

УДК: 615.322:615.07:543.544

РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ИДЕНТИФИКАЦИИ ФЛАВОНОИДОВ В НАСТОЙКЕ КАЛЕНДУЛЫ. СООБЩЕНИЕ 1

© Е.А. Хохлова*, А.А. Здорик, В.А. Георгиянц

Национальный фармацевтический университет, Пушкинская, 53, Харьков,
61002 (Украина), e-mail: katelyna_khokhlova@ukr.net

Разработана методика идентификации флавоноидов настойки календулы методом тонкослойной хроматографии. Изучены ее валидационные характеристики – специфичность, робастность, прецизионность. При изучении робастности исследовано влияние типа камеры, стационарной фазы, расстояния для хроматографирования, условий высушивания и проявления, стабильность испытуемого раствора во время анализа, определены оптимальные условия хроматографирования. Доказана специфичность определения флавоноидов настойки календулы в сравнении с рутинном, настойкой календулы, приготовленной из аутентичного сырья, примесью. Изучены прецизионность методики на одной и разных пластинах, внутрिलाбораторная прецизионность. Доказана возможность использования методики для стандартизации настойки календулы в условиях лабораторий по контролю качества. Для обеспечения специфичности идентификации настойки календулы также целесообразным является определение характерных для цветков календулы веществ – календулозидов.

Ключевые слова: *Calendula officinalis* L., настойка календулы, флавоноиды, тонкослойная хроматография, валидация.

Введение

Настойка календулы широко используется в фармацевтической практике. Так, на фармацевтическом рынке Украины зарегистрировано 11 препаратов календулы в форме настойки [1]. Также настойка календулы может использоваться как активная субстанция в составе мазей заводского и экстемпорального производства [2, 3].

В том случае, когда фармацевтическое предприятие или аптека с правом экстемпорального изготовления для контроля качества препаратов использует нефармакопейные методики, необходимым условием их применения является проведение валидации [4]. Согласно Государственной фармакопее Украины (ГФУ) [5], идентификация настойки календулы проводится по флавоноидам и календулозидам методом тонкослойной хроматографии (ТСХ), что обеспечивает специфичность ее идентификации.

Цель настоящей работы – разработка альтернативной ГФУ методики идентификации флавоноидов настойки календулы методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) и изучение ее валидационных характеристик – робастности, специфичности, прецизионности [4, 6–9].

Экспериментальная часть

Объект исследования – настойка календулы, производитель Агрофирма Ян, Украина, сер. №20412, 60911, 71211. Исходное сырье – цветки ноготков лекарственных (*Calendula officinalis* L.).

Хохлова Екатерина Александровна – ассистент кафедры аптечной технологии лекарств им. Д.П. Сала, кандидат фармацевтических наук, e-mail: katelyna_khokhlova@ukr.net
Здорик Александр Анатольевич – доцент кафедры фармацевтической химии, кандидат фармацевтических наук, e-mail: oleksandr_zdoryk@ukr.net
Георгиянц Виктория Акоповна – заведующая кафедрой фармацевтической химии, доктор фармацевтических наук, профессор, e-mail: vgeor@ukr.net

Для идентификации был использован метод ТСХ. Хроматографирование осуществляли в соответствии с требованиями ГФУ [4]. Для подтверждения пригодности системы для достижения поставленной цели проводили тест «Проверка пригодности хроматографической системы» [4].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Стационарная фаза: ТСХ-пластинки на силикагеле: Macherey-Nagel (DC-Fertigfolien ALUGRAM Sil G/UV₂₅₄, Германия, сер. 006161, подложка – алюминий), Merck (Silica gel 60 F₂₅₄, Германия, сер. 1.05729, подложка – стекло).

Подвижная фаза: бутанол Р – уксусная кислота ледяная Р – вода очищенная Р (4 : 1 : 2).

Испытуемый раствор: аликвота настойки календулы, профильтрованная через беззольный бумажный фильтр.

Раствор сравнения: раствор стандартного образца рутина (Sigma Aldrich, сер. 17208 ТВ).

Приготовление раствора сравнения: 0,050 г рутина помещали в мерную колбу на 100 мл, растворяли в 80 мл 96% этанола Р при нагревании на водяной бане, охлаждали до комнатной температуры, доводили объем раствора 96% этанолом Р до метки и перемешивали. Срок годности раствора – 1 месяц при хранении в хорошо укупленной таре.

Нанесение образцов. Наносили испытуемый раствор полосами, используя микрошприц (Hamilton Bonaduz AG, Switzerland, MB-29-11-1), в объеме 20–25 мкл; раствор сравнения рутина в объеме 10–15 мкл. Установили, что оптимальный объем нанесения испытуемого раствора составляет 20 мкл, раствора сравнения – 10 мкл.

Тип и конфигурация хроматографической камеры. Использовали камеру с разделительным выступом на дне (Сорбфил, Россия (19×19,5×6,5)) и камеру с плоским дном (Latch-LID Chromatotanks, США (27×7×26)). Насыщение хроматографической камеры проводили согласно требованиям ГФУ [4].

Расстояния для хроматографирования: 8, 10 и 12 см.

Высушивание и дериватизация. После элюирования и высушивания пластинки в течение 15 мин в вытяжном шкафу просматривали пластинку в УФ-свете при длине волны 254 нм.

Опрыскивали пластинку с помощью химического проявителя. Как проявитель использовали 5 % раствор алюминия хлорида. Приготовление 5% раствора алюминия хлорида: 5,0 г алюминия хлорида Р помещали в мерную колбу на 100 мл, растворяли в 70 мл 70% этанола, доводили объем раствора 70% этанолом до метки и перемешивали.

Высушивание пластинки после дериватизации проводили в сушильном шкафу при температуре 100–105±10°С в течение 5–10 мин. Изучали стабильность результата хроматографирования в течение 1 ч. Оценивали результат хроматографирования, просматривая пластинку в УФ-свете при длине волны 365 нм и при дневном свете, сравнивая коэффициент удерживания (R_f), цвет и форму флуоресцирующих зон на хроматограмме испытуемого раствора и хроматограмме раствора сравнения.

Документирование. Для документирования хроматограмм после их проявления были использованы фотографические снимки.

Температура и влажность. Для получения воспроизводимых результатов проводили эксперимент при температуре воздуха не более 25 °С, относительной влажности воздуха – не более 75% [7–9].

Результаты. На хроматограмме испытуемого раствора должна выявиться зона желто-зеленого цвета (нарциссин) [10–12], чуть выше уровня зоны, что соответствует рутину на хроматограмме раствора сравнения. На хроматограмме испытуемого раствора должны выявляться не менее двух дополнительных зон желто-зеленого цвета в средней части пластинки и двух зон голубого цвета в верхней части пластинки. На хроматограмме допускается наличие других зон.

Изучали валидационные характеристики методики идентификации флавоноидов настойки календулы – робастность, специфичность, прецизионность.

При изучении робастности методики, кроме влияния типа камеры, типа стационарной фазы, расстояния для хроматографирования, условий высушивания и проявления, также была исследована стабильность испытуемого раствора во время анализа.

Специфичность. Изучали специфичность определения флавоноидов сравнением испытуемого образца настойки календулы с растворами сравнения рутина и гиперозида, настойкой календулы, приготовленной из аутентичного ЛРС, и примесью. Как возможную недопустимую примесь использовали настойку, приготовленную из цветков арники (цветки арники схожи по макроскопическим признакам с цветками календулы). Следует отметить, что по данным [10–12] в цветках календулы лекарственной доминирующим флавоноидом является нарциссин (3-О-рутинозид изорамнетина), который по своим физико-химическим свойствам, в том числе хроматографической подвижности, очень близок к рутину. Поскольку в ГФУ для

рутина имеется стандартный образец, а данный флавоноид широко применяется в фитохимическом анализе как внешний стандарт, то он был использован для раствора сравнения.

Прецизионность. Изучали прецизионность на 3-х уровнях: на одной пластинке (изучение однородности хроматографических пластинок, включая нанесение, прохождение подвижной фазой расстояния для хроматографирования, проявления) и разных пластинках (сравнивали влияние различных пластинок), внутрилабораторную прецизионность (изучение влияния внешней среды, человеческого фактора, оборудования) [6–8].

Обсуждение результатов

В ходе изучения пригодности хроматографической системы проведенная проверка разделительной способности стационарной фазы для идентификации показала, что компоненты стандартного раствора четко разделяются на всех используемых хроматографических пластинках. Полученные результаты эксперимента на гашение флуоресценции гарантируют пригодность системы для поставленной цели.

На рисунке 1 приведены результаты изучения *стабильности испытуемого раствора* на пластинке до хроматографирования.

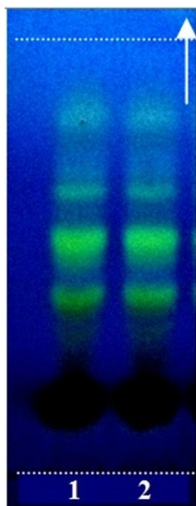


Рис. 1. Стабильность испытуемого образца на пластинке, УФ-365 нм: 1 – образец настойки календулы, нанесенный на пластинку за 3 ч до хроматографирования; 2 – образец настойки календулы, нанесенный на пластинку за 10 мин до хроматографирования

течение часа – сразу после проявления и через 5, 10, 30 и 60 мин, приведены на рисунке 3.

Как видно из результатов, приведенных на рисунке 3, зоны на хроматограммах, задокументированных через 30–60 мин, были меньшей интенсивности и менее четкие, чем результаты, полученные в первые 10 мин после дериватизации. Таким образом, оценивать результат хроматографирования целесообразно в течение первых 10 мин после дериватизации, когда интенсивность и цвет зон, а также четкость их выявления является максимальной.

Влияние стационарной фазы. Результаты хроматографирования флавоноидов настойки календулы на различных типах и марках стационарной фазы «Macherey-Nagel» (алюминиевая подложка), «Merck» (стеклянная подложка) и изменение значений R_f для зоны нарцисина, что выявляется чуть выше уровня зоны, соответствующей раствору сравнения рутина, приведены на рисунке 4.

Как видно из результатов, приведенных на рисунке 1, между индивидуальными зонами образцов не наблюдается различий по цвету, интенсивности, форме, выявленные зоны размещены параллельно, что свидетельствует о стабильности испытуемого образца настойки календулы на пластинке в течение 3 ч.

Стабильность результатов дериватизации. Результаты изучения влияния условий нагревания, полученные после дериватизации пластинки 5 % раствором алюминия хлорида при высушивании пластинки при температуре 100–105±10 °С в течение 5 мин в УФ-свете при длине волны 365 нм, приведены на рисунке 2.

Как видно из результатов, приведенных на рисунке 2, при уменьшении температуры до 90 °С интенсивность флуоресценции выявленной зоны является меньшей, чем при температуре 100–105 °С. При увеличении температуры до 110–120 °С и длительности нагревания 10 мин фон пластинки обесцвечивается, а зоны бледнеют. Таким образом, оптимальным условием высушивания пластинки является ее нагревание при температуре 100–105 °С в течение 5 мин.

Стабильность результата хроматографирования. Хроматограммы, полученные при изучении стабильности хроматографического результата после дериватизации в течение часа – сразу после проявления и через 5, 10, 30 и 60 мин, приведены на рисунке 3.

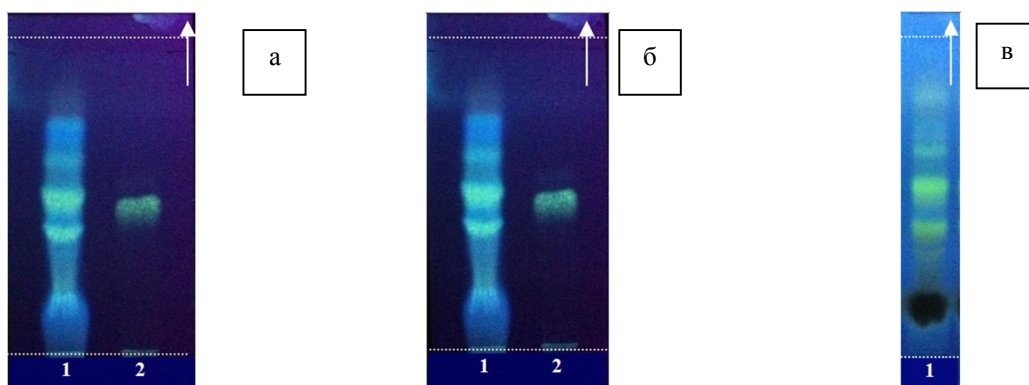


Рис. 2. Влияние условий высушивания, УФ-365 нм; а – 90 °С, 5 мин; б – 100–105 °С, 5 мин; в – 110–120 °С, 10 мин: 1 – настойка календулы; 2 – раствор сравнения рутина

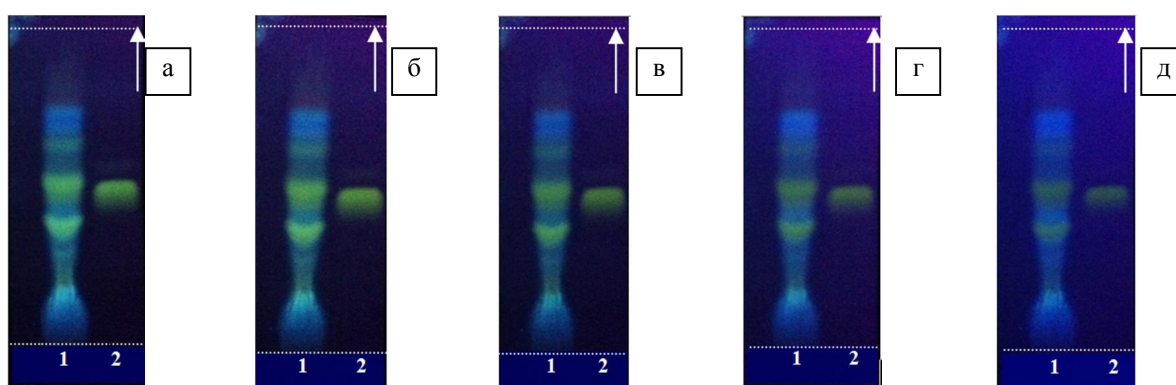


Рис. 3. Стабильность хроматографического результата во времени, УФ-365 нм; а – сразу, горячая пластинка; б – 5 мин; в – 10 мин; г – 30 мин; д – 60 мин: 1 – настойка календулы; 2 – раствор сравнения рутина

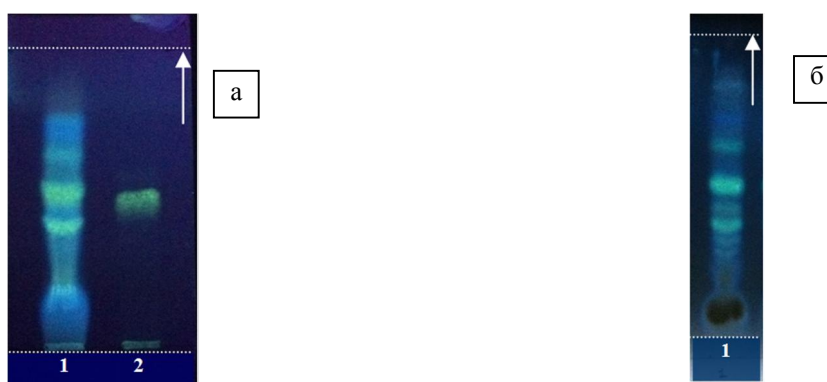


Рис. 4. Влияние стационарной фазы на хроматографический результат, УФ-365 нм; а – Alugram Sil G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel); б – Silica Gel 60F 254 (Merck): 1 – настойка календулы; 2 – раствор сравнения рутина

Полученные результаты свидетельствуют, что использованные марки пластин дают сходные результаты относительно значений R_f для маркерной зоны, ее размера, цвета и интенсивности флуоресценции. Таким образом, ТСХ-пластинки «Macherey-Nagel» и «Merck» могут быть использованы при проведении идентификации флавоноидов настойки календулы по вышеописанной методике.

Влияние расстояния для хроматографирования. Результаты хроматографирования, полученные при прохождении подвижной фазы по слою сорбента 8, 10 и 12 см, приведены на рисунке 5.

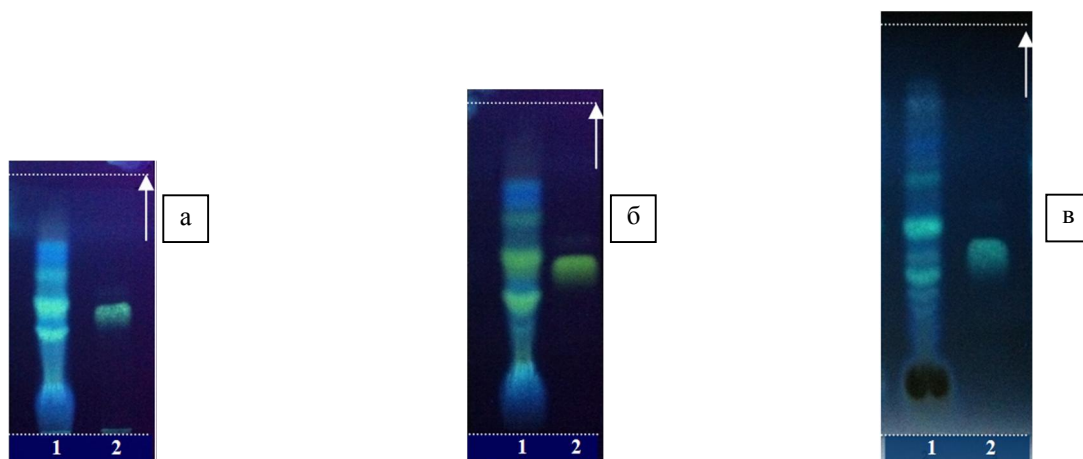


Рис. 5. Влияние длины пробега подвижной фазы, УФ-365 нм; а – 8 см; б – 10 см; в – 12 см: 1 – настойка календулы; 2 – раствор сравнения рутина

Установлено, что при увеличении длины пробега подвижной фазы разделительная способность компонентов настойки не повышается, а время хроматографирования увеличивается и составляет для 8 см – 1 ч 20 мин, для 10 см – 1 ч 40 мин, для 12 см – 2 ч 40 мин. Таким образом, пробег подвижной фазы по слою сорбента 8–10 см для проведения данной методики позволяет рационально использовать расходные материалы (ТСХ-пластинки, меньшее количество растворителей для подвижной фазы, меньший объем растворов для детектирования), дает возможность использовать хроматографические камеры меньшего размера, сокращает время проведения анализа и является оптимальным.

Влияние типа камеры. Результаты изучения влияния камеры с разделительным выступом на дне и с плоским дном на хроматографирование приведены на рисунке 6.

Как видно из рисунка 6, конфигурация хроматографической камеры не влияет на хроматографический результат. При проведении эксперимента могут быть использованы обе камеры.

Специфичность. Результаты изучения специфичности определения флавоноидов настойки календулы параллельно на одной пластинке с растворами сравнения рутина и гиперозида, настойкой календулы, приготовленной в лабораторных условиях из аутентичного сырья, и настойкой арники приведены на рисунке 7.

Полученные результаты свидетельствуют, что на хроматограмме испытуемого образца настойки календулы выявляется зона желто-зеленой флуоресценции (нарциссин) [10–12] чуть выше зоны рутина на хроматограмме раствора сравнения (величиной R_s около 1,05–1,10).

Хроматограммы настойки календулы заводского приготовления и настойки календулы, приготовленной в лабораторных условиях из точно идентифицированного сырья, характеризуются сходным хроматографическим профилем. Так, на хроматограммах выявлены зоны желто-зеленого цвета (нарциссин) чуть выше зоны, что соответствует рутину на хроматограмме раствора сравнения, дополнительные зоны желто-зеленого цвета в средней части пластинки и зоны голубого цвета в верхней части пластинки. Зоны идентичны по цвету, размеру и форме.



Рис. 6. Влияние типа камеры, УФ-365 нм; а – с разделительным выступом на дне; б – камера с плоским дном: 1 – настойка календулы; 2 – раствор сравнения рутина

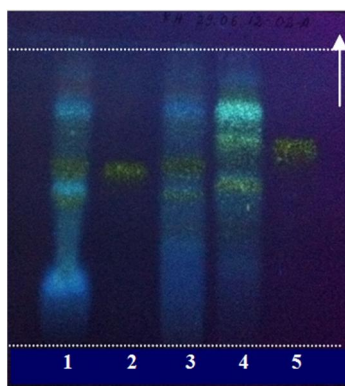


Рис. 7. Специфичность определения флавоноидов настойки календулы, УФ-365 нм: 1 – настойка календулы (сер. 20412); 2 – раствор сравнения рутина; 3 – настойка календулы (приготовленная в лабораторных условиях); 4 – настойка арники; 5 – раствор сравнения гиперозида

$R_{f\max}-R_{f\min} = 0,01$; для прецизионности на разных пластинках: $R_{f\text{ ср.}} = 0,54$, RSD, % = 1,49, $R_{f\max}-R_{f\min} = 0,03$; для внутрилабораторной прецизионности: $R_{f\text{ ср.}} = 0,4$, RSD, % = 3,54, $R_{f\max}-R_{f\min} = 0,05$.

Выводы

Разработана методика идентификации флавоноидов настойки календулы методом ТСХ, определены валидационные характеристики методики – специфичность, робастность, прецизионность. Доказана возможность использования методики для контроля качества настойки календулы в условиях лабораторий по контролю качества.

Список литературы

1. Государственный реестр лекарственных средств Украины по состоянию на 08.04.2014 г. Киев, 2014. URL: <http://www.drlz.kiev.ua>.
2. Zdoryk O.A., Khokhlova K.O., Savchenko L.P., Georgiyants V.A. Method for TLC-identification test for ointment with herbal tinctures // The 17-th International Congress Phytopharm 2013. Vienna, Austria, 8–10 July 2013. P. 51.
3. Zdoryk O.A., Khokhlova K.O., Georgiyants V.A., Vyshnevskya L.I. Investigation of Physical and Chemical Stability of Ointment with Herbs // International Journal of Pharmaceutical Compounding. 2014. N3. Pp. 248–252.
4. Государственная фармакопея Украины. Харьков, 2008. 1-е изд. Доп. 2. 620 с.
5. Государственная фармакопея Украины. Харьков, 2011. 1-е вид. Доп. 4. 540 с.
6. Хохлова Е.А., Вишневська Л.И., Гарна С.В., Котов А.Г. Разработка и валидация методики идентификации изофлавоноидов и тритерпеновых сапонинов в настойке «Атерофит-норма» методом тонкослойной хроматографии // Фармаком. 2013. №1. С. 38–51.
7. Хохлова Е.А. Разработка и стандартизация настойки «Атерофит-норма» для терапии ишемической болезни сердца : дис. ... канд. фармац. наук. Харьков, 2013. 216 с.
8. Reich E., Schibli A. High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants. New York, 2006. 264 p.
9. Koll K., Reich E., Blatter A., Veit M. Validation of Standardized High-Performance Thin-Layer Chromatographic Methods for Quality Control and Stability Testing of Herbs // Journal of AOAC International. 2003. Vol. 86, № 5. Pp. 909–915.
10. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков *Calendula officinalis* // Химия природных соединений. 2007. №2. С. 179–180.
11. Куркин В.А., Шарова О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной // Химия растительного сырья. 2007. №1. С. 65–68.
12. Куркин В.А., Шарова О.В. Разработка методик стандартизации цветков ноготков // Фармация. 2007. Т. 55, №8. С. 11–13.

Поступило в редакцию 16 июня 2014 г.

После переработки 1 декабря 2014 г.

Khokhlova K.O.*, Zdoryk O.A., Georgiyants V.A. DEVELOPMENT AND VALIDATION OF IDENTIFICATION METHOD OF FLAVONOIDS IN THE MARIGOLD TINCTURE. MESSAGE 1.

National University of Pharmacy, Pushkinskaya str., 53, Kharkov, 61002 (Ukraine), e-mail: kateryna_khokhlova@ukr.net

The thin-layer chromatography method of flavonoids' identification in the Marigold tincture was developed. The validation characteristics such as specificity, robustness, precision were studied. During robustness study the influences of chamber's type, stationary phase, development distance, conditions of dryness and derivatization, stability of the test solution during analysis were investigated. The optimal conditions of chromatography analysis were investigated. The specificity of method of flavonoids' determination was proved with the reference standard rutin, Marigold tincture, prepared from authentic herbal raw material, and the adulteration. The precision of the method on the same and on the different plates, the interlaboratory precision were studied. The possibility of usage developed method for standardization of Marigold tincture in the condition of the quality control lab was proved. For assuring specificity of identification of Marigold tincture, the determination of characteristic substances for Marigold flower – calendulosides, is reasonable.

Keywords: Marigold tincture, flavonoids, thin-layer chromatography, validation

References

1. Gosudarstvennyi reestr lekarstvennykh sredstv Ukrainy po sostoianiiu na 08.04.2014 g. [State Register of Medicinal Products of Ukraine (04.08.2014)]. Kiev, 2014. URL: <http://www.drlz.kiev.ua>. (in Russ.).
2. Zdoryk O.A., Khokhlova K.O., Savchenko L.P., Georgiyants V.A. *The 17-th International Congress Phytopharm 2013*. Vienna, Austria, 8–10 July 2013, pp. 51.
3. Zdoryk O.A., Khokhlova K.O., Georgiyants V.A., Vyshnevskaya L.I. *International Journal of Pharmaceutical Compounding*, 2014, no. 3, pp. 248–252.
4. Gosudarstvennaia farmakopeia Ukrainy. [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Kharkiv, 2008, 1 edition, addition 2. 620 p. (in Russ.).
5. Gosudarstvennaia farmakopeia Ukrainy. [State Pharmacopoeia of Ukraine]. Kharkiv, 2011. 1 edition, addition 4. 540 p. (in Russ.).
6. Khokhlova E.A., Vishnevskaya L.I., Gama S.V., Kotov A.G. *Farmakom*, 2013, no. 1, pp. 38–51. (in Russ.).
7. Khokhlova E.A. *Razrabotka i standartizatsiia nastoiki «Aterofit-norma» dlia terapii ishemicheskoi bolezni serdtsa : dis. ... kand. farmats. nauk*. [Development and standardization of infusion "Aterofit norm" for the treatment of coronary heart disease: the dissertation of the candidate of pharmaceutical sciences]. Kharkiv, 2013, 216 p. (in Russ.).
8. Reich E., Schibli A. *High-Performance Thin-Layer Chromatography for the Analysis of Medicinal Plants*. New York, 2006, 264 p.
9. Koll K., Reich E., Blatter A., Veit M. *Journal of AOAC International*, 2003, vol. 86, no. 5, pp. 909–915.
10. Kurkin V.A., Sharova O.V. *Khimiia prirodnykh soedinenii*, 2007, no. 2, pp. 179–180. (in Russ.).
11. Kurkin V.A., Sharova O.V. *Khimiia rastitel'nogo syr'ia*, 2007, no. 1, pp. 65–68. (in Russ.).
12. Kurkin V.A., Sharova O.V. *Farmatsiia*, 2007, vol. 55, no. 8, pp. 11–13. (in Russ.).

Received June 16, 2014

Revised December 1, 2014

* Corresponding author.

