

The investigation of sonchus arvensis L.Extracts

SI "Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine", Kyiv

Introduction. Yellow thistle (*Sonchus arvensis*) is a perennial plant of the Compositae family. This plant is understudied, although, according to the literature, the aerial part of yellow thistle contains a large number of biologically active substances, including flavonoids and polyphenols and can show choleric, diuretic, anti-cancer, antihyperglycemic and other medicinal properties.

Purpose. Determination of flavonoids and polyphenols quantity in raw leaves of thistle yellow and study the effect of the solvent nature on the completeness of BAS extraction.

Materials and methods. Content of flavonoids in terms of luteolin and content of polyphenolic compounds were determined by spectrophotometric method. To select the optimum extraction conditions purified water and water- alcohol mixtures with different contents of ethanol (20, 40, 70, 90 and 96%) were used as extractants.

Results. According to the data, the largest quantity of polyphenols is extracted from the investigated materials when 40% and 70 % ethanol are used as extractants – $1.97683 \pm 0.0102\%$ and $1.90797 \pm 0.0200\%$, respectively, in terms of equivalent amount of dry raw material. The highest quantity of flavonoids was extracted using 90% and 70 % ethanol as extractants – $0.80432 \pm 0.00431\%$ and $0.77806 \pm 0.00581\%$, respectively.

Conclusions. It was established that the best solvent for the extraction of biologically active substances from raw aerial parts of yellow thistle is 70% ethanol.

Key words: thistle yellow, extraction, flavonoids, polyphenols.

Відомості про авторів:

Делян Євген Петрович - пров. інженер Державної лабораторії з контролю якості лікарських засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України». Адреса: Київ, вул. Єжена Потье, 14.

Цуркан Олександр Олександрович - д. фарм. н., професор, зав. Державної лабораторії з контролю якості лікарських засобів ДУ «Інститут фармакології та токсикології АМН України».

УДК 615.31;615.32

© Н. О. ЗАРІВНА, 2014

Н. О. Зарівна

ДОСЛІДЖЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ АГЛІКОНОВОЇ ГРУПИ ТРАВИ ЧЕБРЕЦЮ ПОВЗУЧОГО

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України»

Вступ. Чебрець повзучий (*Thymus serpyllum*), родини Ясноткові (*Lamiaceae*), природно розповсюджений на території України у дикому вигляді та широко культивується. За даними літератури чебрець повзучий містить флавоноїди, дубильні речовини, фенолкарбонові кислоти, ефірну олію тощо, які у комплексі зумовлюють різнопланову фармакологічну активність сировини і субстанцій отриманих на її основі.

Матеріали і методи. Ідентифікацію флавоноїдів агліконового характеру проводили методом тонкошарової хроматографії, попередньо провівши гідроліз усіх флавоноїдів-глікозидів до агліконів, екстракцію утворених агліконів здійснювали

етилацетатом з наступним його випаровуванням та розчиненням отриманого залишку у метанолі. Кількісне визначення здійснювали методом диференціальної спектрофотометрії, в перерахунку на гіперозид.

Результати і висновки. В результаті ТШХ-аналізу нами ідентифіковані: лютеолін, кемпферол, кверцетин, апігенін, мірицитин та ізорамнетин. Встановлено, що кількісний вміст флавоноїдів за методикою після попереднього гідролізу у промислових і дикорослих зразках сировини чебрецю повзучого відрізняється: у промислових серіях 0,68-0,75 %, у дикорослих зразках із Західної України 0,49-0,54 % у перерахунку на гіперозид.

Ключові слова: трава, чебрець повзучий, флавоноїди, хроматографія, спектрофотометрія.

ВСТУП

Віддавна відомою лікарською рослинною сировиною (ЛРС) і такою, що залишається актуальною для виробництва ЛЗ на сьогодні є трава чебрецю повзучого (*Thymus serpyllum*), родини Ясноткові (*Lamiaceae*) [1]. У науковій медицині препарати на основі трави чебрецю призначають при бронхітах, запаленні легень, кашлюку як відхаркувальний засіб [2].

Згідно даних літератури, трава чебрецю повзучого містить складний комплекс біологічно активних сполук моно- і сесквітерпенового ряду, прості фенольні сполуки, флавоноїди, фенолокислоти та інші [1]. Авторами А. Я. Толок та Н. Р. Батурою були ідентифіковані лише лютеолін та апігенін, кофейна кислота, а також вказано на наявність інших речовин, які для них не були відомими, можливо, через відсутність стандартних зразків (СЗ) [3]. В результаті проведення більш глибокого аналізу фенольних сполук трави чебрецю повзучого нами вперше досліджено наявність в досліджуваній сировині розмаринової, хлорогенової, ферулової кислот, а також рутину, гіперозиду [4]. Крім ідентифікованих речовин були й такі, які нам, на даному етапі, не вдалося ідентифікувати. Тому **метою** нашої роботи є дослідження флавоноїдів агліконової групи трави чебрецю повзучого.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ

Для досліджень використовували рослинний матеріал, зібраний з різних територіальних зон Західної України (райони Тернопільської та Львівської областей) та сировину, яку використовують вітчизняні виробники при виготовленні готових лікарських засобів.

Для ідентифікації флавоноїдів агліконового характеру ми використали метод ТШХ, попередньо провівши гідроліз усіх флавоноїдів-глікозидів до агліконів. Агліконовий склад отриманого розчину вивчали при розділенні в системах більш гідрофобного характеру, в якості СЗ використати кемпферол, мірицитин, ізорамнетин, нарингенін, лютеолін, апігенін. Методика проведення ТШХ – аналізу флавоноїдів після гідролізу запропонована нами у такій редакції.

Методика ідентифікації флавоноїдів в траві чебрецю повзучого методом ТШХ після гідролізу

Вихідний розчин. У круглодонну колбу місткістю 100 мл, відважують 2,0 г сировини, подрібненої і просіяної через сито діаметром 2 мм, додають 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну Р (5 г/л), 20 мл ацетону Р і 2,0 мл хлористоводневої кислоти Р1. Кип'ятять зі зворотним холодильником протягом 30 хв., охолоджують і фільтрують рідину через фільтр "синя стрічка" у мірну колбу місткістю 100 мл. Витягнення повторюють ще два рази по 20 мл

ФАРМХІМІЯ ТА ФАРМАКОГНОЗІЯ

ацетону Р, кожного разу прокип'ятивши зі зворотним холодильником 10 хв., промивають колбу і фільтр ацетоном Р і доводять ацетоном Р до позначки.

20,0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну ліжку місткістю 100 мл, додають 20 мл води Р і 15 мл етилацетату Р, струшують протягом 15 хв. після розділення шарів, нижній (водний) шар зливають у конічну колбу, місткістю 50 мл, а верхній (органічний) зливають у конічну колбу 100 мл і закривають корком. Екстракцію водного шару повторюють 2 рази по 15 мл етилацетату Р за вказаних вище умов. Об'єднані етилацетатні витяги кількісно, за допомогою 25 мл води Р, переносять назад у ділильну ліжку і струшують 2 рази з водою Р, по 25 мл і 50 мл, відповідно, протягом 5 хв. Етилацетатні витягнення фільтрують через фільтр "біла стрічка" з 5 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл. Об'єднані етилацетатні вилучення упарюють на водяній бані при температурі не вищій 70 °С до вологого залишку, який розчиняють у 5 мл метанолу Р.

Розчин порівняння. 2,5 мг СЗ кверцетину (Fluka), 2,5 мг СЗ ізорамнетину (Sigma), 2,5 мг СЗ апігеніну (Fluka), 2,5 мг СЗ лютеоліну (Sigma), 2,5 мг СЗ кемпферолу (Sigma), 2,5 мг СЗ мірицитину, 2,5 мг СЗ нарингеніну, 2,5 мг СЗ кофейної кислоти (Fluka), 2,5 мг СЗ ферулової кислоти (Fluka), 2,5 мг СЗ розмаринової кислоти (Fluka) розчиняють у метанолі Р, доводять до 25 мл.

На лінію старту хроматографічної пластинки Silica gel F254 розміром 20x20 см з товщиною шару 0,25 мм наносять у вигляді смуги, завдовжки 10 мм, 10 мкл випробовуваного розчину та 5 мкл розчину порівняння.

Пластинку сушать на повітрі протягом 10 хв., поміщають у камеру з рухомою фазою: хлороформ Р – метанол Р – метилетилкетон Р - ацетилацетон Р (70:10:5:1) і хроматографують висхідним методом. Коли фронт розчинників пройде 15 см, її виймають з камери, сушать при температурі 100 °С. Пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, потім розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р та висушують на повітрі впродовж 30 хв. та переглядають у УФ-світлі при 365 нм.

Хроматографування проводили в хроматографічній камері "GAMAG" за допомогою приладу для автоматичного нанесення проб на пластинку "CAMAG Linomat 5".

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати ТШХ – аналізу флавоноїдів трави чебрецю повзучого після гідролізу наведені в таблиці 1.

Проаналізувавши дані ТШХ – аналізу флавоноїдів трави чебрецю після гідролізу, слід зазначити, що із трьох апробованих систем найкращою роздільною здатністю володіє чотирьохкомпонентна система: хлороформ – метанол – метилетилкетон – ацетилацетон у співвідношенні 70:10:5:1. Це вказує на доцільність застосування даної системи розчинників в якості рухомої фази при ТШХ-аналізі флавоноїдів-агліконів.

Як видно з таблиці 1, при використанні вибраної системи розчинників нами ідентифіковані: лютеолін, апігенін, мірицитин, кверцетин, кемпферол, ізорамнетин.

Відмінність складу фенольних сполук для різних зразків сировини пояснюється різними умовами зростання, заготівлі і сушіння. Проте різні серії Житомирської ФФ «Ліктрави» характеризуються ідентичним складом БАР.

Результати ТШХ - аналізу флавоноїдів трави чебрецю повзучого після гідролізу

БАР	Система № 1				Система № 2				Система № 3			
	Зр.1	Зр.2	Зр.3	Зр.4	Зр.1	Зр.2	Зр.3	Зр.4	Зр.1	Зр.2	Зр.3	Зр.4
Лютеолін	+	+		+	+	+		+	+	+	+	+
Кемпферол									+	+		+
Нарингенін												
Кверцетин	+	+	+	+							+	
Апігенін	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Мірицитин	+	+		+	+			+	+			+
Ізорамнетин									+	+	+	+

Примітка 1: зразок №1 – сировина Житомирська ФФ «Ліктрави», с. 40810; зразок №2 – сировина Житомирська ФФ «Ліктрави», с. 61010; зразок №3 – дикоросла сировина Гусятинського р-ну, Тернопільської обл., 2009 рік заготівлі; зразок №4 – дикоросла сировина Сколівського р-ну, Львівської обл.

Примітка 2: система №1 – хлороформ – оцтова кислота (5:2); система №2 – бензол – метанол (8:2); система №3 – хлороформ – метанол – метилетилкетон – ацетилацетон (70:10:5:1).

Наступним етапом дослідження було визначення кількісного вмісту суми флавоноїдів після попереднього гідролізу.

Кількісний вміст флавоноїдів у різних зразках сировини визначали після проведення гідролізу. Відповідні спектри поглинання для різних зразків сировини в умовах кількісного визначення флавоноїдів після попереднього гідролізу представлені на рисунку.

Як видно з рисунка, диференціальні спектри, мають два поєднаних максимуми поглинання: перший максимум – при 418 ± 3 нм та другий – при 393 ± 4 нм, що свідчить про різноманітність флавоноїдного складу сировини, дослідженого нами вже раніше методом ТШХ [5].

Кількісний вміст розраховували у перерахунку на гіперозид, застосовуючи у розрахунках питомий показник поглинання комплексу гіперозиду з алюміній хлоридом – 500 та вимірюючи оптичну густину в максимумі поглинання [6].

Методика визначення суми флавоноїдів у траві чебрецю повзучого після попереднього гідролізу розроблена нами наведена нижче у такій редакції.

Методика кількісного визначення вмісту суми флавоноїдів з використанням диференціальної спектrophотометрії після попереднього гідролізу в траві чебрецю повзучого в перерахунку на гіперозид

Вихідний розчин. У круглодонну колбу місткістю 100 мл, відважують 0,5 г сировини, подрібненої і просіяної через сито діаметром 2 мм, додають 1,0 мл розчину гексаметилентетраміну Р (5 г/л), 20 мл ацетону Р і 2,0 мл хлористоводневої кислоти Р1. Кип'ячать зі зворотним холодильником протягом 30 хв., охолоджують і фільтрують рідину через фільтр "синя стрічка" у мірну колбу місткістю 100 мл. Витягнення повторюють ще два рази по 20 мл ацетону Р, кожного разу прокип'ятивши зі зворотним холодильником 10 хв., промивають колбу і фільтр ацетоном Р і доводять ацетоном Р до мітки.

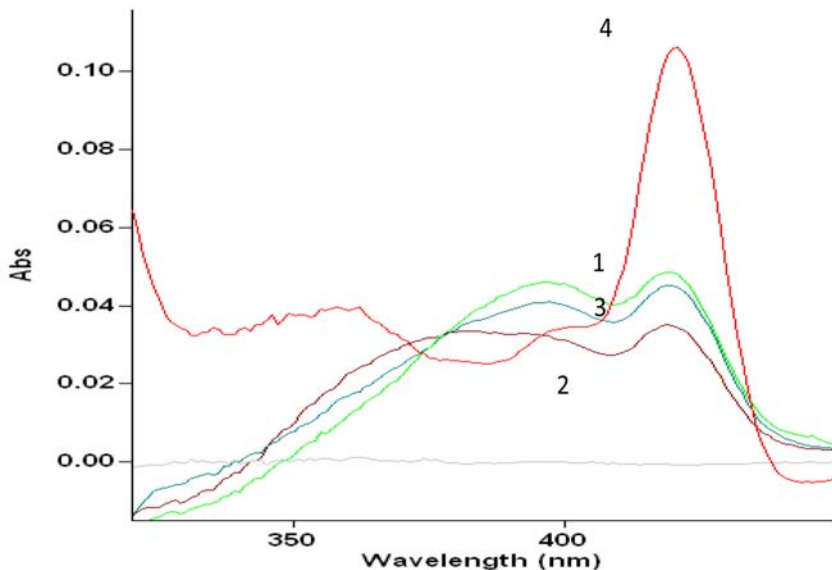


Рис. Диференціальні спектри поглинання комплексів флавоноїдів (після попереднього гідролізу) з алюмінієм хлоридом для різних зразків трави чебрецю

Примітка: 1 – сировина Житомирської ФФ с. 40810, 2 – сировина Київської ФФ, 3 – сировина Житомирської ФФ с. 30111, 4 – дикоросла сировина Гусятинського р-ну, 2009 рік заготівлі.

20,0 мл одержаного розчину поміщають у діляльну ліжку місткістю 100 мл, додають 20 мл води Р і 15 мл етилацетату Р, струшують протягом 15 хв. Після розділення шарів, нижній (водний) шар зливають у конічну колбу, місткістю 50 мл, а верхній (органічний) зливають у конічну колбу 100 мл і закривають корком. Екстракцію водного шару повторюють 2 рази по 15 мл етилацетату Р за вказаних вище умов. Об'єднані етилацетатні витяги кількісно, за допомогою 25 мл води Р, переносять назад у діляльну ліжку і струшують 2 рази з водою Р, по 25 мл і 50 мл, відповідно, протягом 5 хв. Етилацетатні витягнення фільтрують через фільтр “біла стрічка” з 5 г натрію сульфату безводного Р у мірну колбу місткістю 50 мл. Ліжку промивають 10 мл етилацетату Р і доводять вміст в мірній колбі до мітки тим самим розчинником.

Випробований розчин: 10,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 1,0 мл реактиву алюмінію хлориду Р і доводять до мітки 5 % (об/об) розчином оцтової кислоти льодяної Р в метанолі Р.

Компенсаційний розчин: 10,0 мл вихідного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, доводять до мітки 5 % (об/об) розчином оцтової кислоти льодяної Р в метанолі Р.

Оптичну густина випробовуваного розчину вимірюють через 30 хв після приготування при довжині хвилі 420 ± 4 нм відносно компенсаційного розчину.

Вміст суми флавоноїдів (X) у сировині, у відсотках та в перерахунку на гіперозид, розраховують із застосуванням питомого показника поглинання комплексу гіперозиду з алюміній хлоридом – = 500 за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot 125}{m_{\text{нав}} \cdot (100 - W)}$$

де A_x – оптична густина випробовуваного розчину; $m_{\text{нав}}$ – маса наважки сировини (г); W – вміст вологи у сировині (%).

Результати визначення вмісту флавоноїдів у різних зразках трави чебрецю після попереднього гідролізу флавоноїдів-глікозидів до відповідних агліконів наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Результати кількісного визначення вмісту флавоноїдів у різних зразках сировини чебрецю повзучого

Зразок сировини	Вміст суми флавоноїдів, %, після попереднього гідролізу у перерахунку на гіперозид
Сировина Житомирської ФФ С. 61010 (зразок 1)	0,68 ± 0,02
Сировина Житомирської ФФ С. 20111 (зразок 2)	0,73 ± 0,01
Сировина Житомирської ФФ С. 40810 (зразок 3)	0,75 ± 0,01
Дикоросла сировина Гусятинського р-ну (2009 рік заготівлі)	0,54 ± 0,02
Дикоросла сировина Гусятинського р-ну (2010 рік заготівлі)	0,49 ± 0,02

Яквидно з таблиці 2 вміст флавоноїдів, визначений після гідролізу, у різних зразках трави чебрецю дещо відрізняється, що пов'язано з різноманітністю флавоноїдного складу. Нижчі значення вмісту, отримані за даною методикою, можливо, можуть бути пов'язані з вилученням флавоноїдів з сировини у кислому середовищі, за наявності якого розчинність флавоноїдів є нижчою, а також із переходом проекстрагованих етилацетатом флавоноїдів у водну фазу при промиванні етилацетатного вилучення.

ВИСНОВКИ

1. Вперше вивчено агліконовий склад флавоноїдів трави чебрецю повзучого, в результаті ТШХ-аналізу ідентифіковано лютеолін, кемпферол, кверцетин, апігенін, мірицитин та ізорамнетин.

2. Розроблено та апробовано методику кількісного визначення флавоноїдів трави чебрецю повзучого після проведення попереднього гідролізу.

3. Визначено вміст флавоноїдів у промислових та дикорослих зразках сировини, що становить відповідно 0,68-0,75 % та 0,49-0,54 % у перерахунку на гіперозид.

4. Результати дослідження флавоноїдів агліконової групи трави чебрецю повзучого свідчать про перспективність поглибленого вивчення її фармакологічної дії.

Література

1. Лікарські рослини і фітотерапія (фітотерапевтична рецептура) : навч. посіб. / Л. В. Бензель, Р. Є. Дармограй, П. В. Олійник, І. Л. Бензель. – К.: Медицина, 2010. – 400 с.

2. Питання введення до Державної Фармакопеї України монографії «Чебрець повзучий» / Е. Е. Котова, Н.І. Тихоненко, А.Г. Котов [та ін.] // Фармаком. – 2009. – №2. – С.30-35.

3. Оптимізація умов вилучення комплексів діючих речовин з трави чебрецю / Н. Р. Батура, А. Я. Толок, Л. О. Омелянчик // Фармацевтичн. журн. – 1997. – № 1. – С. 103–106.

4. Зарівна Н. О. До питання стандартизації трави чебрецю повзучого за вмістом флавоноїдів / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2012. – № 5(25). – С. 21-27.

5. Зарівна Н. О. Застосування хроматографічних методів аналізу для вивчення поліфенольних сполук трави чебрецю повзучого / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська // Мат. III Всеукраїнської науково-практичної конференції «Хімія природних сполук», 30-31 жовтня 2012 р. – Тернопіль. - 2012. – С. 118-119.

6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”. – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство „Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. – 620 с.

Н. О. Зарівна

Исследование флавоноидов - агликонов травы тимьяна ползучего

Тернопольский государственный медицинский университет
имени И. Я. Горбачевского

Вступление. Тимьян ползучий (*Thymus serpyllum*), семейства Яснотковых (*Lamiaceae*) распространен на территории Украины в диком виде и широко культивируется. По данным литературы, тимьян ползучий содержит флавоноиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты, эфирное масло, которые в комплексе проявляют разноплановую фармакологическую активность сырья и субстанций, полученных на его основе.

Материалы и методы. Идентификацию флавоноидов-агликонов проводили методом тонкослойной хроматографии, предварительно проведя гидролиз всех флавоноидов-гликозидов к агликонам. Количественное определение проводили методом дифференциальной спектрофотометрии, в пересчете на гиперозид.

Результаты и выводы. В результате ТСХ-анализа нами идентифицированы: лютеолин, кемпферол, кверцетин, апигенин, мирицитин и изорамнетин. Установлено, что количественное содержание флавоноидов по методике после предварительного гидролиза в промышленных и дикорастущих образцах сырья тимьяна ползучего отличается: в промышленных сериях – 0,68-0,75 %, в дикорастущих образцах из Западной Украины – 0,49-0,54 % в пересчете на гиперозид.

Ключевые слова: трава, тимьян ползучий, флавоноиды, хроматография, спектрофотометрия.

N. O.Zarivna

Studing of flavonoids - aglycone in wild thyme

I. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Introduction. Wild thyme (*Thymus serpyllum*), Lamiaceae family, is naturally spread in wild in Ukraine and extensively cultivated. According to the reports wild thyme contains flavonoids, tannins, phenol carbonic acid, essential oil, etc., which in combination condition the diverse pharmacological activity of the raw material and substances derived.

Materials and methods. Identification of aglikon flavonoids was performed by thin layer chromatography after hydrolysis of all flavonoids-glycosides to aglycones; extraction of the aglycones was carried out with ethyl acetate formed with subsequent evaporation and dissolving the resulting residue in methanol. Quantitation was carried out by differential spectrophotometry, in terms of the equivalent amount of hyperoside.

Results and conclusions. As a result of TLC analysis, we have identified: luteolin, kaempferol, quercetin, apigenin, mirytsytyn, izoramnetyn. It was established that quantitative flavonoid content in industrial and wild samples of thyme raw was different: 0.68-0.75% - in industrial series and 0.49-0.54% - in wild samples collected in Western Ukraine, in terms of the equivalent amount of hyperoside.

Key words: herb, wild thyme, flavonoids, chromatography, spectrophotometry.

Відомості про автора:

Зарівна Надія Орестівна – к. фарм. н., асистент кафедри фармацевтичної хімії ТДМУ імені І.Я.Горбачевського. Адреса: Тернопіль, Майдан Волі, 1, тел.: (0352) 52-44-92.

УДК: 615.07:582.683.2

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2014

В.С.Кисличенко, В.Ю.Кузнєцова, Ю.С. Колісник

**ПРО НЕОБХІДНІСТЬ РОЗРОБКИ МОНОГРАФІЇ
«ГРИЦИКІВ ТРАВА» ДЛЯ ВВЕДЕННЯ ДО ДЕРЖАВНОЇ
ФАРМАКОПЕЇ УКРАЇНИ**

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна

Вступ. Одним з найважливіших джерел для створення лікарських засобів є лікарська рослинна сировина (ЛРС). Обов'язковими умовами використання ЛРС (як культивованої, так і дикорослої) є її відповідна якість та доведена фармакологічна активність.

Матеріали і методи. В роботі наведені результати порівняльного аналізу даних монографій на траву грициків звичайних, представлених в ДФ СРСР VIII – ДФ СРСР XI видань та Британській трав'яній фармакопеї. Встановлено відсутність сучасних методів ідентифікації біологічно активних речовин трави грициків звичайних, а також відсутність розділу «Кількісне визначення» біологічно активних речовин, що є неприпустимим у сучасних умовах.

Результати і висновки. Зроблений висновок про гостру потребу розробки національної монографії «Грициків трава» для введення до Державної Фармакопеї України. Проведений аналіз даних монографій Фармакопей показав гостру необхідність розробки національної статті «Грициків трава» для включення в Державну фармакопею України, яка буде відповідати сучасними вимогам контролю якості сировини. Інакше Україна може позбутися такого популярного виду сировини як трава грициків звичайних.

Ключові слова: грицики звичайні, Державна Фармакопея України.