

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2024.80.81.003>

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОДЛИННОСТИ КЛЮКВЫ БОЛОТНОЙ ПОБЕГОВ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

А.А. Шамилов, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, shamilovxii@yandex.ru

В.Н. Бубенчикова, доктор фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармакогнозии и ботаники, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», г. Курск, bubenhikova.ksmu@yandex.ru

Е.Р. Гарсия, канд. фарм. наук, преподаватель кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, x-pharm@mail.ru

В.А. Музыка, студент 5-го курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, vladmyzika927@gmail.ru

М.В. Ларский, канд. фарм. наук, доцент кафедры фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет», г. Пятигорск, m.v.larsky@rmedpharm.ru

Разработка новых и совершенствование существующих методик определения подлинности и оценки качества нового лекарственного растительного сырья (ЛРС), а также известных фармакопейных видов ЛРС подразумевают определение мажорного или маркерного соединения, по которому проводится сквозная стандартизация и ЛРС, и будущих лекарственных средств на его основе. Целью данной работы является разработка методики определения подлинности клюквы болотной побегов методом тонкослойной хроматографии по маркерному соединению – хлорогеновой кислоте. Анализ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили с водно-спиртовым извлечением (экстракт – спирт этиловый 70%), полученным

из воздушно-сухих побегов клюквы болотной. Были подобраны оптимальные условия разделения маркерного компонента – хлорогеновой кислоты и сопутствующих соединений: смесь растворителей, детектирующий реактив, объем наносимой пробы, тип хроматографической пластинки. Определение основной группы биологически активных веществ методом тонкослойной хроматографии в клюкве болотной побегах возможно проводить в следующих условиях: сорбент – силикагель, нанесенный на алюминиевую или полимерную подложку, элюент – безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат (10:10:84), проявители – пары аммиака и алюминия хлорид спиртовой раствор 2%, оптимальный объем пробы – 10 мкл спиртового раствора,

оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты 7,5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 минут, время элюирования – 55–60 минут, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки алюминия хлоридом спиртовым раствором 2% – 3 минуты. Для определения подлинности лекарственного растительного сырья клюквы болотной побеги разработана методика определения маркерного компонента, хлорогеновой кислоты, методом тонкослойной хроматографии – как экспресс-метод, используемый в Государственной фармакопее Российской Федерации, а также фармакопеех других стран.

Ключевые слова: клюква болотная, побеги, подлинность, хлорогеновая кислота, тонкослойная хроматография

Контроль качества лекарственного растительного сырья (ЛРС) включает оценку подлинности с использованием простых, быстрых, воспроизводимых и точных методик. В Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) основным методом определения подлинности ЛРС является тонкослойная хроматография (ТСХ). Только для 5 объектов (ФС.2.5.0011.15 «Донника трава»; ФС.2.5.0081.18 «Лимонника китайского плоды»; ФС.2.5.0082.18 «Лимонника китайского семена»; ФС.2.5.0091.18 «Рапонтикума сафроловидного корневища с корнями»; ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни») предложены методики на основе высокоэффективной жидкостной хроматографии и для 2 объектов (ФС.2.5.0098.18 «Тмина обыкновенного плоды»; ФС.2.5.0102.18 «Фенхеля обыкновенного плоды») – газожидкостной хроматографии [1]. ТСХ является менее затратным и по временному, и по экономическому ресурсу для определения подлинности сырья. При этом контроль качества необходимо проводить по маркерному

или мажорному компоненту, наличие которого в сырье подтверждает его подлинность [2]. Представитель семейства вересковые – клюква болотная – интересна в качестве источника биологически активных веществ (БАВ) наряду с другими фармакопейными видами вересковых [3]. Ведущей группой БАВ в листьях клюквы болотной являются фенольные соединения: флавоноиды, производные кверцетина, лютеолина; гидроксикоричные кислоты, в том числе коричная, хлорогеновая, кофейная кислоты; кумарины: дигидрокумарин и умбеллиферон [4,5]. Плоды клюквы известны антиоксидантным [6], противомикробным [7], антипролиферативным [8], противовоспалительным [9], антиканцерогенным, кардиопротекторным [10] действием и могут заготавливаться наряду с листьями.

В соответствии с этим цель данной работы – разработка методики оценки подлинности клюквы болотной побегов методом тонкослойной хроматографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования были образцы побегов клюквы болотной *Oxycoccus palustris Pers.*, собранные в нескольких регионах Российской Федерации в фазу плодоношения в местах естественного произрастания. Побеги сушили воздушно-теневым способом.

Пробоподготовку извлечения проводили согласно ранее разработанной методике для голубики болотной листьев [11].

Полученное извлечение в объеме 2,5; 5,0 и 7,5 мкл наносили с помощью микрошприца Hamilton Gastight Syringe объемом 10 мкл (Hamilton, США) на хроматографические пластинки марки Sorbfil ПТСХ-П-В-УФ (Россия) и ПТСХ-АФ-А-УФ размером 100x100 мм (тип сорбента: силикагель СТХ-1ВЭ и силикагель СТХ-1А; зернение: 8–12 и 5–17 мкм; толщина слоя: 100 и 110 мкм, связующее: силиказоль;

тип подложки: ПЭТФ и алюминий). Растворители использовали марки х.ч. (ЗАО «Вектон», Россия). Зоны адсорбции просматривали в видимом и УФ-свете после обработки парами аммиака (как специфичного реактива на фенолокислоты) и алюминия хлорида спиртовым раствором 2% (для визуализации сопутствующих фенольных соединений – флавоноидов) [13,14]. Использовали стандартный образец (СО) хлорогеновой кислоты (Chlorogenic acid CRS, code: Y0000569, 97,1%, Ph.Eur. Reference Standard). Валидационная оценка разработанной методики проводилась

по показателям: специфичность, робастность (устойчивость), воспроизводимость [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе нами подобраны оптимальные условия разделения хлорогеновой кислоты (ХК) как маркерного, хемотаксономического соединения для рода *Vaccinium* L. [11] от сопутствующих соединений при испытании 10 элюирующих систем (табл. 1), выбранных согласно литературным данным [1,12–14].

Таблица 1

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ ХК В РАЗЛИЧНЫХ ЭЛЮИРУЮЩИХ СИСТЕМАХ

№ п/п	Элюент	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец, хлорогеновая кислота	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение
1	Безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат (10:10:84)	0,63	0,62
2	Безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат (8:8:84)	0,84	0,83
3	Безводная муравьиная кислота – ледяная уксусная кислота – вода – этилацетат (11:11:27:100)	0,91	0,92
4	Безводная муравьиная кислота – ледяная уксусная кислота – вода – этилацетат (7,5:7,5:18:67)	0,46	0,47
5	Безводная муравьиная кислота – ледяная уксусная кислота – вода – этилацетат (7:7:14:72)	0,90	0,91
6	Вода – метанол – этилацетат (8:15:77)	0,54	0,54
7	Безводная муравьиная кислота – ледяная уксусная кислота вода – этилацетат (11:11:26:100)	0,85	0,87
8	Безводная муравьиная кислота – метанол – вода – этилацетат (2,5:4:4:50)	0,61	0,63
9	Вода – ацетонитрил – ледяная уксусная кислота (78:19:31)	Нет разделения	Нет разделения

ХАРАКТЕРИСТИКА ДЕТЕКТИРУЮЩИХ РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ХЛОРОГЕНОВОЙ КИСЛОТЫ В КЛЮКВЕ БОЛОТНОЙ ПОБЕГАХ МЕТОДОМ ТСХ

№	Детектирующий реактив	Окрашивание хроматографических зон хлорогеновой кислоты
1	Видимый свет	Серое окрашивание
2	УФ-свет (254 нм)	Светло-зеленое свечение
3	Пары аммиака водного раствора 25%	Серое окрашивание
4	Пары аммиака водного раствора 25% в УФ-свете (254 нм)	Желто-зеленое окрашивание
5	Алюминия хлорид спиртовой раствор 2%	Не проявляется
6	Алюминия хлорида спиртовой раствор 2% и УФ-свет (254 нм)	Голубое свечение

Зоны адсорбции проявляли различными проявителями, оценивая контрастность, специфичность и доступность детектирующего реактива (табл. 2).

По ТСХ-профилю зон адсорбции, полученному на хроматограммах, оптимальное разделение хлорогеновой кислоты в извлечении из клюквы болотной побегов наблюдали в системе «безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат» (10:10:84) и при последовательной обработке пластинки парами аммиака и алюминия хлорида спиртовым раствором 2% (рис. 1).

Кроме того, установлено, что при использовании в качестве сорбента силикагеля, нанесенного как на алюминиевую, так и на полимерную подложку, наблюдается эффективное разделение хлорогеновой кислоты и сопутствующих фенольных соединений с получением сходных ТСХ-профилей и значений фактора удерживания.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ в клюкве болотной побегов: сорбент – силикагелевые пластинки марки Sorbfil размером 100x100 мм с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ

подложками, элюент: безводная муравьиная кислота – вода – этилацетат (10:10:84), проявители – пары аммиака и алюминия хлорида спиртовой раствор 2%, оптимальный объем пробы – 10 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты – 7,5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин., время элюирования – 55–60 мин., время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки алюминия хлорида спиртовым раствором 2% – 3 мин. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в видимом и УФ-свете, далее обрабатывают парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%. После обработки каждым реактивом повторно просматривают в видимом и УФ-свете. Пары аммиака являются специфическим реактивом для детекции фенолокислот, применение алюминия хлорида позволяет визуализировать такие сопутствующие фенольные соединения, как флавоноиды.

После проведения хроматографирования на пластинке должна наблюдаться зона адсорбции с голубой флуоресценцией на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты. Могут наблюдаться зоны адсорбции с желтой

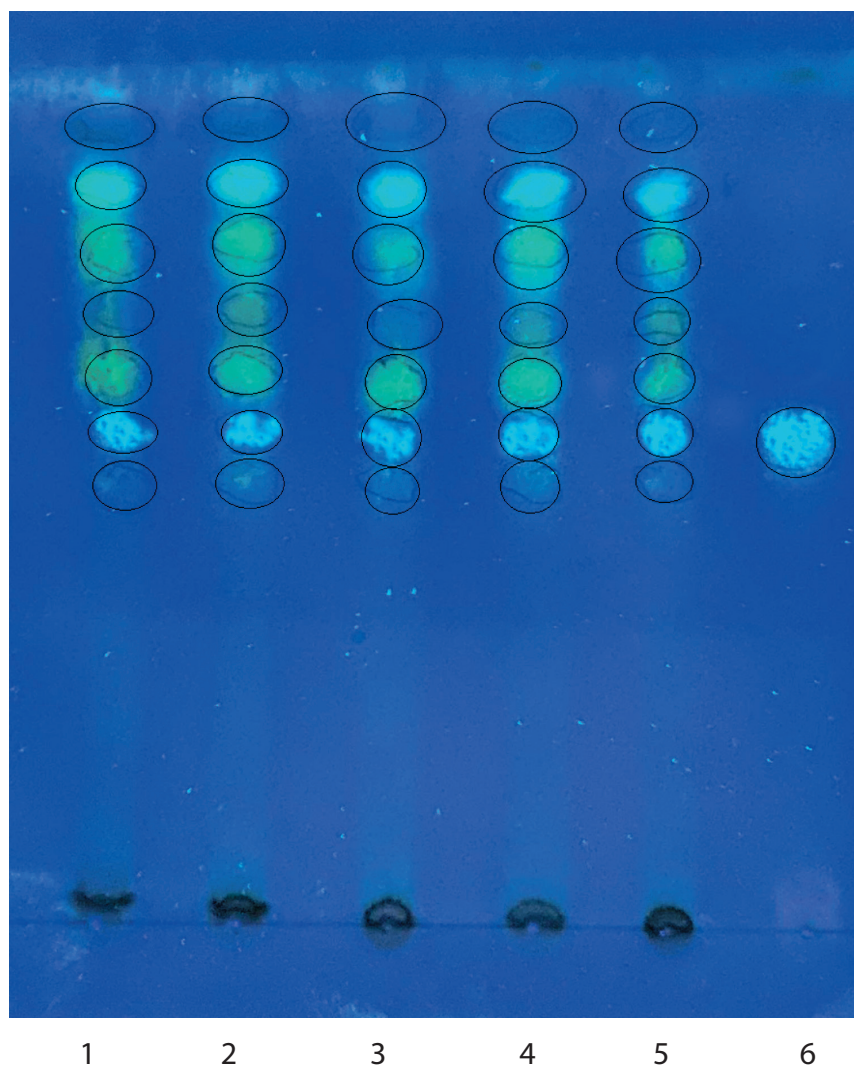


РИС. 1. Хроматограмма с извлечениями из клюквы болотной побегов, собранных в разных местах естественного произрастания: 1 – окрестности деревни Шамокша (Ленинградская область), 2 – Куйвозовское сельское поселение (Ленинградская область), 3 – поселок Визимьяры (Республика Марий Эл), 4 – Кличевский район Могилевской области (Республика Беларусь), 5 – Вилейский район Минской области (Республика Беларусь), 6 – стандартный образец хлорогеновой кислоты (Ph.Eur. Reference Standard)

Таблица 3

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРА «РОБАСТНОСТЬ» МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ БАВ В КЛЮКВЕ БОЛОТНОЙ ПОБЕГАХ

№ п/п	Время насыщения хроматографической камеры (мин.)	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец – хлорогеновая кислота n=3	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение n=3
1	0	нет разделения	нет разделения
2	10	нет разделения	нет разделения
3	20	0,57	0,59
4	30	0,64	0,64
5	40	0,64	0,64
6	50	0,65	0,64
7	60	0,63	0,64

Таблица 4

ОЦЕНКА ВОСПРОИЗВОДИМОСТИ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ОСНОВНОЙ ГРУППЫ БАВ В КЛЮКВЕ БОЛОТНОЙ ПОБЕГАХ

Аналитики	ПТСХ-П-В-УФ		ПТСХ-АФ-А-УФ	
	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец – хлорогеновая кислота n=3	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение n=3	$R_f \pm 0,02$, стандартный образец – хлорогеновая кислота n=3	$R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение n=3
1	0,63	0,57	0,63	0,57
2	0,65	0,59	0,64	0,59
3	0,62	0,57	0,65	0,58

флуоресценцией выше зоны адсорбции хлорогеновой кислоты и светло-голубой флуоресценцией ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты.

Валидационная оценка методик испытаний на подлинность, согласно ГФ РФ XIV, включает доказательство специфичности методики [1]. Предлагаемая методика позволяет обнаружить маркерный компонент, хлорогеновую кислоту, в присутствии комплекса других соединений; при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента.

При оценке устойчивости методики устанавливали влияние времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля разделения хлорогеновой кислоты от сопутствующих соединений.

Установлено, что оптимальное время насыщения хроматографической камеры – не менее 30 мин., в ненасыщенной камере не наблюдается разделение суммы БАВ.

Воспроизводимость методики оценивали по эффективности разделения хлорогеновой кислоты и сопутствующих фенольных соединений на двух типах хроматографических пластин: с полимерной и алюминиевой

подложкой. Анализ выполнялся в разные дни разными аналитиками.

Как следует из полученных результатов, методика отличается достаточной воспроизводимостью и позволяет добиться разделения на силикагелевых пластинах как с алюминиевой, так и полимерной подложкой.

ВЫВОДЫ

Таким образом, разработана методика определения подлинности клюквы болотной побегов с помощью ТСХ по маркерному компоненту – кислоте хлорогеновой. Методика отличается специфичностью, удовлетворительными воспроизводимостью и устойчивостью.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. Том 1, 4. <https://femb.ru/record/pharmacopeia14>, свободный. Дата обращения: 09.04.2022.
2. Куркин В.А., Рязанова Т.К., Серебрякова А.Д. Разработка подходов к стандартизации коры сирени обыкновенной // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2021; 24(7): 37–44.

3. Фурса Н.С., Бузук Г.Н., Таланова А.А., Иванов А.П., Кузьмичева Н.А., Горькова А.С. Неофициальные виды семейства вересковых как перспективные акваретики и уроантисептики // Вестник фармации. 2016; 3: 59–66.
4. Neto C.C. Cranberry and its phytochemicals: A review of in vitro anticancer studies // J. Nutr. 2007; 137: 186–193.
5. Côté J., Caillet S., Doyon G., Sylvain J.-F., Lacroix M. Bioactive Compounds in Cranberries and their Biological Properties // Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2010; 50: 7, 666–679.
6. Xiangjiu H., Rui H.L. Cranberry Phytochemicals: Isolation, Structure Elucidation, and Their Antiproliferative and Antioxidant Activities // J. Agric. Food Chem., 2006; 54: 7069–7074.
7. Puurponen-Pimiä R., Nohynek L., Hartmann-Schmidlin S., Kähkönen M., Heinonen M., Määtä-Riihinen K., Oksman-Caldentey K.-M. Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens // J. Appl. Microbiol., 2005; 98: 991–1000.
8. Metodiewa D., Jaiswal A.K., Cenas N., Dickancité E., Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product // Free Radic. Biol. Med., 1999; 26: 107–16.
9. Zhu Y., Ling W., Guo H., Song F., Ye Q., Zou T., Li D., Zhang Y., Li G., Xiao Y, Liu F., Li Z., Yang Y. Anti-inflammatory effect of purified dietary anthocyanin in adults with hypercholesterolemia: a randomized controlled trial // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis., 2013; 23(9): 843–849.
10. Elberry A.A., Abdel-Naim A.B., Abdel-Sattar E.A., Nagy A.A., Mosli H.A., Mohamadin A.M., Ashour O.M. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats // Food and Chemical Toxicology, 2010; 48(5): 1178–1184.
11. Шамилов А.А., Бубенчикова В.Н., Гарсия Е.Р., Ибаева Х.А., Ларский М.В. Разработка и валидация методики количественного определения фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022; 25(2): 14–23.
12. European Pharmacopoeia. – 8th ed. – Strasburg: Council of Europe, 2013. – Vol. 1–2. – 3655 p.
13. Тринеева О.В. Разработка теоретических подходов к определению основных групп биологически активных веществ лекарственного растительного сырья методом ТСХ // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2021; 10(2): 69–79.
14. Waksmundzka-Hajnos M., Sherma J., Kowalska T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. – London; New York: CRC Press Taylor & Francis Group, 2008; – 874 p.

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR DETERMINING THE AUTHENTICITY OF CRANBERRY SHOOTS BY THIN LAYER CHROMATOGRAPHY METHOD

A.A. Shamilov¹, V.N. Bubenchikova², E.R. Garsiya¹, V.A. Musika¹, M.V. Larsky¹

¹ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia

² Kursk State Medical University, Kursk, Russia

The development of new and improvement of existing methods for determining the authenticity and quality assessment of new and well-known medicinal plant raw materials include determination of

a major or marker compound. According to this compound end-to-end standardization of raw material and medicinal preparations is carried out. The aim of this work was development of the technique for identification of marsh cranberry shoots by thin-layer chromatography (TLC) using a marker compound, chlorogenic acid. The analysis by thin-layer chromatography was carried out with water – alcohol extraction from air-dry shoots of marsh cranberry. Optimal conditions for the separation of the marker component – chlorogenic acid – from related compounds were selected: a mixture of solvents, a detecting reagent, the volume of the sample, the type of chromatographic plate. Determination of the main group of biologically active substances by thin-layer chromatography in cranberries of marsh shoots can be carried out under the following conditions: sorbent – silica gel applied to an aluminum or polymer substrate, eluent – anhydrous formic acid – water – ethyl acetate (10:10:84), developers – ammonia and aluminum chloride alcohol solution 2%, optimal sample volume – 10 µl alcohol solution, optimal volume of a standard sample of chlorogenic acid 7.5 µl, saturation time eluent vapor chambers – 30 minutes, elution time – 55–60 minutes, the holding time of the plate in the drying cabinet after aluminum chloride treatment with an alcohol solution of 2% – 3 minutes. The TLC technique for quantitative determination of medicinal plant raw material, marsh cranberry shoots, has been developed. This method can be used as an express method for identification of chlorogenic acid as a marker component.

Keywords: marsh cranberry, shoots, identification, chlorogenic acid, thin-layer chromatography (TLC)