

УДК 615.451.16.07:615.322:582.929.4

Н. О. ЗАРІВНА, Л. В. ВРОНСЬКА

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

СТАНДАРТИЗАЦІЯ РІДКОГО ЕКСТРАКТУ ЧЕБРЕЦЮ ПОВЗУЧОГО

Визначено деякі параметри стандартизації рідкого екстракту з трави чебрецю повзучого. Розроблено методики якісного визначення та кількісного вмісту флавоноїдів у рідкому екстракті. Кількісний вміст флавоноїдів повинен бути не менше 0,02 % у перерахунку на апігенін.

Ключові слова: чебрець повзучий, рідкий екстракт, флавоноїди, спектрофотометрія, стандартизація.

ВСТУП

Рослинна сировина була і залишається одним з найважливіших джерел для отримання лікарських засобів. У порівнянні з синтетичними, рослинні препарати мають багато переваг, серед яких – широкий спектр фармакологічної дії, як правило низька токсичність, менш виражена побічна дія і значно менша кількість протипоказань [1]. Виходячи з цього, вивчення перспективних видів лікарської рослинної сировини (ЛРС) з достатньою сировинною базою, раціональне та комплексне її використання, а також розробка на основі ЛРС нових лікарських засобів – актуальне завдання сучасної фармації.

Чебрець повзучий (*Thymus serpyllum*), родини Губоцвіті (*Lamiaceae*), природно розповсюджений на території України у дикому вигляді та широко культивується [9]. За даними літератури чебрець повзучий містить флавоноїди, амінокислоти, дубильні речовини, фенолокислоти, прості феноли тощо, які у комплексі зумовлюють різносторонню фармакологічну активність сировини і субстанцій отриманих на її основі [6].

Нами запропонована технологія отримання рідкого екстракту чебрецю повзучого, яка дозволяє максимально перевести комплекс БАР даної ЛРС в готовий продукт і, по можливості, повніше відтворити терапевтичний потенціал рослини в екстракті [3]. Одним із основних напрямів у дослідженні ЛРС та отриманих з неї фітозасобів є розробка методик їх стандартизації. Для гарантування ефективності і безпеки ЛРС та засобів на її основі необхідна їх кількісна значеність за БАР або маркерами, які обрані із

основних груп речовин, що представлені у сировині [2].

Тому метою нашої роботи було визначення якісних і кількісних параметрів стандартизації рідкого екстракту чебрецю повзучого.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні використовували рідкий екстракт чебрецю повзучого, який отримували згідно із способом, що захищений патентом України на корисну модель [8].

Оскільки при аналізі трави чебрецю з метою стандартизації цієї сировини як показник доброякісності, серед інших, ми обрали кількісний вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот, тому доречним є вивчення якісного та кількісного складу цих БАР і в одержаних рідких екстрактах [4].

Вивчення якісного складу флавоноїдів та фенолкарбонових кислот в досліджуваному екстракті проводили методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) [7]. Хроматографічні дослідження проводили на хроматографічних пластинках Silica gel 60 F254 («Merck», Німеччина) з використанням рухомої фази *етилацетат Р – мурашина кислота Р – вода Р* (90:6:9). Речовинами-свідками виступали: лютеолін, лютеолін-7-О-глюкозид, апігенін, рутин, гіперозид, ізосаліпурпозид, розмаринова, хлорогенова, ферулова, кофейна кислоти тощо.

Кількісне визначення флавоноїдів проводили методом диференціальної спектрофотометрії з використанням спектрофотометру марки «Сary 50» [9].

© Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, 2012

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Рідкий екстракт чебрецю є рідиною світло-коричневого забарвлення із специфічним запахом чебрецю.

Питання доповнення існуючої фармакопейної статті на ЛРС чебрецю повзучого ідентифікацією фенолкарбонових кислот і флавоноїдів, які чисельно представлені у даній сировині, розглянуто нами в [3, 4]. Приступаючи до стандартизації рідкого екстракту чебрецю повзучого, нами розглядалась можливість ідентифікації таких же БАР, продовжуючи запропонований підхід у ланцюзі ЛРС – екстракт.

Хроматографічні дослідження рідкого екстракту чебрецю повзучого методом ТШХ дозволили ідентифікувати фенолкарбонові кислоти – розмаринова (головний представник), кофейна й хлорогенова; флавоноїди – лютеолін-7-О-глюкозид, апігенін-7-О-глюкозид, лютеолін, апігенін і рутин. Не ідентифікували дві кислоти, незначні кількості яких виявляються у верхній частині хроматограми і невстановленої будови глюкозид лютеоліну, який за розміром та інтенсивністю флуоресценції, є головним представником флавоноїдів в екстракті. Виходячи з даних літератури цей представник флавоноїдів може бути лютеолін-7-О-ди- або триглюкозидом.

Тому, кислоти – розмаринова, кофейна, хлорогенова і флавоноїди – лютеолін-7-О-глюкозид, рутин і лютеолін, а також невстановленого складу глюкозид лютеоліну, ми обрали як ідентифікаційні маркери рідкого екстракту чебрецю повзучого, наявність зон яких на хроматограмі досліджуваного об'єкту дозволить об'єктивно його ідентифікувати.

У результаті проведених ТШХ-досліджень нами пропонується наступна методика ідентифікації рідкого екстракту чебрецю повзучого.

Методика ідентифікації рідкого екстракту чебрецю повзучого.

Випробуваний розчин. Рідкий екстракт чебрецю повзучого.

Розчин порівняння. 0,5 мг кислоти розмаринової, 0,5 мг кислоти кофейної, 0,5 мг кислоти хлорогенової, 1,0 мг лютеолін-7-О-глюкозиду, 0,5 мг рутину і 0,5 мг лютеоліну розчиняють у 20,0 мл метанолу Р.

На лінію старту хроматографічної пластинки окремо смугами по 10 мм наносять 10 мкл *випробуваного розчину* та 5 мкл *розчину порівняння*. Пластинку поміщають у камеру із сумішшю розчинників кислота мурашина безводна – вода-етилацетат (6:9:90). Коли фронт розчинників пройде 14 см від лінії старту, пластинку виймають із камери.

Висушування: сушать на повітрі, а потім витримують за температури від 100 С до 105 С протягом 2 хв.

Виявлення: теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти Р у метанолі Р, сушать на повітрі. Потім пластинку обприскують розчином 50 г/л макроголу 400 Р у метанолі Р, сушать на повітрі протягом 30 хв і переглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Результати: на хроматограмі *розчину порівняння* повинні виявлятися (у порядку зростання R_f): оранжева флуоресцююча зона відповідає рутину ($R_f = 0,18$), блакитна флуоресцююча зона відповідає кислоті хлорогеновій ($R_f = 0,32$); жовто-оранжева флуоресцююча зона – лютеолін-7-О-глюкозиду ($R_f = 0,42$), салатово-блакитна флуоресцююча зона – кислоті розмаринової ($R_f = 0,80$), блакитна флуоресцююча зона – кислоті кофейній ($R_f = 0,82$), жовто-оранжева флуоресцююча зона – лютеоліну ($R_f = 0,84$).

На хроматограмі *випробуваного розчину* мають виявлятися шість зон (рутин, кислоти хлорогенової, лютеолін-7-О-глюкозиду, кислоти розмаринової, кислоти кофейної та лютеоліну) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією і зона яскравої жовто-оранжевої флуоресценції ($R_f = 0,29$) нижче зони кислоти хлорогенової на хроматограмі розчину порівняння. Можуть виявлятися інші зони блакитної і жовто-оранжевої флуоресценції.

Послідовність зон на хроматограмах *випробуваного розчину* та *розчину порівняння* наведено на рис. 1.

При аналізі ЛРС трави чебрецю повзучого показником якості було обрано кількісний вміст флавоноїдів, тому проводячи стандартизацію її рідкого екстракту необхідним є кількісне визначення флавоноїдів. Оскільки стандартом для розрахунку їх вмісту у сировині було обрано апігенін, то і при контролі якості екстракту необхідно розраховувати кількість флавоноїдів на апігенін [5].

Диференціальні електронні спектри поглинання комплексу алюміній хлориду з флавоноїдами, які присутні у рідкому екстракті чебрецю, характеризуються наявністю максимуму поглинання при 390 ± 2 нм (рис. 2).

Як видно з рис. 2, в умовах кількісного визначення флавоноїдів, спектр поглинання *випробуваного розчину* для досліджуваного екстракту чебрецю повзучого за ходом кривої та положенням максимуму відповідає спектру поглинання відповідного комплексу апігеніну, тому суму

флавоноїдів в екстракті розраховували у перерахунку на апігенін.

Верхня частина пластинки	
<i>Лютеолін</i> : жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (лютеолін)
<i>Кислота кофейна</i> : блакитна флуоресціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота кофейна)
<i>Кислота розмаринова</i> : салатово-блакитна флуоресціююча зона	салово-блакитна флуоресціююча зона (кислота розмаринова)
<i>Лютеолін-7-О-глюкозид</i> : жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (лютеолін-7-О-глюкозид)
<i>Кислота хлорогенова</i> : блакитна флуоресціююча зона	блакитна флуоресціююча зона (кислота хлорогенова) <i>дуже інтенсивна</i> жовто-оранжева флуоресціююча зона
<i>Рутин</i> : жовто-оранжева флуоресціююча зона	жовто-оранжева флуоресціююча зона (рутин)
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Рис. 1. Схема хроматограми в умовах ідентифікації рідкого екстракту чебрецю повзучого після обробки розчинами аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і макроголу 400 при перегляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм

Для визначення суми флавоноїдів у рідкому екстракті чебрецю нами запропоновано наступну методику.

Методика визначення суми флавоноїдів в рідкому екстракті чебрецю повзучого.

Вихідний розчин. 10,0 мл рідкого екстракту поміщають в мірну колбу місткістю 50 мл і дово-

дять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки і перемішують (*вихідний розчин*).

Випробуваний розчин. 1,0 мл *вихідного розчину* поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2,0 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки, перемішують.

Компенсаційний розчин. 1,0 мл *вихідного розчину* поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки, перемішують.

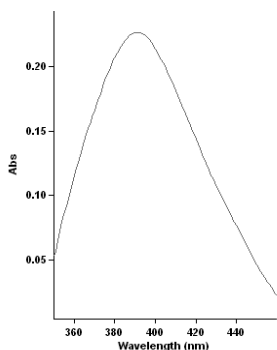
Розчин стандартного зразка апігеніну. 0,03 г стандартного зразка апігеніну (Fluka) поміщають у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 70 мл 70 % спирту етилового Р, розчиняють та доводять об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішують. 10,0 мл отриманого розчину поміщають у мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки, перемішують.

Розчин порівняння. 1,0 мл розчину стандартного зразка апігеніну поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл, додають 2 мл 3 % розчину алюміній хлориду і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки, перемішують.

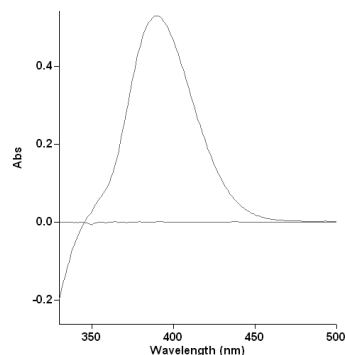
Компенсаційний розчин. 1,0 мл розчину стандартного зразка апігеніну поміщають в мірну колбу місткістю 25 мл і доводять об'єм розчину 70 % спиртом етиловим Р до позначки, перемішують.

Через 30 хв. записують диференціальні електронні спектри поглинання для *випробованого розчину* і *розчину порівняння* відносно компенсаційних розчинів для кожного відповідно та вимірюють оптичну густину в максимумі поглинання при довжині хвилі 390±2 нм.

Вміст суми флавоноїдів (X), у відсотках та в перерахунку на апігенін, розраховують за формулою:



а)



б)

Рис. 2. Диференціальні електронні спектри поглинання випробованого (а) і розчину порівняння (б) в умовах кількісного визначення флавоноїдів у рідкому екстракті чебрецю повзучого ($\lambda_{max} = 390,0$ нм)

$$X = \frac{2 \cdot m_0 \cdot A}{A_0}$$

де: A – оптична густина *випробовуваного розчину*;
 m_0 – маса наважки стандартного зразка апігеніну, в г;

A_0 – оптична густина *розчину порівняння*.

Результати кількісного визначення суми флавоноїдів у рідких екстрактах чебрецю повзучого наведено в табл.

Таблиця

РЕЗУЛЬТАТИ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ В РІДКИХ ЕКСТРАКТАХ ЧЕБРЕЦЮ ПОВЗУЧОГО (P= 0,95; N= 5)

Серія екстракту	Вміст, %
01	0,047±0,001
02	0,033±0,002
03	0,032±0,001
04	0,035±0,001
05	0,027±0,002

Кількісний вміст флавоноїдів у досліджуваних екстрактах коливається у певних межах і визначається вмістом у вихідній сировині та відтворюваністю технології екстрагування. Зважаючи на отримані результати кількісного визначення, при стандартизації рідкого чебрецю повзучого екстракту можна запропонувати критерієм якості вміст флавоноїдів не менше 0,02 % у перерахунку на апігенін.

ВИСНОВКИ

1. Кислоти – розмаринову, кофейну, хлорогенову і флавоноїди – лютеолін-7-О-глюкозид, лютеолін обрано в якості ідентифікаційних маркерів рідкого екстракту чебрецю повзучого. Розроблена ТШХ-методика ідентифікації рідкого екстракту чебрецю повзучого.
2. Досліджено кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на апігенін у рідких екстрактах чебрецю повзучого, кількісним критерієм якості запропоновано вміст флавоноїдів не менше 0,025 %.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Волошин О. І. Ліки рослинного походження: сучасні тенденції у вітчизняній та світовій клінічній медицині і фармації / О. І. Воло-

- шин, О. В. Пішок, Л. О. Волошина // Фітотерапія. – 2003. – № 3. – С. 3-7.
2. Гудзенко А. В. Пошук маркерів для стандартизації полікомпонентних фітозасобів з тонізуючою активністю / А. В. Гудзенко, Т. В. Ковальчук // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – № 3(28). – С. 66-70.
3. Зарівна Н. О. До питання стандартизації трави чебрецю / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів». – Харків, 2011. – С. 65.
4. Зарівна Н. О. Обґрунтування вибору активних маркерів для стандартизації препаратів на основі чебрецю / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, О. А. Подплетня // Фармацевтичний часопис. – 2011. – № 2. – С. 56-60.
5. Зарівна Н. О. Дослідження складу і вмісту біологічно активних речовин в рідких екстрактах чебрецю / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська // матер. міжнар. наук.-практ. конф. «Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів». – Тернопіль, 2011. – С. 38.
6. Котова Е. Е. 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.
7. Практикум по фармакогнозії [под ред. В. Н. Ковалева]. – Х. : Золотые страницы, 2003. – С. 40-45.
8. Пат. 73543 України, МПК⁵¹ С 11 В 1/10, А 61 К 9/08, А 61 К 35/00. Спосіб отримання рідкого екстракту чебрецю повзучого / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, Т. А. Грошовий: заявник і патентовласник ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського». – заявл. 26.03.2012; опубл. 25.09.2012; Бюл. № 18.
9. Фармакогнозія з основами біохімії рослин: [під ред. В. М. Ковальова.] – Х.: Прапор, 2000. – 383 с.
10. Baranowska I., Application of derivative spectropotometry to determination of flavonoid mixtures / I. Baranowska, D. Rarog // Talanta. – 2001. – Vol. 55, № 1. – P. 209-212.

УДК 615.451.16.07:615.322:582.929.4

Н. О. Заривна, Л. В. Вронська

СТАНДАРТИЗАЦІЯ ЖИДКОГО ЕКСТРАКТА ЧАБРЕЦА ПОЛЗУЧЕГО

Определены некоторые параметры стандартизации жидкого экстракта травы чабреца ползучего. Разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в жидком экстракте. Количественное содержание флавоноидов должно быть не меньше 0,02 % в пересчете на апигенин.

Ключевые слова: чабрец ползучий, флавоноиды, жидкий экстракт, спектрофотометрия, стандартизация.

UDC 615.451.16.07:615.322:582.929.4

N. O. Zarivna, L. V. Vronska

STANDARDIZATION OF LIQUID WILD THYME EXTRACT

Some parameters of liquid extract from wild thyme herb standardization were established. The methodic of identification and quantitative determination of flavonoids content in liquid extract were developed. The quantitative flavonoids content must be not less then 0,02 % calculated by apigenin.

Key words: wild thyme, flavonoids, liquid extract, spectrophotometry, standardization.

Адреса для листування:
E-mail: ludafira@mail.ru

Надійшла до редакції:
22.11.2012