of results for developed HPTLC method was given. The tolerance range in fingerprints was specified. Despite of the storage period of Hawthorn tincture is 3 years, the old samples of tincture, which were manufactured in 2010 year are quite similar to new one and would passed proposed HPTLC test. This shows the chemical stability of marker substances of tincture during

its storage period. Other investigation in this area is necessary. **Conclusion.** The specific and reproducible HPTLC identification method of Hawthorn tincture was developed. This could be used as optional/alternative method for conventional TLC. Image on chromatogram of Hawthorn tinctures could be used as a reference image of HPTLC method for Hawthorn tincture and to be included in Pharmacopoeia of Ukraine or any other HPTLC Atlas/Reference book. Developed HPTLC identification method of Hawthorn tincture shown the stability of marker group of bioactive substances (flavonoids) during the expiration period of tincture.

Key words: Hawthorn tincture, identification, HPTLC