

Рекомендована д.ф.н., професором В.М.Ковальовим

УДК 615.322:615.453.2:543.544

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТРАВИ МЕЛІСИ, ШИШОК ХМЕЛЮ ТА СУЦВІТЬ ЛАВАНДИ У СУМІШАХ З РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ МЕТОДОМ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ

О.С.Шпичак

Національний фармацевтичний університет

**Розроблені методики ідентифікації трави меліси лікарської, шишок хмелю звичайного та суцвіть лаванди вузьколистої у сумішах з лікарської рослинної сировини методом ТШХ. За допомогою робочих стандартних зразків БАР та підбору ефективних хроматографічних систем визначені характерні для досліджуваної рослинної сировини сполуки-маркери для їх ідентифікації.**

У теперішній час багатокомпонентні рослинні лікарські засоби (РЛЗ) знаходять широке застосування у медичній практиці для профілактики і лікування низки захворювань, які супроводжуються зростанням інтенсивних стресових та психотравмуючих ситуацій [3, 5]. Представлені на фармацевтичному ринку України фітопрепарати заспокійливої та седативної дії задовольняють потреби менше, ніж на 40%, у той час, коли лікарські засоби цієї групи користуються особливим попитом завдяки відсутності небажаних побічних ефектів у порівнянні з синтетичними аналогами [3].

На цілу низку складних фітопрепаратів нормативна документація передбачає замість ідентифікації індивідуальних біологічно активних речовин (БАР) кожного компоненту, який входить до складу препарату, здійснювати їх сумарне визначення (фенольні сполуки, ефірні олії, терпеноїди, фенілпропаноїди та ін.). Однак такий підхід не дозволяє підтвердити наявність БАР у окремому інгредієнті рослинної суміші, а відтак виявити можливу фальсифікацію.

Для оцінки якості рослинних зборів доцільно серед комплексу БАР за допомогою стандартних зразків визначити показник-маркер, котрий є характерним для кожного виду ЛРС. Так, методом ВЕРХ розроблено методику визначення маркера — розмаринової кислоти для стандартизації трави меліси у багатокомпонентних рослинних сумішах за наявності плодів глоду колючого, трави кропиви собачої, шишок хмелю, плодів коріандра, трави буркуну лікарського, коренів солодки [4, 10].

Метою роботи була розробка методик ідентифікації БАР у складі ЛРС та в рослинних сумішах антистресової та седативної дії, які містять траву меліси лікарської, шишки хмелю звичайного та су-

цвіття лаванди вузьколистої з використанням методу тонкошарової хроматографії.

З літературних джерел відомо, що поєднання цих відомих фітокомпонентів може забезпечити не лише традиційну седативну дію, але й викликати потенційний ефект, що дозволить скоротити дозу та забезпечити відповідну фармакологічну дію на фізіологічному рівні [1].

Меліса лікарська — одна з найпопулярніших лікарських рослин седативної та легкої снотворної дії [13, 21]. Є також дані про антимікробні, антисептичні та протигерпетичні властивості меліси [8, 9, 13, 15, 16, 21, 22].

Біологічна активність меліси обумовлена комплексом ефірних олій та фенольних сполук, що відображено у фармакопейних вимогах до якості сировини. Хімічний склад в основному представлений терпеноїдами (цитраль, цитронелаль, гераніол, гераніаль та інші терпеноїди ефірної олії), а також сапонінами (урсолова і олеанолова кислоти), фенольними сполуками, серед яких похідні коричної кислоти, флавоноїдами (глікозиди лютеоліну і апігеніну) [8, 9, 12, 22]. Згідно з вимогами Європейської фармакопеї сировина повинна містити не менше 1% розмаринової кислоти [17].

Іншим компонентом, який не тільки культивується для потреб харчової промисловості, але й широко використовується як заспокійливий засіб та входить до складу седативних фітопрепаратів, є хміль звичайний [11, 18].

За даними літературних джерел у пазухах приквіткових і покривних лусок шишок хмелю у період технічної стиглості із зовнішнього боку з'являються лупулінові залозки, в яких утворюється жовтий смолистий порошок — лупулін. До його складу входить ефірна олія, основними компонентами якої є мірцен, гумулен, фарнезен, хлорогенова, неохлорогенова, валеріанова кислоти, флавонові глікозиди, кумарини, вітаміни групи В (В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>6</sub>), нікотинова кислота, різні гіркі речовини та інші органічні сполуки [2]. Якість рослинної сировини хмелю регламентується згідно зі статтею “Хмелю шишки” (*Lupuli flos*), яка наведена в Державній фармакопеї України (ДФУ) [7].

До числа перспективних ефіроолійних рослин седативної та заспокійливої дії слід також віднести ла-

ванду вузьколисту, квітки та суцвіття якої включені як офіційна сировина до фармакопей 16 країн світу [14, 19, 20]. Всі частини лаванди вузьколистої містять у своєму складі ефірну олію, основними компонентами якої є складні ефіри ліналоолу оцтової, масляної, валеріанової та капронової кислот. У квітках також знайдено урсолову кислоту, кумарини, флавоноїди, фенолкарбонати, жирні і органічні кислоти, дубильні речовини, каротиноїди та ін. [14].

#### Експериментальна частина

Для експериментальних досліджень використовували траву меліси лікарської (*Herba Melissa officinalis* L.) виробництва ЗАТ “Ліктрави” (м. Житомир, Україна, серії 60410), шишки хмелю звичайного (*Flos Humuli Lupuli* L.) виробництва ЗАТ “Ліктрави” (м. Житомир, Україна, серії 11052011) та суцвіття лаванди вузьколистої (*Flores Lavandulae angustifolia* Mill.), культивованої на території Державного Нікітського ботанічного саду УААН.

У ході експерименту ЛРС попередньо подрібнювали на роторному млині виробництва заводу “Спецтехобладнання”, м. Харків. Продуктивність млина складає 30-60 кг/год. Кількість ножів — 6 (4 — рухомих, 2 — нерухомих, з регулюючим зазором між ними, який складає  $0,4 \pm 0,01$  мм). Число обертів ротора — 600 об/хв.

Досліджувались суміші складу: 1) трава меліси та шишки хмелю; 2) трава меліси та суцвіття лаванди; 3) шишки хмелю та суцвіття лаванди; 4) трава меліси, шишки хмелю та суцвіття лаванди.

На першому етапі експериментальних досліджень методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) визначали наявність БАР у складі з вищезазначеної сировини. Для приготування сумішей використовували суху подрібнену сировину в однакових кількостях і готували екстракти, для чого 0,06 г подрібненої сировини поміщали в конічну колбу на 50 мл, додавали 5 мл 50% спирту етилового та екстрагували зі зворотним холодильником на киплячій водяній бані протягом 45 хв. Екстракт охолоджували, фільтрували і переносили у випарувальну чашку, упарювали на водяній бані до 0,5 мл. Потім додавали 2,5 мл води очищеної, залишок переносили в ділильну лійку, в яку додавали 5 мл етилацетату і струшували протягом 10 хв.

Верхній шар відокремлювали та упарювали у випарувальній чашці до сухого залишку, який потім розчиняли в 1,0 мл спирту етилового 50% і фільтрували через паперовий фільтр “синя стрічка”.

Для отримання сумішей одержані екстракти змішували у співвідношеннях 1:1 — для сумішей з двох компонентів або 1:1:1 — для суміші з трьох компонентів. Далі суміш екстрактів наносили на лінію старту хроматографічних пластинок з алюмінієвим типом підложки марки “Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ-254” виробництва ЗАТ “Сорбполімер”, м. Краснодар (Росія) за допомогою мікропіпеток смугами по 50 мкл. Поряд з цим на пластинки наносили стандартні зразки (СЗ) сполук-маркерів, які були підібрані за даними

літературних джерел згідно з хімічним складом рослинної сировини [2, 4, 9, 10, 13, 14, 20].

У ході досліджень використовували як взірцеві (еталонні) СЗ — Фармакопейний стандартний зразок (ФСЗ) ДФУ кверцетин (*Quercetin*) (серія 050107), ФСЗ ДФУ рутин (*Rutoside trihydrate*) (серія 121101), ФСЗ ДФУ кислоти хлорогенової гемігідрат (серія 140308), так і сполуки-маркери виробництва компанії “Sigma-Aldrich Chemie GmbH”, Німеччина: кислота розмаринова (*Rosmarinic acid-Fluka*) (серія 44699), ліналоол (*Linalool-Aldrich*) (серія L2602), ліналілацетат (*Linalyl acetate-Aldrich*) (серія W263605), мірцен (*Mircene-Fluka*) (серія 64643).

Хроматографічні пластинки просушували на повітрі протягом 5 хв і поміщали в хроматографічні камери з сумішшю розчинників: 1) бензол — *P* — етилацетат *P* — мурашина кислота *P* (40:10:5), 2) етилацетат *P* — толуол *P* (5:95) та 3) кислота оцтова безводна *P* — етилацетат *P* — циклогексан *P* (2:38:60). Хроматографування проводили висхідним способом до моменту, коли фронт розчинників проходив для системи елюентів №1 — 8 см від лінії старту, для системи №2 — 10 см від лінії старту двічі з інтервалом у 5 хв, та 15 см від лінії старту — для системи №3 [6, 7].

Після завершення розділення пластинки виймали з хроматографічної камери і висувували на повітрі. В якості розчинів для обприскування хроматограм у системі елюентів бензол — *P* — етилацетат *P* — мурашина кислота *P* (40:10:5) використовували наступну суміш реагентів: 0,4 г кислоти борної та 0,1 г кислоти лимонної вміщували у мірну колбу об’ємом 25 мл, додавали 15 мл води очищеної, ретельно перемішували і доводили 96% (об/об) спиртом до позначки. Після обприскування і нагрівання в сушильній шафі при температурі 5°C протягом 3 хв хроматограми переглядали в УФ-світлі за довжиною хвиль 365 нм або 254 нм.

Для обприскування хроматограм у системі етилацетат *P* — толуол *P* (5:95) як розчин-проявник використовували розчин анісового альдегіду *P*, після чого хроматограми нагрівали при температурі від 100°C до 105°C протягом 5-10 хв і відразу переглядали при денному світлі [6].

Виявлення хроматограм у системі кислота оцтова безводна *P* — етилацетат *P* — циклогексан *P* (2:38:60) проводили в УФ-світлі за довжини хвилі 254 нм та 365 нм. Після обприскування хроматограм фосфорномолібденово-вольфрамовим реактивом, розведеним *P*, витримували у парі аміаку та переглядали при денному світлі [7].

#### Результати та їх обговорення

Виходячи з результатів хроматографічних досліджень, слід зробити висновки про те, що у суміші трави меліси та шишок хмелю ідентифікувати компоненти можна за зоною, яка відповідає зоні розчинної СЗ кислоти розмаринової (трава меліси), та зонами, що відповідають зонам розчинів СЗ флавоноїдів (кверцетину) і ациклічного вуглеводня (монотерпену) мірцену (шишки хмелю) (рис. 1); у суміші тра-

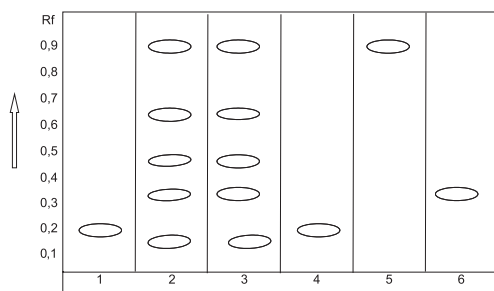


Рис. 1. ТШХ-ідентифікація суміші трави меліси та шишок хмелю: 1 — екстракт трави меліси; 2 — екстракт шишок хмелю; 3 — суміш екстрактів трави меліси та шишок хмелю; 4 — розчин С3 кислоти розмаринової; 5 — розчин С3 мірцену; 6 — розчин С3 кверцетину.

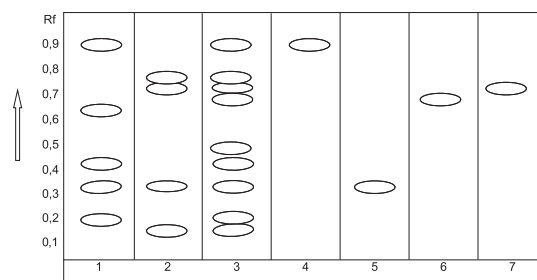


Рис. 3. ТШХ-ідентифікація суміші шишок хмелю та суцвіть лаванди: 1 — екстракт шишок хмелю; 2 — екстракт суцвіть лаванди; 3 — суміш екстрактів шишок хмелю та суцвіть лаванди; 4 — розчин С3 мірцену; 5 — розчин С3 кверцетину; 6 — розчин С3 ліналоолу; 7 — розчин С3 ліналілацетату.

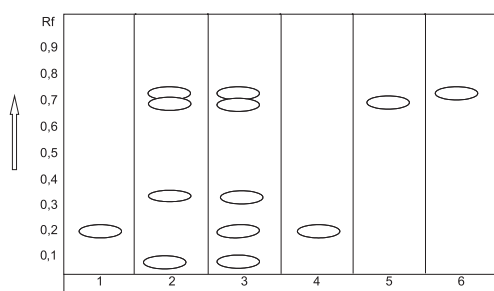


Рис. 2. ТШХ-ідентифікація суміші трави меліси та суцвіть лаванди: 1 — екстракт трави меліси; 2 — екстракт суцвіть лаванди; 3 — суміш екстрактів трави меліси та суцвіть лаванди; 4 — розчин С3 кислоти розмаринової; 5 — розчин С3 ліналоолу; 6 — розчин С3 ліналілацетату.

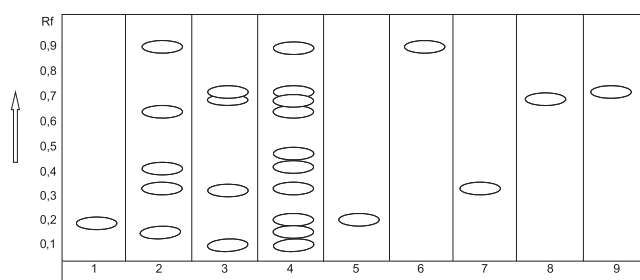


Рис. 4. ТШХ-ідентифікація суміші трави меліси, шишок хмелю та суцвіть лаванди: 1 — екстракт трави меліси; 2 — екстракт шишок хмелю; 3 — екстракт суцвіть лаванди; 4 — суміш екстрактів трави меліси, шишок хмелю та суцвіть лаванди; 5 — розчин С3 кислоти розмаринової; 6 — розчин С3 мірцену; 7 — розчин С3 кверцетину; 8 — розчин С3 ліналоолу; 9 — розчин С3 ліналілацетату.

ви меліси з суцвіттями лаванди компоненти можна ідентифікувати за наявністю зони, що відповідає зоні розчину С3 кислоти розмаринової (трава меліси), а наявність суцвіть лаванди — за зонами, що відповідають зонам розчину С3 ліналоолу та розчину С3 ліналілацетату (рис. 2).

У двокомпонентній суміші — шишки хмелю та суцвіття лаванди ідентифікувати компоненти можна за зонами, які характерні для розчину С3 кверцетину та розчину С3 мірцену (шишки хмелю), а суцвіття лаванди — за наявністю зон розчинів С3 ліналоолу та С3 ліналілацетату (рис. 3).

Ідентифікацію трикомпонентної суміші — трави меліси, шишок хмелю та суцвіть лаванди можна здійснити за зоною розчину С3 кислоти розмаринової (трава меліси), що відповідає зонам розчинів С3 мірцену і кверцетину (шишки хмелю), та зоною роз-

чину С3 ліналоолу і розчину С3 ліналілацетату (суцвіття лаванди) (рис. 4).

Отже, як було встановлено нами, методом ТШХ можливе здійснення ідентифікації меліси лікарської, хмелю звичайного та лаванди вузьколистої у складі трикомпонентної суміші рослинної сировини за наявності відповідних взірців сполук-маркерів, характерних для певного виду ЛРС, а також хроматографічних систем з достатньо ефективною роздільною здатністю.

#### ВИСНОВКИ

Методом ТШХ із застосуванням робочих стандартних зразків БАР та підбору ефективних хроматографічних систем визначено характерні для досліджуваної лікарської сировини сполуки-маркери, які дають можливість ідентифікувати мелісу лікарську, хмель звичайний та лаванду вузьколисту у сумішах з рослинної сировини.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Албаков А.Ю. Создание, технологические исследования и стандартизация многокомпонентных фитопрепаратов антистрессорного действия: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. — Пятигорск, 2004. — 20 с.
2. Берестова С.І., Ковальов В.М., Ковальов С.В., Комісаренко А.М. // Вісник фармації. — 2006. — №1 (45). — С. 22-25.
3. Бондаренко О.В. Розробка і стандартизація промислових технологій виробництва твердих лікарських форм на основі валеріани лікарської, м'яти перцевої і меліси: Автореф. дис. ... канд. фармац. наук. — Х., 2008. — 20 с.
4. Гудзенко А.В., Ковальчук Т.В., Цуркан О.О. // Фармац. журн. — 2009. — №1. — С. 130-135.
5. Дев'яткіна Т.О., Важнича М.О. // Ліки України. — 2000. — №1-2. — С. 44-50.

6. *Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”*. — 1-е вид. — Доп. 2. — Х.: Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”, 2008. — 620 с.
7. *Державна фармакопея України / Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”*. — 1-е вид. — Доп. 3. — Х.: Державне підприємство “Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2009. — 280 с.
8. Зузук Б.М., Куцик Р.В. // *Провизор*. — 2002. — №1. — С. 36-39.
9. Зузук Б.М., Куцик Р.В. // *Провизор*. — 2002. — №2. — С. 21-25.
10. Ковальчук Т.В., Цуркан О.О., Бурмака О.В. // *Фармац. журн.* — 2006. — №6. — С. 89-94.
11. Ліпкан Г.М. // *Фітотерапія в Україні*. — 2000. — №3-4. — С. 37-40.
12. Попова Н.В., Литвиненко В.І., Певнева О.І. // *Фармац. часопис*. — 2008. — №4. — С. 19-23.
13. Попова Н.В., Литвиненко В.І. // *Фармаком*. — 2009. — №2. — С. 45-50.
14. Солодовниченко Н.М. *Лаванда вузьколиста (Л. лікарська, Л. справжня, Л. колоскова) / Фармац. енциклопедія*. Гол. ред. та автор передмови В.П.Черних. — К.: МОПІОН, 2005. — 848 с.
15. Dimitrova Z., Manolova N., Pancheva S. et al. // *Acta Microbiol. Bulg.* — 1993. — Vol. 29. — P. 65-72.
16. Geuenich S., Goffinet C., Venzke S. et al. // *Retrovirol.* — 2008. — №5. — P. 27.
17. *European Pharmacopoeia*. — 6th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2007. — P. 4668-4670.
18. Fortes A.M., Testillano P.S. // *Physiol. Plant.* — 2002. — №116 (1). — P. 113-120.
19. Manushkina T.N., Bugaenko L.A. // *Bul. Nikit. Botan. Gard.* — 2009. — №99. — P. 115-118.
20. Pavlov A.I., Ilieva M.P., Panchev I.N. // *Biotechnol. Progr.* — 2000. — Vol. 16, №4. — P. 668-670.
21. *WHO monographs on selected medicinal plants*. — Vol. 2. — Geneva, 2002. — 356 p.
22. Wichtl M., Bisset N.G. *Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals*. — Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers, 1994. — 566 p.

УДК 615.322:615.453.2:543.544

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТРАВЫ МЕЛИССЫ, ШИШЕК ХМЕЛЯ И ЦВЕТКОВ ЛАВАНДЫ В СМЕСЯХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ МЕТОДОМ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ  
О.С.Шпичак

Разработаны методики идентификации травы мелиссы лекарственной, шишек хмеля обыкновенного и цветков лаванды узколистой в смесях из лекарственного растительного сырья методом ТСХ. С помощью рабочих стандартных образцов БАВ и подбора эффективных хроматографических систем определены характерные для исследуемого растительного сырья соединения-маркеры для их идентификации.

UDC 615.322:615.453.2:543.544

IDENTIFICATION OF MELISSA HERB, STROBILE HOPS AND LAVENDER FLOWERS IN MIXTURES FROM THE PLANT RAW MATERIAL BY THE TLC METHOD  
O.S.Shpychak

Methods of identification of melissa herb, strobile hops and lavender flowers in mixtures from the plant raw material have been developed by the TLC method. The specific compounds-markers for their identification have been determined for the plant raw material analyzed by working standard samples of BAS and selecting the effective chromatographic systems.