

УДК 615.072:582.929.4-035.22

Л. В. ВРОНСЬКА, А. Є. ДЕМИД

*ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», м. Тернопіль***ДОСЛІДЖЕННЯ ЩОДО СТАНДАРТИЗАЦІЇ
ТРАВИ МЕЛІСИ ЛІКАРСЬКОЇ**

Для стандартизації ЛРС трави меліси лікарської запропоновано спектрофотометричну методику кількісного визначення суми гідроксикоричних кислот з перерахунком їх вмісту на кислоту розмаринову. Розроблена методика передбачає застосування фотометричної реакції з нітрит-молібденовим реактивом, що забезпечує селективність визначення, а ро зрахунок вмісту через питомий показник поглинання робить методику доступною для широкого застосування у лабораторіях.

Ключові слова: трава меліси лікарської, кислота розмаринова, спектрофотометрія, кількісне визначення, підвищення селективності.

ПОСТАНОВКА ПРОБЛЕМИ

Проблема забезпечення якості препаратів на основі лікарської рослинної сировини (ЛРС) частково вирішується сьогодні шляхом введення монографій на ЛРС у Державну Фармакопею України [4-6]. При цьому гармонізуються вітчизняні вимоги до ЛРС з вимогами Європейської Фармакопеї (ЄФ) [1]. Однак виникає ряд труднощів, пов'язаних, як з різними видами сировини, наприклад, у Європі – листя меліси, в Україні – травамеліси, з відмінностями фітохімічного складу національних зразків сировини, так і з необхідністю введення монографій на національні види ЛРС, відсутні у ЄФ.

**АНАЛІЗ ОСТАННІХ ДОСЛІДЖЕНЬ
І ПУБЛІКАЦІЙ**

Листя меліси лікарської є офіційною ЛРС в багатьох країнах світу і відповідна монографія включена в ЄФ [5-7]. Підходи до стандартизації даної сировини змінились: в ЄФ 5-го видання нормувався загальний вміст суми гідроксицианових похідних у перерахунку на кислоту розмаринову (не менше 4%), тоді як, починаючи з 6-го видання – кількісно нормується вміст лише кислоти розмаринової (не менше 1%). В Україні листя меліси – неофіційна сировина, а як лікарський засіб була зареєстрована трава меліси лікарської (номер реєстраційного посвідчення Р.09.03/07437, термін дії –

з 30.09.2003 до 30.09.2008), яка на сьогодні так і не включена до жодного з доповнень ДФУ. Дослідження щодо відповідності листя меліси лікарської вітчизняного походження і можливості гармонізації вимог з ЄФ ведуться в напрямку вивчення складу ефірної олії, вмісту кислоти розмаринової [6, 7, 8, 9].

**ВИДІЛЕННЯ НЕВИРШЕНИХ РАНІШЕ
ЧАСТИН ЗАГАЛЬНОЇ ПРОБЛЕМИ**

Діюча нормативна документація на траву меліси лікарської передбачає ТШХ-ідентифікацію похідних кислоти кофейної (із зазначенням R_f окремих сполук). Раніше нами було запропоновано для ідентифікації сировини трави меліси лікарської застосовувати виявлення лютеолін-7-глюкозиду, хлорогенової, розмаринової і кофейної кислот методом ТШХ [2] із застосуванням відповідних стандартних зразків та обробкою пластинок селективними реагентами (аміноетилловий ефір дифенілборної кислоти та макрогол 400). Це дозволяє забезпечувати достовірність ідентифікації даної сировини в умовах використання різних типів пластинок, оскільки при застосуванні пластинок «Сорбфил» і Silica gel 60 F_{254} (фірми «Merck», Німеччина) значення R_f будуть різними.

Кількісним показником якості сировини, згідно діючої аналітико-нормативної документації, є сума похідних кислоти кофейної у перерахунку на кислоту кофейну. При цьому їх вміст визначається методом прямої спектрофотометрії

© Вронська Л. В., Демид А. Є., 2014

і нормується – не менше 4 %. Застосування прямого вимірювання оптичної густини спиртового розчину забезпечує вимірювання сумарного поглинання різних, присутніх у спиртових витягах з сировини, речовин. Це робить отримуваний результат не цілком достовірним, оскільки навіть при наявності чітко вираженого максимуму поглинання в електронному спектрі, що не завжди у вилученнях ЛРС спостерігається, маємо справу із накладанням спектрів поглинання речовин, що зумовлюють максимум, з іншими класами БАР. Валідація та застосування різних методів виявлення систематичних похибок забезпечують можливість підвищувати достовірність результату, проте складність ЛРС, як об'єкту дослідження, а саме – мінливість якісного і кількісного співвідношення БАР у сировині, зумовлює необхідність частих валідацій та застосування методу добавок для розрахунку вмісту. Останній прийом також не завжди прийнятний, в зв'язку з неможливістю і вартістю численних стандартних зразків кваліфікації “primary standard”.

ФОРМУЛЮВАННЯ ЦІЛЕЙ СТАТТІ

Метою даної роботи є наукове обґрунтування і розробка методики кількісного визначення суми гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської.

ВИКЛАД ОСНОВНОГО МАТЕРІАЛУ ДОСЛІДЖЕННЯ

У роботі застосовували траву меліси лікарської виробництва ЗАТ “Ліктрави”. Спектрофотометричні вимірювання із записом електронних спектрів поглинання проводили на спектрофотометрі Cary 50.

Підходячи до завдання розробки методики кількісного визначення гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської, вибір методу зупинено на спектрофотометрії, як фармакопейному, доступному, специфічному і, що достатньо вагомо, – експресному, а перерахунок кількісного вмісту запропоновано проводити на кислоту розмаринову.

Було розглянуто можливість застосування прямого спектрофотометричного визначення гідроксикоричних кислот в траві меліси лікарської. Хід кривих світлопоглинання і положення максимуму на них для спиртових вилучень з трави і для стандартних зразків гідроксикоричних кислот подібні (рис. 1, 2), що, на перший погляд, дозволяє застосувати вимірювання оптичної густини для розрахунку їх вмісту в досліджуваній сировині.

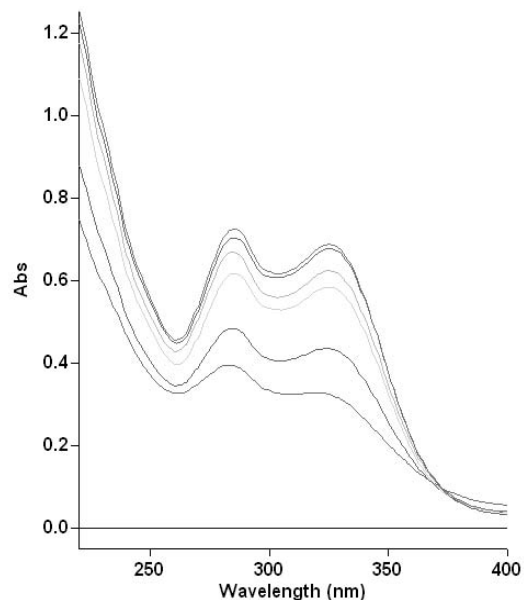


Рис. 1. Електронні спектри поглинання випробовуваних розчинів в умовах кількісного визначення гідроксикоричних кислот (у порядку зменшення оптичної густини при довжині хвилі 325 нм) для зразків: 2, 1, 4, 3, 5, 6.

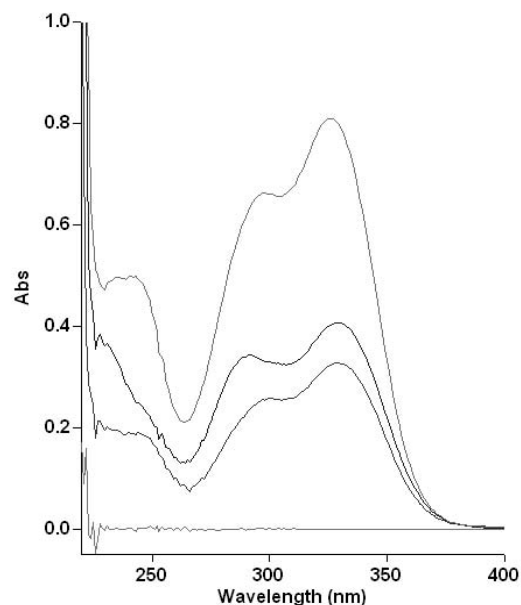


Рис. 2. Електронні спектри поглинання розчинів стандартних зразків (у порядку зростання оптичної густини при довжині хвилі 325 нм): кислоти хлорогенової, кислоти розмаринової і кислоти кофейної.

Детально була відпрацьована наступна методика кількісного визначення.

Методика кількісного визначення суми гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської шляхом прямого вимірювання оптичної густини розчину спиртового вилучення з ЛРС.

Спиртовий витяг. У конічну колбу місткістю 250 мл зі шліфом поміщають 0,2 г (точна наважка) порошку подрібненої сировини, додають 100 мл спирту (50 % об/об) і нагрівають на киплячій водяній бані зі зворотнім холодильником 30 хв. Колбу охолоджують, витяг фільтрують, декантуючи, у мірну колбу місткістю 200 мл. Вилучення повторюють двічі, щоразу застосовуючи по 40 мл спирту (50 % об/об), і нагріваючи на киплячій водяній бані із зворотнім холодильником 10 хв. Отримувані витяги, фільтруючи, долучають до попереднього у ту ж мірну колбу. Колбу зі шротом і фільтр промивають спиртом (50 % об/об), доводячи об'єм розчину цим же розчинником до позначки, перемішують.

Випробовуваний розчин. У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 5 мл спиртового витягу, додають спирт (50 % об/об) до позначки і перемішують.

Розчин порівняння. У мірну колбу місткістю 100 мл поміщають 0,05 г (точна наважка) стандартного зразка кислоти розмаринової, додають 60 мл спирту (50 % об/об) і розчиняють при перемішуванні, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують (розчин А).

У мірну колбу місткістю 50 мл поміщають 5 мл розчину (А), додають спирт (50 % об/об) до позначки і перемішують.

У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 5 мл отриманого розчину і доводять об'єм розчину спиртом (50 % об/об) до позначки, перемішують.

Компенсаційний розчин. Спирт (50 % об/об).

Оптичну густину розчину *випробовуваного розчину* і *розчину порівняння* вимірюють при довжині хвилі 325 нм відносно *компенсаційного розчину*.

Вміст суми гідроксикоричних кислот, у перерахунку на кислоту розмаринову, розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_0 \cdot A \cdot 100 \cdot 100}{5 \cdot A_0 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де X – масова частка гідроксикоричних кислот у сировині, у %;

A – оптична густина випробовуваного розчину;

A₀ – оптична густина розчину порівняння;

m – маса наважки сировини, в г;

m₀ – маса наважки стандартного зразка кислоти розмаринової, в г;

W – вміст вологи у сировині, у %.

Результати визначення суми гідроксикоричних кислот у досліджуваних серіях сировини трави меліси лікарської наведені у таблиці 1.

У 5 виданні ЄФ [7] для спектрофотометричного кількісного визначення суми гідроксикоричних похідних пропонувалась фотометрична реакція, яка базувалась на властивості гідроксикоричних кислот реагувати з нітрит-молібденовим реактивом і здатності утворювати сполуку червоно-вишневого забарвлення з максимумом поглинання при довжині хвилі 505 нм. Нами випробовано дану методику для аналізу трави меліси лікарської. Витяги з трави меліси лікарської отримували за допомогою спирту (50 % об/об), оскільки, як показали попередні дослідження, він дозволяє максимально вилучити визначувані БАР.

Гідроксикоричні кислоти спиртового витягу, отриманого з досліджуваної ЛРС, з нітрит-молібденовим реактивом надають розчину червоно-вишневого забарвлення, отримувана забарвлена сполука характеризується максимумом поглинання при довжині хвилі 505 ± 2 нм. Відповідний спектр поглинання наведений на рисунку 3.

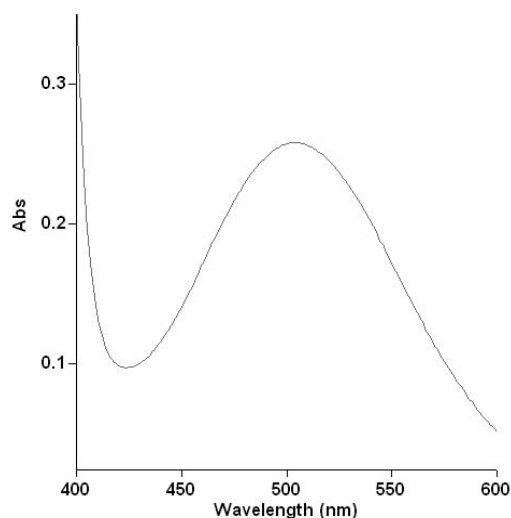


Рис. 3. Електронний спектр поглинання розчину спиртового витягу з трави меліси лікарської з нітрит-молібденовим реактивом

Таким чином, дана реакція може застосовуватись для кількісного визначення суми гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської. Додатково було встановлено, що при отриманні спиртового витягу необхідно використовувати наважку сировини до 0,4 г. Це дозволить працювати у діапазоні оптичних густин з мінімальною похибкою вимірювання. Кількісний розрахунок запропоновано проводити методом питомого показника, значення якого для кислоти розмаринової у умовах проведення реакції з нітрит-молібденовим реактивом та при довжині хвилі 505 нм становить 400 [7].

Методика кількісного визначення суми гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської шляхом вимірювання оптичної густини забарвленої сполуки гідроксикоричних кислот з нітрит-молібденовим реактивом.

Спиртовий витяг. 0,4 г (точна наважка) порошку подрібненої сировини поміщають у конічну колбу місткістю 250 мл зі шліфом, додають 100 мл спирту (50 % об/об) і нагрівають на киплячій водяній бані зі зворотнім холодильником 30 хв. Колбу охолоджують, витяг фільтрують, декантуючи, у мірну колбу місткістю 200 мл. Вилучення повторюють двічі, щоразу застосовуючи по 40 мл спирту (50 % об/об), і нагріваючи на киплячій водяній бані із зворотнім холодильником 10 хв. Отримуваний витяг, фільтруючи, долучають до попереднього у мірну колбу. Колбу зі шротом і фільтр промивають спиртом (50 % об/об), доводячи об'єм розчину цим же розчином до позначки, перемішують.

Випробовуваний розчин. 1 мл спиртового витягу поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл 0,5 М розчину хлористоводневої кислоти Р, 2 мл розчину, отриманого розчиненням 10 г натрію нітриту Р і 10 г натрію молібдату Р у 100 мл води Р. Потім додають 2 мл розчину натрій гідроксиду розведеного Р і воду Р до позначки та перемішують.

Компенсаційний розчин. 1 мл спиртового витягу поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 2 мл 0,5 М розчину хлористоводневої кислоти, 2 мл розчину натрій гідроксиду розведеного Р і воду Р до позначки та перемішують.

Оптичну густину випробовуваного розчину вимірюють одразу при довжині хвилі 505 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст гідроксикоричних кислот, у процентному вираженні на ки слоту розмаринову, проводять за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 20 \cdot 100 \cdot 100}{400 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де X – ма сова частка гідроксикоричних кислот в сировині, у %;

A – оптична густина випробовуваного розчину;

400 – пито мий коефіцієнт поглинання кислоти розмаринової в умовах кількісного визначення;

m – маса наважки сировини, в г;

W – вміст вологи у сировині, у %.

Відповідно до даної методики була проаналізована сировина шести серій ЗАТ «Ліктрави». Результати визначення кількісного вмісту гідроксикоричних сполук за даною методикою наведені у табл.

Визначений вміст суми гідроксикоричних кислот у траві меліси лікарської для шести се-

рій відрізняється: для перших 4 серій отримано близькі значення, а для 5 і 6 серій спостерігається значна різниця з попередніми чотирма і різняться між собою. Порівнюючи результати прямого спектрофотометричного визначення суми гідроксикоричних кислот із результатами, отриманими за вимірюванням оптичної густини сполуки гідроксикоричних кислот з нітрит-молібденовим реактивом, слід відзначити, що вміст за другою методикою є значно нижчим. Загальна кореляція результатів між двома методиками є: 1-4 серії характеризуються вищим вмістом гідроксикоричних кислот, а 5 і 6 відрізняються між собою і відрізняються від 1-4 серій.

Таблиця

РЕЗУЛЬТАТИ ВИЗНАЧЕННЯ ВМІСТУ ГІДРОКСИКОРИЧНИХ КИСЛОТ У ТРАВІ МЕЛІСИ ЛІКАРСЬКОЇ (n = 5, P = 0,95)

Серія	Вміст гідроксикоричних кислот (%), визначений методом	
	Спектрофотометрії через вимірювання оптичної густини спиртового вилучення з ЛРС	Спектрофотометрії через вимірювання оптичної густини забарвленої сполуки гідроксикоричних кислот з нітритмолібденовим реактивом
10807	7,59 ± 0,09	5,77 ± 0,04
60410	7,90 ± 0,08	6,48 ± 0,05
41007	6,97 ± 0,08	5,13 ± 0,05
40410	6,82 ± 0,10	5,48 ± 0,04
30210	4,98 ± 0,10	3,19 ± 0,05
131209	4,02 ± 0,09	2,96 ± 0,06

Частково, відмінності кількісного вмісту, отриманого за двома методиками, можна пов'язувати з різницею прийомів кількісного розрахунку – метод стандарту в першій методиці і метод питомого показника, взятого, як довідникова константа, у другій методиці. З іншого боку, перша методика базується на прямій спектрофотометрії випробовуваного розчину, що містить спиртовий витяг трави, а друга – на специфічній реакції взаємодії гідроксицианомових похідних з нітрит-молібденовим реактивом. У першому випадку, прямо вимірюючи поглинання розчину, можна отримувати завищене значення оптичної густини завдяки поглинанню інших речовин, які також є оптично активними у діапазоні 325 нм.

ВИСНОВКИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

При стандартизації ЛРС трави меліси лікарської запропоновано здійснювати кількісне визначення суми гідроксикоричних кислот з перерахунком їх вмісту на кислоту розмаринову. Для цього розроблена спектрофотометрична методи-

ка з використанням нітрит-молібденового реактиву. Застосування цієї фотометричної реакції дозволило підвищити селективність визначення у порівнянні з існуючою спектрофотометричною методикою, що базувалась на власному поглинанні гідроксикоричних кислот, вимірювання якого у багатокомпонентному розчині є неселективним. У розробленій методиці для кількісного розрахунку запропоновано метод питомого показника, що дозволяє уникнути необхідності застосування малодоступних стандартних зразків, а, отже, забезпечуватиме можливість її реального впровадження для контролю якості трави меліси лікарської у лабораторіях різного рівня.

Застосування запропонованої спектрофотометричної методики, на нашу думку, є більш доцільним, ніж визначення вмісту кислоти розмаринової, як пропонується новими виданнями ЄФ для листя меліси лікарської, з декількох причин. По-перше, виробники ЛРС в Україні не мають можливості забезпечувати виконання умов належної практики вирощування, заготівлі і зберігання ЛРС, через що її індивідуальний компонентний склад не є строго відтворюваним, тоді як сумарний вміст класу сполук є значно відтворюванішим. По-друге, застосування методу ВЕРХ часто ускладнюється відсутністю обладнання у відповідних лабораторіях з контролю якості ЛЗ, тоді як спектрофотометри є розповсюдженим аналітичним обладнанням, яким оснащені лабораторії всіх виробників ЛЗ і лабораторії контролю якості різного рівня.

Для встановлення критерію якості за показником «кількісне визначення гідроксикоричних кислот» необхідним є дослідження більшого числа зразків (з різною географією вирощування та заготівлі) і вивчення динаміки змін даного показника в процесі зберігання.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Владимірова І. М. Фармакопейна стандартизація сировини – цетрарії ісландської слани / І. М. Владимірова, В. А. Георгіянц, А. Г. Котов

// Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2013. – № 1 (27). – С. 10-13.

2. Вронська Л. В. Застосування тонкошарової хроматографії для ідентифікації трави меліси лікарської / Л. В. Вронська // Фармац. часопис. – 2011. – № 4. – 64-67.

3. Гудзенко А. В. Вміст біологічно-активних речовин та антирадикальні властивості спиртових настоек трави меліси лікарської (*Melissa officinalis* L.) / А. В. Гудзенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 5 (18). – С. 17-23.

4. Котов А. Г. Дослідження з розробки та введення монографій на лікарську рослинну сировину і настоек на її основі до Державної Фармакопеї України / А. Г. Котов // Фармаком. – 2012. – № 3. – С. 31-41.

5. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 1. / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2011. – № 6 (20). – С. 16-22.

6. Котов А. Г. Правила викладання та порядок розробки монографій на лікарську рослинну сировину. Частина 2. / А. Г. Котов // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. – № 1 (21). – С. 4-10.

7. Попова Н. В. Вопросы стандартизации лекарственного растительного сырья – мелисса листьев / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 45-50.

8. Попова Н. В. Розмариновая кислота в фармакопейных растениях / Н. В. Попова // Фармаком. – 2013. – № 1. – С. 27-31.

9. Попова Н. В. Анализ эфирного масла мелиссы лекарственной / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко // Фармаком. – 2009. – № 1. – С. 37-40.

10. European Pharmacopoeia. – 7-th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2009. – 3357 p.

11. European Pharmacopoeia. – 6-th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – P. 4668-4670.

12. European Pharmacopoeia. – 5-th ed. – Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines, 2005. – 3680 p.

УДК 615.072:582.929.4-035.22

Л. В. Вронська, А. Е. Демид

ИССЛЕДОВАНИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ МЕЛИССЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Для стандартизации ЛРС травы мелиссы лекарственной предложено спектрофотометрическая методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот с пересчетом их содержания на кислоту розмариновую. Разработанная методика предусматривает применение фотометрической реакции с нитрит-молибденовым реактивом, что обеспечивает селективность определения, а расчет содержания через удельный показатель поглощения делает методику доступной для широкого применения в лабораториях.

Ключевые слова: трава мелиссы лекарственной, кислота розмариновая, спектрофотометрия, количественное определение, повышение селективности.

UDC 615.072:582.929.4-035.22

L. V. Vronska, A. Ye. Demyd

STUDY ON STANDARDIZATION OF HERB MELLISSA

The spectrophotometric method of quantitative determination of the hydroxycinnamic acids amount transfer their content to rosmarinic acid has been proposed to standardize melissa herb. The technique involves the use of photometric reaction with nitrite-molybdenum reagent, which provides selectivity determination and calculation of content through specific absorption rate makes the method available for widespread use in laboratories.

Key words: melissa herb, rosmarinic acid, spectrophotometry, quantitative determination, increase selectivity.

Адреса для листування:

46001 м. Тернопіль, вул. Руська 36

Кафедра фармації ННІ післядипломної освіти

Тернопільського державного медичного

університету ім. І. Я. Горбачевського.

Моб. тел: 097 218 42 60

E-mail: vronskalv@mail.ru

Надійшла до редакції:

02.04.2014