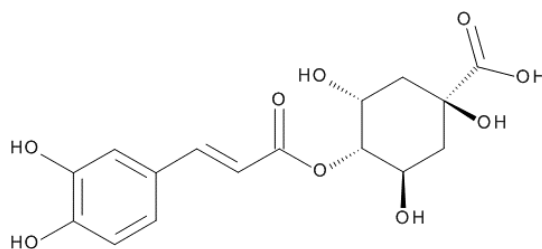


Articsóka levél (*Cynarae folium*), kivonat (*Cynarae folii extractum siccum*) és étrend-kiegészítő termékeinek klorogénsavtartalom-meghatározása / *Determination of chlorogenic acid content of artichoke leaf (Cynarae folium), extract (Cynarae folii extractum siccum) and food supplements*

1. BEVEZETŐ / INTRODUCTION

Articsóka levél (*Cynarae folium*), kivonat (*Cynarae folii extractum siccum*) és étrend-kiegészítő termékeinek mennyiségi vizsgálata HPLC-PDA módszer alkalmazásával a minták klorogénsavtartalmának meghatározása céljából. / *Quantitative analysis of artichoke leaf (Cynarae folium), extract (Cynarae folii extractum siccum) and food supplements using HPLC-PDA method for the determination of chlorogenic acid content.*



Klorogénsav
Chlorogenic acid

A mennyiségi meghatározást az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 11.5) adaptált módszere szerint végezzük. / *Quantitative measurement is carried out according to the adapted method of European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 11.5).*

ACCREDIT LABORATÓRIUM Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu	VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT TARTALMI MÉRÉS ASSAY HPLC-PDA	Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke</i> <i>leaf, extract and food</i> <i>supplement</i> Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024
--	--	--

2. VIZSGÁLT TERMÉKEK / TESTED PRODUCTS

Megrendelő / Client	Indikáió Kft.
Rendelésszám / PO number	206

Terméknév / Product name	Azonosító / Lot number	Vizsgálat dátuma / Date of analysis
Articsóka levél	15/FD/5886/2	2024.06.06.

Dokumentum / Document	Azonosító / ID
Adaptációs jelentés / <i>Adaptation report</i>	AD-ART-HPLC-01
HPLC módszer / <i>HPLC method</i>	Articsoka Ph. Eur. v01
Monográfia száma / <i>Monograph number</i>	04/2018:1866
HPLC szekvencia / <i>HPLC sequence</i>	A226-2024.06.06.lcb

A mintaelőkészítéshez használt oldószerek, valamint a méréshez felhasznált eluensek és reagensek HPLC tisztaságúak. / *The solvents used for sample preparation and the eluents and reagents used for measurement are of HPLC grade.*

3. MINTAELŐKÉSZÍTÉS / SAMPLE PREPARATION

3.1. Vizsgálati minta / Test solution

Levéldrog és étrend-kiegészítő / Leaf drug and food supplement

10 db tablettá porítása és homogenizálása dörzsmozsárban, vagy 10 db kapszula tartalmának homogenizálása dörzsmozsárban, vagy 50 g por, granulátum vagy aprított növényi drog kimérése és homogenizálása dörzsmozsárban. Mérjük be 1 adagolási egységnek megfelelő, vagy 0,25 g port, granulátumot vagy aprított növényi drogot 100 ml-es Erlenmeyer lombikba, és 70 °C-os vízfürdőn extraháljuk 25 ml metanollal 1 órán át, a lombikot óraüveggel lefedve. Lehűlés után vattán keresztül szűrjük 100,0 ml-es mérőlombikba. A maradékot a vattával együtt visszahelyezzük az Erlenmeyer lombikba, és megismételjük a kivonást. A végén az

<p>ACCREDIT LABORATÓRIUM</p> <p>Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu</p>	<p>VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT</p> <p>TARTALMI MÉRÉS ASSAY</p> <p>HPLC-PDA</p>	<p>Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke leaf, extract and food supplement</i></p> <p>Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024</p>
--	---	--

Erlenmeyer lombikot és a vattát 2x 5 ml metanollal átmoszuk. A szűrlethez adjunk 50 ml tisztított vizet, majd, óvatosan elegyítsük, metanollal hígítsuk 100,0 ml-re. Homogenizálás után centrifugáljuk 15 percig 4000 rpm-en. A tiszta felülúszót használjuk. Három párhuzamos mintát készítünk. / *Powder and homogenise 10 tablets in a mortar or homogenise the contents of 10 capsules in a mortar or weigh and homogenize 50 g of powder, granules or powdered plant drug. Measure powder equivalent to 1 dosage unit or 0.25 g powder, granules or powdered plant drug into a 100 mL conical flask and extract with 25 mL of methanol in a 70 °C water bath for 1 hour, covering the flask with a glass. After cooling, filter through small plug of absorbent cotton into a 100.0 mL volumetric flask. Add the absorbent cotton to the residue in the Erlenmeyer flask and repeat the extraction. Rinse the Erlenmeyer flask and the adsorbent cotton with 2x5 mL methanol. Add 50 mL of purified water to the filtrate and mix gently, then dilute to 100,0 mL with methanol. After homogenisation, centrifuge for 15 minutes at 4000 rpm. Use the clean supernatant. Three parallel samples are prepared.*

Articsóka levél száraz kivonat / Artichoke leaf dry extract

Oldjunk fel 30,0 mg vizsgálandó kivonatot az 30%-os metanolban, és hígítsuk fel 25,0 ml-re ugyanezzel az oldószerrel. / *Dissolve 30.0 mg of the extract to be examined in the solvent mixture and dilute to 25.0 mL with the solvent mixture.*

3.2. (a) referens oldat / *Reference solution (a)*

Oldjunk fel 1,3 mg klorogénsav CRS-t 2 ml metanolban, majd hígítsuk 5,0 ml-re ugyanezzel az oldószerrel. Mérjük ki az oldatból 0,500 ml-t 5,0 ml-es mérőlombikba, majd hígítsuk 5,0 ml-re 30 %-os metanollal. / *Dissolve 1.3 mg chlorogenic acid CRS in 2 mL methanol and dilute to 5.0 mL with the same solvent. Transfer 0.500 mL of the solution into a 5.0 mL volumetric flask and dilute to 5.0 mL with 30 % methanol.*

<p>ACCREDIT LABORATÓRIUM</p> <p>Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu</p>	<p>VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT</p> <p>TARTALMI MÉRÉS ASSAY</p> <p>HPLC-PDA</p>	<p>Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke</i> <i>leaf, extract and food</i> <i>supplement</i></p> <p>Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024</p>
--	---	--

3.3. (b) referens oldat / *Reference solution (b)*

Oldjunk fel 6 mg articsóka levél száraz kivonat HRS-t 2 ml 30 %-os metanolban, majd hígítsuk 5,0 ml-re ugyanezzel az oldószerrel. / *Dissolve 6 mg of artichoke leaf dry extract HRS in 2 mL of 30 % methanol and dilute to 5.0 mL with the same solvent.*

4. MÓDSZER / *METHOD*

4.1. Eszközök, berendezések / *Tools, equipment*

Víz tisztító rendszer / *Water purification system:*

Előtisztító / *Precleaner:* BWT Ministil P-24

Tisztított víz / *Purified water:* Thermo Scientific Barnstead Pacific-TII 12

HPLC tisztaság / *HPLC grade:* GenPure Ultra Pure

Shimadzu HPLC rendszer / *Shimadzu HPLC system:*

Detektor / *Detector:* SPD-M40 PDA Detector

Rendszervezérlő / *System controller:* CBM-40

Oszlop termosztáló / *Column Oven:* CTO-40S

Pumpa / *Pump:* LC-40D Solvent Delivery Pump

Automata mintavevő / *Autosampler:* SIL-40C Autosampler

Gáztalanító egység / *Degassing unit:* DGU-405

Oszlop / *Column:*

ReproSil 100 C18 (250x4,6 mm, 5 µm)

Mozgó fázis / *Mobile phase:*

A: foszforsav R, HPLC tisztaságú tisztított víz (0,5:99,5 V/V) / *phosphoric acid R, water for chromatography (0.5:99.5 V/V)*

<p>ACCREDIT LABORATÓRIUM</p> <p>Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu</p>	<p>VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT</p> <p>TARTALMI MÉRÉS ASSAY</p> <p>HPLC-PDA</p>	<p>Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke leaf, extract and food supplement</i></p> <p>Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024</p>
---	---	--

B: foszforsav R, acetonitril (0,5:99,5 V/V)/ *phosphoric acid R, acetonitrile (0.5:99.5 V/V)*

4.2. Módszerleírás / *Method description*

Áramlási sebesség <i>Flow rate</i>	1.2 ml/min		
Detektálás <i>Detection</i>	teljes UV-tartomány (190-400 nm), 330 nm hullámhosszon specifikálva / <i>the whole UV range (190-400 nm), specified at 330 nm</i>		
Oszlophőmérséklet <i>Column temperature</i>	40 °C		
Mintavevő hőmérséklete <i>Autosampler temperature</i>	5 °C		
Futásidő <i>Run time</i>	43 perc/ 43 minutes		
Injektált mennyiség <i>Injected volume</i>	25 µl		
Grádiens elúció <i>Gradient elution</i>	Idő [perc] <i>Time [min]</i>	Mozgófázis A% <i>Mobile phase A%</i>	Mozgófázis B% <i>Mobile phase B%</i>
	0-1	92	8
	20	75	25
	33	75	25
	35	0	100
	37	0	100
	38	92	8
	43	92	8

<p>ACCREDIT[®] LABORATÓRIUM</p> <p>Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu</p>	<p>VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT</p> <p>TARTALMI MÉRÉS ASSAY</p> <p>HPLC-PDA</p>	<p>Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke</i> <i>leaf, extract and food</i> <i>supplement</i></p> <p>Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024</p>
---	---	--

5. VIZSGÁLAT / MEASUREMENT

5.1. Analit azonosítása a vizsgálati mintákban / Identification of analyte in test solutions

A minta kivonatában a klorogénsav azonosítása a standard oldat kromatogramjának összehasonításával történik a csúcsok retenciós ideje és az UV-spektrumok elemzése alapján. / *The identification of chlorogenic acid is carried out by comparison of the retention time and UV spectra of peak on the chromatogram of referent solution and test solution.*

5.2. Mennyiségi meghatározás / Quantitative measurement

A mérés során az injektálás az alábbi sorrendben történik / *The injections during measurement are carried out in the following sequence:*

1. Rendszeralkalmassági oldat (1x) / *System suitability solution (1x)*
2. Standard oldat (3x) / *Standard solution (3x)*
3. Vizsgálati minták (1x) / *Test solutions (1x)*

6. KIÉRTÉKELÉS / EVALUATION

A mérés akkor tekinthető érvényesnek, ha az alábbi rendszer alkalmassági vizsgálatnak megfelel. / *The measurement is considered valid, if the system suitability test passes as follow:*

- A vizsgálati mintával kapott kromatogram hasonló a HRS articsókalevél száraz kivonatával kapott kromatogramhoz. / *The chromatogram obtained with test sample is similar to the chromatogram supplied with the artichoke leaf dry extract HRS*
- Csúcs-völgy arány: legalább 2,5, ahol H_p = a kriptoklorogénsav okozta csúcs alapvonal feletti magassága és H_v = az ezt a csúcstól a klorogénsav okozta csúcstól elválasztó görbe legalacsonyabb pontjának alapvonal feletti magassága. / *Peak-to-valley ratio: minimum 2.5, where H_p = height above the baseline of the peak due to cryptochlorogenic acid and H_v = height above the baseline of the lowest point of the curve separating this peak from the peak due to chlorogenic acid.*

<p>ACCREDIT LABORATÓRIUM</p> <p>Székhely: 6725 Szeged, Pálfy u. 52.3 Telephely: 6728 Szeged, Budapesti út 9. Tel.: +36305259395 e-mail: contact@accredit.hu www.accredit.hu</p>	<p>VIZSGÁLATI JELENTÉS TEST REPORT</p> <p>TARTALMI MÉRÉS ASSAY</p> <p>HPLC-PDA</p>	<p>Terméknév / Product name: Articsóka levél, kivonat és étrend-kiegészítő / <i>Artichoke</i> <i>leaf, extract and food</i> <i>supplement</i></p> <p>Azonosító / Document ID: VJ-ART-HPLC-003/2024</p>
---	---	--

Klorogénsavtartalom számolás / *Calculation of chlorogenic acid content:*

$$C (\%) = \frac{A_1 \times m_2 \times p \times D}{A_2 \times m_1}$$

A_1 = a klorogénsav csúcs területe a vizsgálati oldattal kapott kromatogramon / *area of the peak due to chlorogenic acid in the chromatogram obtained with the test solution*

A_2 = a klorogénsav csúcs területe a referens oldattal kapott kromatogramon (3 injektálás átlaga) / *area of the peak due to chlorogenic acid in the chromatogram obtained with the reference solution (mean of 3 injections)*

m_1 = a vizsgálandó minta tömege, grammal kifejezve / *mass of the test sample, in grams*

m_2 = a referencia oldat előállításához használt klorogénsav CRS tömege grammal / *mass of chlorogenic acid CRS used to prepare the reference solution, in grams*

p = a klorogénsav CRS klorogénsavtartalma / *percentage content of chlorogenic acid in chlorogenic acid CRS*

D = a hígítási faktor a klorogénsav referens és a vizsgálati minta oldatainak térfogata között, drog és étrend kiegészítő: $D=2$, kivonat: $D=0,5$ / *dilution factor between the volume of chlorogenic acid reference solution and test solution, drug and food supplement: $D=2$, extract: $D=0.5$*

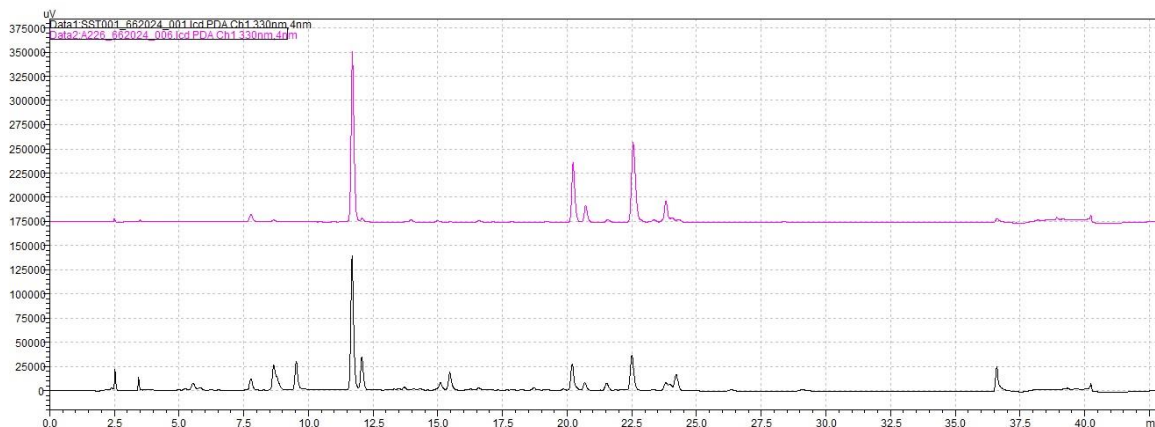
7. KÖVETELMÉNY / REQUIREMENT

Minta / Sample	Követelmény / Requirement
Articsóka levél / <i>Artichoke leaf</i>	min. 0.7%
Articsóka levél száraz kivonat / <i>Artichoke leaf dry extract</i>	min. 0.6%

8. EREDMÉNYEK / RESULTS

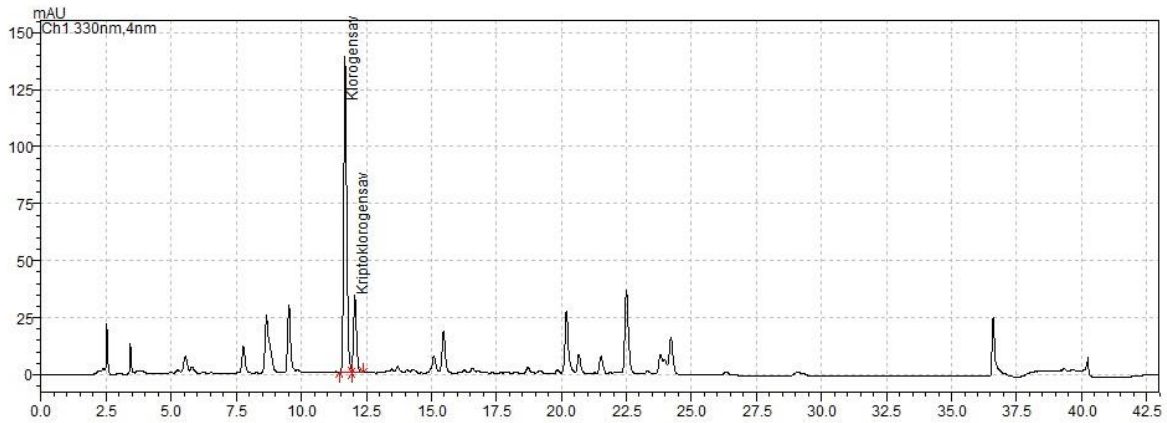
Az elővizsgálatok alapján a kivonatokra vonatkozó mintaelőkészítés szerint előírt kivonószerben a minta nem oldódik fel. 15 perc ultrahangos kivonással végzett mintaelőkészítéssel kapott minta klorogénsavtartalma kimutatási határ alatt van, ezért a mintaelőkészítést a levéldrog és étrend-kiegészítő mintáknak megfelelően végeztük, mivel ez a módszer egy töményebb kivonatot eredményez. / *Based on the preliminary tests the sample does not dissolve in the extraction solvent prescribed in the sample preparation for extracts. The chlorogenic acid content of the sample obtained by 15 minutes of ultrasonic extraction is under detection limit, therefore the sample preparation was performed according to the leaf drug and food supplement, as this method results in a more concentrated extract.*

8.1. Rendszeralkalmassági vizsgálatok



1. ábra A HRS kivonat oldat (fekete) és a minta (rózsaszín) oldat kromatogramjának összehasonlítása / **Figure 1** The comparison of chromatogram of HRS extract solution (black) and test solution (pink)

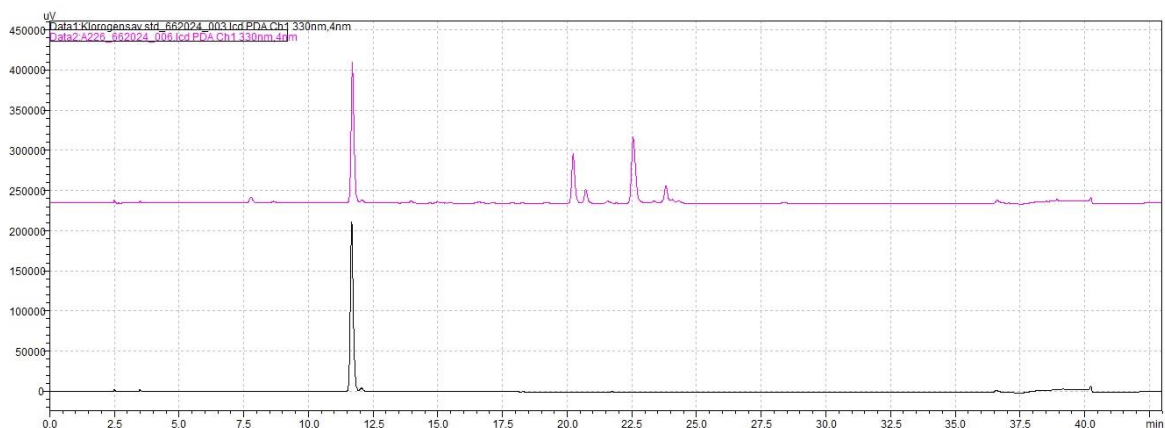
Az **1. ábra** alapján a vizsgálati mintával kapott kromatogram hasonló a HRS articsókalevél száraz kivonatával kapott kromatogramhoz. / *Based on Figure 1 the chromatogram obtained with test sample is similar to the chromatogram supplied with the artichoke leaf dry extract HRS.*



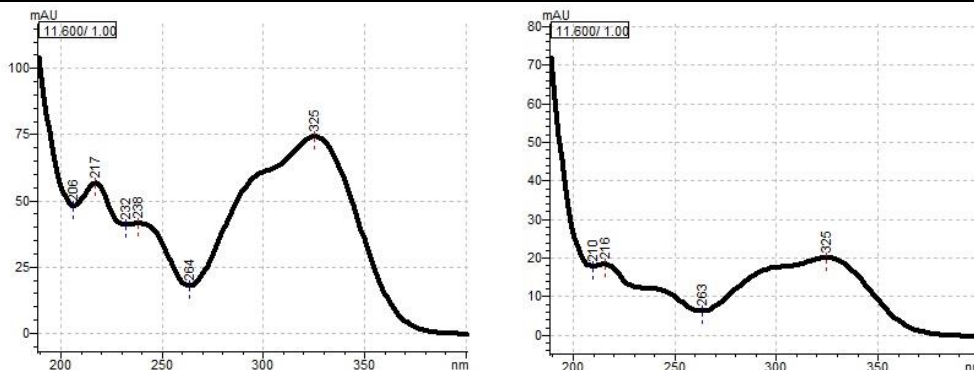
2. ábra A (b) referens oldat kromatogramja 330 nm hullámhosszon. Retenciósidők: klorogénsav: 11,680 perc; kriptoklorogénsav: 12,064 perc / **Figure 2** Chromatogram of reference solution (b) detected at 330 nm wavelength. Retention times: chlorogenic acid: 11.680 min; cryptochlorogenic acid: 12.064 min

Rendszeralkalmassági vizsgálat / System suitability test	
Hegy-völgy arány (kriptoklorogénsav): min. 2,5 Peak-to-valley ratio (cryptochlorogenic acid): min. 2.5	16,8

8.2. Azonosítás / Identification



3. ábra A klorogénsav referens (fekete) és az articsóka levél (15/FD/5886/2) minta (rózsaszín) oldatainak HPLC kromatogramja (330 nm hullámhosszon detektálva). / **Figure 3** Chromatogram of solutions of chlorogenic acid referent (black) and artichoke leaf (15/FD/5886/2) sample (pink) (detected at 330 nm).



4. ábra A klorogénsav UV spektruma: referens (bal), minta (jobb) / **Figure 4** The UV spectra of chlorogenic acid: referent (left), test sample (right)

8.3. Mennyiségi meghatározás / Quantitative measurement

Gyártási szám Product ID	Bemérés Weighing (g)	Csúcsterület Peak area (mAU)	Tartalom Assay (%)	Átlagtartalom Mean assay (%)	Szórás SD	RSD%
15/FD/5886/2	0.250	1399840	0.84	0.9	0.02	2.4
	0.249	1405857	0.84			
	0.250	1462776	0.87			

Az articsóka levél (15/FD/5886/2) minta klorogénsavtartalma megfelel az Európai Gyógyszerkönyv (Ph. Eur. 11.5) levéldrogra vonatkozó követelményének (min. 0,7%). / *The chlorogenic acid content of artichoke leaf (15/FD/5886/2) sample complies with the requirement of European Pharmacopoeia (Ph. Eur. 11.5) for leaf drug (min. 0.7%).*

Szeged, 2024. 06. 07.

.....
Dr. Csupor-Löffler Boglárka Ph.D

Ügyvezető / *Executive Director*

Tel.: +36305259395
e-mail: contact@accredit.hu

.....
dr. Vollár Martin

dr. Vollár Martin

Gyógyszeranalitikus / *Pharmaceutical analyst*