

Recommended by Doctor of Pharmacy, professor T.G.Yarnykh

UDC 547.596:665.525:665.527.5:615.322:543.51

ELABORATION OF THE METHOD OF THE TERPENOID COMPOSITION DETERMINATION FOR ESSENTIAL OILS OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS OF “APISED” CAPSULES BY GAS CHROMATOGRAPHY

O.S.Shpychak, O.I.Tikhonov, V.A.Khanin

National University of Pharmacy

Key words: terpenoids; essential oils; gas chromatography; “Apised” capsules

The method of determination of the qualitative composition and the quantitative content of the main components of essential oil of the active pharmaceutical ingredients of “Apised” capsules with the sedative action, namely the medicinal plant raw material (the herb of garden balm, the cones of hop, inflorescences of spike lavender) and the standardized substance of natural powdered honey has been developed by gas chromatography. As essential oils are the complex natural matrix, which contains substances with a diverse chemical structure substantially differing by their physical and chemical properties, the method of tandem chromatography-mass spectrometry in the variant of the equilibrium vapour phase analysis has been applied for identification and quantitative determination of terpenoids in the medicinal plant raw material and in the medicine developed; it allows to divide additionally the substances to be analyzed depending on their polarity and lipophilic and hydrophilic properties. The chromatographing was carried out using a Saturn 2000 gas-liquid chromatograph (Varian Corp., USA) equipped with a mass-detector by the type of ion trap. Identification of components was performed by comparing the complete mass-spectra of the samples under research with the appropriate information of the NIST mass-spectrometric data library (150000 mass-spectra), as well as by the linear retention indexes calculated separately for each component using the AMDIS programme. For quantitative determination of the terpenoid composition of essential oils the internal normalization method was applied to the chromatograms obtained and the content for each component was determined in percents. Six main components have been detected in essential oil of the apiphytomedicine developed, among them four compounds identified – myrcene (54.17%), 1,8-cineole (14.94%), linalool (9.16%) and borneol (9.05%) – are prevalent. The percentage of the compounds identified is 87.32%. The percentage of the main terpenoid compounds in the apiphytomedicine “Apised” developed correlates with its composition well. The dominant essential oil component of the apiphytomedicine developed is myrcene, which presence stipulates a high general tonic and sedative action, clarifies consciousness, assists in attention concentration, increases and restores nerves. With using the tandem chromatography-mass spectrometry the method developed gives the possibility to identify the components of essential oil regardless of the way of medicinal plant raw material obtaining and its origin, as well as to determine their quantitative content in percents with the help of the internal normalization method; it allows to carry out standardization of the terpenoid composition of essential oils of the medicine developed – “Apised” capsules by the method suggested.

Currently, medicines of the natural origin, which show the wide range of pharmacological action and are more accessible and safer for public health, become increasingly topical [10, 11, 20, 27]. In recent years scientific investigations related to the study of the chemical composition and pharmacological activity of the medicinal plant raw material (MPRM) have achieved considerable successes, and it, in its turn, made possible to expand the assortment of multicomponent phytomedicines at the pharmaceutical market of Ukraine [6].

When creating the herbal medicines (HM) and medicines developed on the basis of natural compounds with the standard content of active substances and the expected pharmacological action one of the crucial issues is the study of correlation between the chemical composition and the biological activity. One of the groups of biologically active substances (BAS), which positively influence on the mental and emotional state and neutralize nervous hyperalertness of the CNS, is essential oils,

which are in the composition of the essential oil plant raw material and HM and are successfully used in medicine, pharmacy and cosmetology [1, 14, 16, 21, 23].

The essential oils of medicinal plants of families *Lamiaceae* – garden balm (*Melissa officinalis* L.), spike lavender (*Lavandula angustifolia* Mill.) – and *Cannabaceae* – hop (*Humulus lupulus* L.) [1, 7, 8, 15, 16, 18, 19, 23], which are the main active pharmaceutical ingredients (APl) of the complex apiphytomedicine “Apised” in the form of capsules developed by us for treatment of the mental and emotional disorders and depressions states in sports medicine [13], are characterized by the wide range of the pharmacological action, particularly general tonic, sedative, tonic, anxiolytic ones.

When researching the essential oil MPRM the exact identification of the essential oil component composition is important for standardization of both the pharmacopeial raw material and the HM investigated. In addition, it is necessary to take into account that the quali-

tative and quantitative composition of essential oils depends on such factors as differences in chemotypes and conditions of medicinal plants growing, technology of MPRM production, its drying and storage, etc. [24, 25]. Therefore, development of modern and effective express-methods of determination of the qualitative composition and the quantitative content of essential oils both in MPRM and in phytomedicines created on its basis becomes topical.

Under modern conditions the methods of gas chromatography (GC) and high-performance liquid (HPLC) chromatography are used for identification of essential oils – by relative values of individual components retention times or by comparing of chromatographic profiles with the standard chromatogram. It is possible to identify essential oils also by the method of thin layer chromatography (TLC), and, if required, by the combination of GC and mass spectrometry or by other spectroscopic methods (UV-, IR-, NMR-spectroscopy, etc.) [9, 12].

The investigation by the method of gas chromatography, which is considered one of the effective express-methods allowed to obtain characteristic chromatograms with the maximal division of individual compounds, is the generally accepted approach to the quality assessment and quantitative determination of terpenoids, which are mainly volatile compounds and are in the composition of essential oils both of MPRM and herbal medicines [3, 4]. The identity and naturalness of essential oils are also confirmed by this method.

The monographs, in which the procedures of determination of the essential oil composition in MPRM, particularly in the herb of garden balm and in the inflorescences of spike lavender, are included to the European Pharmacopoeia (EPH) 7.0 and to the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPHU) I [4, 17]. The SPhU I does not offer to apply GC procedures for determination and control of the qualitative composition and the quantitative content of essential oil in the cones of hop [5]. The methods of GC analysis, which allow to control the essential oil composition in the medicine developed containing simultaneously some components with the terpenoid content, are not also developed. It is particularly concerned the essential oil MPRM described above.

Therefore, the aim of this work was to develop the method for determination of the qualitative composition and the quantitative content of the main components of essential oil of the active pharmaceutical ingredients of “Apised” capsules with the sedative action – the herb of garden balm, the cones of hop, inflorescences of spike lavender – in the presence of the standardized substance of natural powdered honey (NPH) by GC.

Materials and Methods

The objects of our investigations were the following samples of the APHI of “Apised” capsules: the herb of garden balm – *Herba Melissa officinalis* L. (the registration certificate No.UA/8919/01/01, batch 60612) manufactured by “Liktravy” PJSC (Zhytomyr, Ukraine); the cones of hop – *Strobili Humuli lupuli* L. (the registration certificate No.UA/11477/01/01, batch 003) manufactured by “Liktravy” PJSC (Zhytomyr, Ukraine); the

inflorescences of spike lavender – *Flores Lavandulae angustifolia* Mill. cultivated in the territory of Nikitsky Botanical Garden of UAAS; NPH (the changes No.1:2013 to the Ukrainian specification 01.2-02010936-001:2007) obtained by freeze drying under conditions of “Biolik” JSC (Kharkiv) using “Virtis” production equipment (USA); and also “Apised” capsules [13].

The standard samples of terpenoid compounds such as linalool (Linalool-Aldrich, batch L2602), myrcene 92.0% (Myrcene-Aldrich, batch M100005), 1,8-cineole (1,8-Cineole-Aldrich, batch S80601) and borneol (Borneol-Aldrich, batch 15598) produced by the Sigma-Aldrich Chemie GmbH company (Germany) were used in our work.

As essential oils are the complex natural matrix, which contains substances with a diverse chemical structure substantially differing by their physical and chemical properties, the method of tandem chromatography-mass spectrometry (GC-MS-MS) in the variant of the equilibrium vapour phase analysis has been applied for identification and quantitative determination of terpenoids in the MPRM and in the medicine developed; it allows to divide additionally the substances to be analyzed depending on their polarity and lipophilic and hydrophilic properties.

The chromatographing was carried out using a Saturn 2000 gas-liquid chromatograph (Varian Corp., USA). The chromatographing conditions were:

- the column was capillary quartz CP-SIL8 (Chrom-pack, USA) with the size of $\varnothing 0.25$ mm \times 30 m; the stationary phase was the mixture of 5% phenyl polysiloxane *R* and 95% dimethylpolysiloxane *R*;
- the temperature of the column thermostat was 40°C (5 min.), increase of the temperature with the flow rate of 10°C/min to 250°C (keeping for 10 min);
- the evaporator temperature was 200°C, without stream separation;
- the mass-detector (by the type of ion trap): the range of masses scanning was 40 – 650 with hold-up time of 1 min; the ionization mode was the electron impact (70 eV);
- the volume rate of a carrier gas (helium) was 2.0 ml/min.

The sample preparation was carried out in the following way: 0.5 g of the test sample was placed in a 20 ml vial and hermetically covered. The vial was kept in thermostat under the temperature of 90°C for 45 min. Each 1.0 ml of the gas phase over the test sample was selected and alternately chromatographed under the conditions mentioned above; not less than 5 chromatograms were obtained.

Identification of components was performed by comparing the complete mass-spectra of the samples under research with the appropriate information of the NIST mass-spectrometric data library (150000 mass-spectra), as well as by the linear retention indexes calculated separately for each component using the AMDIS programme. When comparing the mass-spectra the identification was considered to be valid if the ratio *m/z* coincidence for the main ions and linear retention indexes was not less than 95%.

For quantitative determination of the terpenoids composition of essential oils the internal normalization me-

Table

The research results of terpenoid composition of the apiphytomedicine "Apised" developed and essential oil of MPRM in its composition

Terpenoid compounds	Retention time, min	Peak area, CU	Compound content in the vapour phase, %
Herb of garden balm			
Linalool	11.303	9066	100.00
Cones of hop			
Unspecified	10.436	6905	20.64
Myrcene	10.523	26542	79.36
Inflorescences of spike lavender			
1,8-Cineole	11.499	11607	55.51
Borneol	11.808	9303	44.49
Natural powdered honey			
Myrcene	10.510	21651	59.19
Linalool	11.361	14929	40.81
"Apised" capsules			
Unspecified	10.336	9282	8.07
Myrcene	10.412	62315	54.17
Unspecified	11.132	5307	4.61
Linalool	11.320	10536	9.16
1,8-Cineole	11.555	17182	14.94
Borneol	11.825	10413	9.05

thod was applied to the chromatograms obtained and the content for each component was determined in percents.

Results and Discussion

The retention times (min.) and the quantitative content (%) of the main terpenoid compounds of MPRM essential oil identified and the apiphytomedicine developed are given in Table.

The chromatogram of the terpenoid compounds obtained by the example of the apiphytomedicine "Apised" developed is given in Figure.

To increase the reliability of identification for the composition of essential oils we used the standard samples of terpenoid compounds, namely myrcene, linalool, 1,8-cineole and borneol added to the samples studied after carrying out primary identification and conducted the repeated research.

Increase of the peak area of the corresponding compounds and the absence of peaks split in this case confirm the supposition concerning the structure of the compounds identified made during the primary analysis.

The analysis of experimental data presented in Table testifies that the vapour phase obtained for "Apised" capsules contains six main components, among them four compounds identified – myrcene, 1,8-cineole, linalool and borneol (by increasing of the content). The percentage of the compounds identified is 87.32%, i.e. their content is prevalent in the medicine developed.

It should be noted the percentage of the main terpenoid compounds in the apiphytomedicine "Apised" correlates with the composition of the medicine deve-

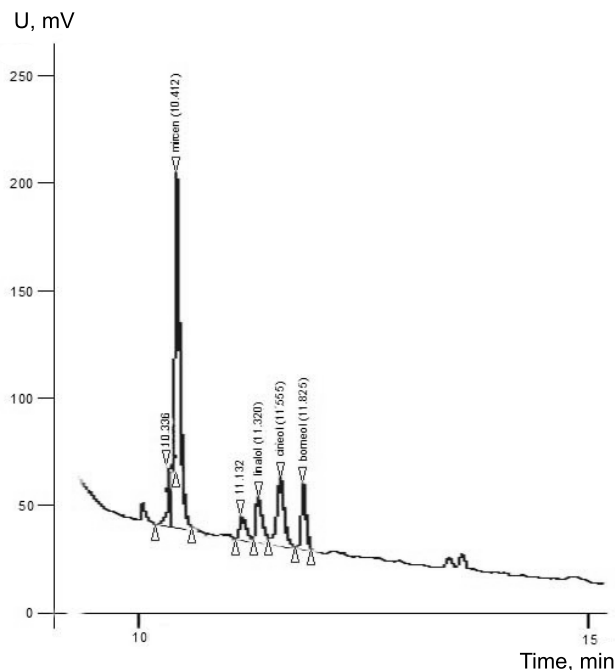


Fig. The typical chromatogram of terpenoid compounds (by the example of "Apised" capsules) obtained by the GC-MS-MS method under the conditions mentioned above.

loped [13] and the literary data about the essential oil composition of the MPRM under research well [1].

The dominant essential oil component of the apiphytomedicine "Apised" developed is myrcene (54.17%), which presence is thanks for hop cones and NPH in the drug composition, and it stipulates a high general tonic and sedative action, clarifies consciousness, assists in attention concentration, increases and restores nerves [1].

Thus, the complex of experimental research conducted has allowed to develop the reliable and reproducible method, which gives the possibility to carry out standardization of the terpenoid composition of essential oils of the apiphytomedicine "Apised" developed.

CONCLUSIONS

1. The method of determination of the qualitative composition and the quantitative content of the main components of MPRM essential oil (the herb of garden balm, the cones of hop, inflorescences of spike lavender) in the composition of "Apised" capsules with the sedative action in the presence of the NPH standardized substance has been developed by GC.

2. Six main components have been detected in essential oil of the apiphytomedicine developed, among them four compounds identified – myrcene (54.17%), 1,8-cineole (14.94%), linalool (9.16%) and borneol (9.05%) – are prevalent.

3. With using the tandem chromatography-mass spectrometry the method developed gives the possibility to identify the components of essential oil regardless of the way of medicinal plant raw material obtaining and its origin, as well as to determine their quantitative content in percents with the help of the internal normalization method; it allows to carry out standardization of the terpenoid composition of essential oils of the medicine developed – "Apised" capsules by the method suggested.

REFERENCES

1. Гуринович Л.К., Пучкова Т.В. Эфирные масла: химия, технология, анализ и применение. – М.: Школа Косметических Химиков, 2005. – 192 с.
2. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х.: РІРЕГ, 2001. – 556 с.
3. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 1. – Х.: РІРЕГ, 2004. – 520 с.
4. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доп. 2. – Х.: НЕФЦ, 2008. – 620 с.
5. Державна фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 1-е вид. – Доп. 3. – Х.: УНФЦЯЛЗ, 2009. – С. 216-218.
6. Компендиум 2012 – лекарственные препараты / Под ред. В.Н.Коваленко. – К.: МОРИОН, 2012. – 2320 с.
7. Либусь О.К., Работягов В.Д., Кутько С.П., Хлыпенко Л.А. Эфиромасличные и пряноароматические растения. – Херсон: Айлант, 2004. – 272 с.
8. Ляшенко Н.И., Михайлов Н.Г., Рудык Р.И. Физиология и биохимия хмеля. – Житомир: Полісся, 2004. – 408 с.
9. Мелентьева Т.А., Рудакова И.Л., Самылина И.А. // Фармація. – 2007. – №2. – С. 3-4.
10. Попова Н.В., Литвиненко В.И. Лекарственные растения мировой флоры. – Х.: СПДФО Мосякин В.Н., 2008. – 510 с.
11. Приймак Г.М. Продукти бджільництва та лікарські рослини в народній медицині. – К.: ІАЕ УААН, 2001. – 530 с.
12. Сегуру Н.В., Рудакова И.Л., Вандышев В.В., Самылина И.А. // Фармація. – 2005. – №3. – С. 3-5.
13. Шпичак О.С., Тихонов О.І. Лікувально-профілактичний засіб у формі капсул із седативною дією // Пат. Україна (19)UA (11)77952 (13)U, (51)МПК А 61 К 9/48 (2006.01) А 61 Р 25/20 (2006.01). Заявка №: и 2012 05333 від 28.04.2012. – Оубл.: 11.03.2013. – Бюл. №5. – 5 с.
14. Bakkalia F., Averbecka S., Averbecka D., Idaotarb M. // Food and Chemical Toxicol. – 2008. – Vol. 46, Issue 2. – P. 446-475.
15. Braun M.C. Herbs and natural supplements: An Evidence – based Guide. – London: Elsevier, 2007. – 567 p.
16. Cavanagh H.M.A., Wilkinson J.M. // Phytotherapy Res. – 2002. – Vol. 16, Issue 4. – P. 301-308.
17. European Pharmacopoeia. – 7th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2010. – Vol. 1. – P. 1163-1165, 1184-1185.
18. Geuenich S., Goffinet C., Venzke S. et al. // Retrovirol. – 2008. – №5. – P. 27.
19. Heinrich M., Barnes J., Gibbons S., Heinrich M. Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy. – London: Churchill Livingstone, 2004. – 309 p.
20. Leung A.Y., Foster S. Encyclopedia of Common Natural Ingredients Used in Food, Drugs, and Cosmetics. – 2nd ed. – New York: John Wiley & Sons, 1996. – 409 p.
21. Lucchesi M.E., Chemat F., Smadja J. // J. of Chromatography A. – 2004. – Vol. 1043, Issue 2. – P. 323-327.
22. Panizzi L., Flamini G., Cioni P.L., Morelli I. // J. of Ethnopharmacol. – 1993. – №39 (3). – P. 167-170.
23. Sacchetti G., Maietta S., Muzzolia M. et al. // Food Chemistry. – 2005. – Vol. 91, Issue 4. – P. 621-632.
24. Wagner H., Bladt S. Plant Drug Analysis. – 2nd ed. – Berlin: Springer, 2001. – 384 p.
25. Weitzel C. // Phytochemistry. – 2011. – Vol. 72. – P. 572-578.
26. WHO monographs on selected medicinal plants. – Vol. 2. – Geneva, 2002. – 356 p.
27. WHO monographs on selected medicinal plants. – Vol. 3. – Geneva, 2007. – 390 p.

РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ТЕРПЕНОЇДНОГО СКЛАДУ ЕФІРНИХ ОЛІЙ АКТИВНИХ ФАРМАЦЕВТИЧНИХ ІНГРЕДІЄНТІВ КАПСУЛ «АПІСЕД» МЕТОДОМ ГАЗОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**О.С.Шпичак, О.І.Тихонов, В.А.Ханін****Ключові слова:** терпеноїди; ефірні олії; газова хроматографія; капсули «Апісед»

Розроблено методику визначення якісного складу та кількісного вмісту терпеноїдів ефірних олій активних фармацевтичних інгредієнтів, що входять до складу апіфітопрепарату «Апісед» седативної дії у формі капсул, а саме лікарської рослинної сировини (трави меліси лікарської, шишок хмелю звичайного, суцвіть лаванди вузьколистої) і стандартизованої субстанції меду натурального порошкоподібного, методом газової хроматографії. Оскільки ефірні олії являють собою складну природну матрицю, яка містить речовини різної хімічної будови,

що суттєво відрізняються за своїми фізико-хімічними властивостями, для ідентифікації та кількісного визначення терпеноїдів у лікарській рослинній сировині та у розробленому препараті нами було використано метод тандемної хромато-мас-спектрометрії у варіанті аналізу рівноважної парової фази, що дозволяє додатково розділити аналізовані речовини в залежності від їх полярності та ліпофільно-гідрофільних властивостей. Хроматографування проводили на газо-рідинному хроматографі Saturn 2000 (Varian Corp., США), оснащеному мас-детектором за типом іонної пастки. Ідентифікацію компонентів проводили шляхом порівняння повних мас-спектрів досліджуваних зразків з відповідними даними бібліотеки мас-спектрометричних даних NIST (150000 мас-спектрів), а також за лінійними індексами утримування, які розраховували за допомогою програми AMDIS окремо для кожного компонента. Для кількісного визначення терпеноїдного складу ефірних олій до отриманих хроматограм застосовували метод внутрішнього нормування та визначали вміст кожного компонента у відсотках. В ефірній олії апіфітопрепарату «Апісед» виявлено шість основних компонентів, серед яких переважають чотири ідентифіковані – мірцен (54,17%), 1,8-цинеол (14,94%), ліналоол (9,16%), борнеол (9,05%). Частка ідентифікованих сполук становить 87,32%. Відсотковий вміст основних терпеноїдних сполук у розробленому апіфітопрепараті добре корелюється з його складом. Домінуючим ефіроолійним компонентом розробленого апіфітопрепарату «Апісед» є мірцен, який обумовлює високу загальнозміцнюючу та седативну дію, прояснює свідомість, сприяє концентрації уваги, зміцнює нервову систему. Розроблена методика з використанням тандемної хромато-мас-спектрометрії дає можливість незалежно від способу отримання та походження лікарської рослинної сировини ідентифікувати компоненти ефірної олії, а також, використовуючи метод внутрішнього нормування, визначати їх кількісний вміст у відсотках, що дозволяє провести стандартизацію терпеноїдного складу ефірних олій розробленого препарату капсул «Апісед» за запропонованою методикою.

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕРПЕНОИДНОГО СОСТАВА ЭФИРНЫХ МАСЕЛ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ ИНГРЕДИЕНТОВ КАПСУЛ «АПИСЕД» МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О.С.Шпичак, А.И.Тихонов, В.А.Ханин

Ключевые слова: терпеноиды; эфирные масла; газовая хроматография; капсулы «Аписед»
Разработана методика определения качественного состава и количественного содержания терпеноидов эфирных масел активных фармацевтических ингредиентов, входящих в состав апифитопрепарата «Аписед» седативного действия в форме капсул, а именно лекарственного растительного сырья (травы мелиссы лекарственной, шишек хмеля обыкновенного, цветков лаванды узколистной) и стандартизованной субстанции меда натурального порошкообразного, методом газовой хроматографии. Поскольку эфирные масла представляют собой сложную природную матрицу, содержащую вещества различного химического строения, которые существенно отличаются по своим физико-химическим свойствам, для идентификации и количественного определения терпеноидов в лекарственном растительном сырье и в разработанном препарате нами был использован метод тандемной хромато-масс-спектрометрии в варианте анализа равновесной паровой фазы, что позволяет дополнительно разделить анализируемые вещества в зависимости от их полярности и липофильно-гидрофильных свойств. Хроматографирование проводили на газо-жидкостном хроматографе Saturn 2000 (Varian Corp., США), оснащенном масс-детектором по типу ионной ловушки. Идентификацию компонентов проводили путем сравнения полных масс-спектров исследуемых образцов с соответствующими данными библиотеки масс-спектрометрических данных NIST (150000 масс-спектров), а также по линейным индексам удерживания, которые рассчитывали с помощью программы AMDIS для каждого компонента отдельно. Для количественного определения терпеноидного состава эфирных масел к полученным хроматограммам применяли метод внутреннего нормирования и определяли содержание каждого компонента в процентах. В эфирном масле апифитопрепарата «Аписед» обнаружены шесть основных компонентов, среди которых преобладают идентифицированные четыре – мирцен (54,17%), 1,8-цинеол (14,94%), линалоол (9,16%), борнеол (9,05%). Содержание идентифицированных соединений составляет 87,32%. Процентное содержание основных терпеноидных соединений в разработанном апифитопрепарате хорошо коррелирует с его составом. Доминирующим эфиромасличным компонентом разработанного апифитопрепарата «Аписед» является мирцен, наличие которого обуславливает высокое общеукрепляющее и седативное действие, проясняет сознание, способствует концентрации внимания, укрепляет нервную систему. Разработанная методика с использованием тандемной хромато-масс-спектрометрии дает возможность независимо от способа получения и происхождения лекарственного растительного сырья идентифицировать компоненты эфирного масла, а также, используя метод внутреннего нормирования, определять их количественное содержание в процентах, что позволяет провести стандартизацию терпеноидного состава эфирных масел разработанного препарата капсул «Аписед» по предложенной методике.