

# СИНТЕЗ ТА АНАЛІЗ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д.ф.н., професором О.П.Хворост

УДК 615.07:615.32:54.061/.062:543.42.062:547.587

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНОЛКАРБОНОВИХ КИСЛОТ У ПРЕПАРАТІ «АПІСЕД» МЕТОДОМ ДИФЕРЕНЦІАЛЬНОЇ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРІЇ

О.С.Шпичак, О.І.Тихонов

Національний фармацевтичний університет

Методом диференціальної УФ-спектрофотометрії розроблені методики та показана можливість здійснення ідентифікації та кількісного визначення фенолкарбонних кислот у траві меліси лікарської та шишках хмелю звичайного, що входять до складу комплексного апіфітопрепарату «АПІСЕД».

У теперішній час близько 40% усіх лікарських препаратів, які застосовуються у сучасній медицині, одержують з рослинного матеріалу. За своєю фармакологічною активністю рослинні лікарські засоби (РЛЗ) не поступаються синтетичним аналогам, а завдяки збалансованому комплексу біологічно активних речовин (БАР) сприятливо діють на організм людини практично без побічних ефектів [6].

У науковій медицині широкого застосування набули ефіроолійні рослини родини Губоцвітих (*Lamiaceae*) та Коноплиних (*Cannabaceae*), а саме: меліса лікарська (*Melissa officinalis* L.), лаванда вузьколиста (*Lavandula angustifolia* Mill.), хміль звичайний (*Humulus Lupulus* L.), до складу яких входить група ароматичних і терпеноїдних сполук, котрі обумовлюють широкий спектр фармакологічної дії ефірних олій [5].

До складу ефірної олії меліси входять терпеноїди: цитраль (до 60%), цитронелаль, мірцен, гераніол, гераніаль, ліналоол, цитронелол, цинеол та ін. [2, 8, 15, 16]. Трава меліси також містить фенолкарбонні кислоти та їх депсиди: кислоту кавову, її димер – кислоту розмаринову ( $\lambda_{\text{макс}}=326$  нм,  $A_{1\text{см}}^{1\%}=500$ ) та тримери – мелітринові кислоти А і В, а також депсид кавової та хінної кислот – кислоту хлорогенову ( $\lambda_{\text{макс}}=327$  нм,  $A_{1\text{см}}^{1\%}=531$ ) [2, 10, 19-21]. Методом ВЕРХ встановлено, що вміст кислоти розмаринової у листках меліси становить від 0,54 до 4,7% [2,12]. Крім того, в рослині ідентифіковані гідролізовані дубильні речовини [9], гіркоти, слизи, флавоноїди (апигенін, лютеолін та їх глікозиди, цинарозид, ізоквер-

цитрин), хлорофіли та тритерпенові (урсолова, олеанолова) кислоти [1].

Основними БАР, котрі обумовлюють фармакологічну активність шишок хмелю, є гіркоти (від 5 до 26%), поліфенольні сполуки (2-5%), а також ефірні олії (0,2-1,8%) [3]. Фенольні сполуки шишок хмелю представлені флавоноїдами, антоціанідинами, катехінами та фенолкарбонними кислотами, найбільша частина яких нагромаджується у листках суплідь хмелю [19].

Флавоноїди хмелю належать до різних хімічних груп – флавонів, ізофлавонів, флавонолів, флаванолів, флаванонів, халконів, антоціанідинів. Загальний вміст флавонолів (кверцетин, рутин –  $\lambda_{\text{макс}}=250-270$  нм,  $\lambda_{\text{макс}}=350-390$  нм) у перерахунку на рутин у шишках хмелю різного походження коливається в межах від 0,14 до 0,85% (залежно від маси абсолютно сухої речовини). Однак деякі автори стверджують, що основним флавоноїдом хмелю є ксантогумол, вміст якого складає 0,3-1% від сухої маси [3]. Крім того, в шишках хмелю ідентифіковані оксикоричні кислоти (неохлорогенова, хінна, кавова, ферулова –  $\lambda_{\text{макс}}=230-240$  нм,  $\lambda_{\text{макс}}=290-320$  нм) та фенолкарбонні кислоти (галола, бузкова, ванілінова, протокатехова –  $\lambda_{\text{макс}}=230-240$  нм,  $\lambda_{\text{макс}}=290-320$  нм), основним компонентом яких є кислота хлорогенова. Крім фенолкарбонних кислот, в шишках хмелю містяться й інші органічні кислоти (валеріанова, ізовалеріанова) [3].

За літературними даними лаванда вузьколиста містить ефірну олію, найбільша кількість якої нагромаджується у її суцвіттях (3,5-4,5%) [11]. У наземній частині рослини також містяться дубильні речовини (до 12%), смоли, гіркоти, герніарин. До складу ефірної олії лаванди входить біля 300 різних органічних сполук, головними з яких є: (-)-ліналілацетат (до 48%), який надає сировині приємного запаху конвалії, (-)-ліналоол (25-38%), терпінен-4-ол, лавандулілацетат, мірцен,  $\alpha$ -пінен, терпінен, лимонен, камфора, цинеол, борнеол, каріофілен, терпінілацетат,

терпінеол та інші компоненти (валеріановий альдегід, кумарин, валеріанова та масляна кислоти) [5, 13, 17].

У теперішній час нагромаджений величезний практичний досвід застосування ряду ефіроолійних РЛЗ для лікування захворювань дихальних шляхів, легких форм артеріальної гіпертензії, ішемічної хвороби серця, гострих та хронічних шлунково-кишкових захворювань, стресів, станів загального нервового збудження, неврозів, істерії, безсоння тощо, оскільки вони проявляють протизапальну, антимікробну, спазмолітичну, антиоксидантну, седативну, заспокійливу, антидепресантну та анксиолітичну стрессопротекторну дію [4, 16, 21].

#### Експериментальна частина

Стандартизація лікарських засобів рослинного походження має ряд особливостей, пов'язаних з багатоконпонентним складом біологічно активних речовин (БАР). Актуальними вважаються дослідження не лише якісного складу БАР, але й визначення їх кількісного вмісту в РЛЗ, оскільки від цього, в першу чергу, залежить за якою сполукою (маркером) або групою БАР слід здійснювати стандартизацію рослинної сировини та їх сумішей у багатоконпонентних фітопрепаратах.

Для стандартизації більшості видів ЛРС, у тому числі «Хмелю шишки» (*Lupuli flos*), Державна фармакопея України пропонує низку таких характеристик як властивості, ідентифікація (зовнішні ознаки, мікроскопія, тонкошарова хроматографія), а також ряд числових показників (випробувань), зокрема, на вміст екстрактивних речовин, втрати в масі при висушуванні, кількості загальної золи, сторонніх домішок та ін., яких не завжди достатньо для здійснення детального експрес-аналізу досліджуваної рослинної сировини та виключення можливості її фальсифікації.

Одним з перспективних методів стандартизації ЛРС та РЛЗ є визначення якісного складу та кількісного вмісту БАР доступним методом спектрофотометрії, який дозволяє не лише об'єктивно вирішити проблему ідентифікації сировини і фітопрепаратів, але також здійснити достатньо об'єктивну комплексну оцінку їх тотожності та якості.

Раніше нами був запропонований склад та розроблена технологія оригінального комплексного апіфітопрепарату седативної дії у формі капсул під умовною назвою «Апісед» для застосування у спортивній медицині, до складу якого увійшли: трава меліси лікарської, шишки хмелю звичайного, суцвіття лаванди вузьколистої та стандартизована субстанція меду натурального порошкоподібного (МНП) (ТУ У 15.8-02010936-001:2007).

Метою даного дослідження є опрацювання методик ідентифікації та кількісного визначення фенолкарбонових кислот (активних компонентів трави меліси, шишок хмелю) ЛРС капсул «Апісед» (оцінка якості та стандартизація) методом УФ-спектрофотометрії.

Для проведення експериментальних досліджень були використані наступні зразки ЛРС: трава меліси лікарської (*Herba Melissa officinalis L.*) (серія 60410)

виробництва ЗАТ «Ліктрави» (м. Житомир, Україна), шишки хмелю звичайного (*Flos Humuli Lupuli L.*) (серія 11052011) виробництва ЗАТ «Ліктрави» (м. Житомир, Україна), суцвіття лаванди вузьколистої (*Flores Lavandulae angustifolia Mill.*) культивованої на території Державного Нікітського ботанічного саду УААН, а також стандартизовану субстанцію МНП, отриману в умовах підприємства ЗАТ «Біолік» м. Харків.

У ході аналізу досліджувалась екстракція суми БАР діючих компонентів розробленого лікарського препарату «Апісед» водними розчинами спирту етилового різної концентрації (30-96%), яку здійснювали у класичному співвідношенні сировина – екстрагент (1:20) шляхом настоювання при постійному перемішуванні впродовж 2 год.

Точну наважку 0,245 г (середня маса) вмістимого капсул поміщали у конічну колбу на 50 мл, заливали 5 мл екстрагенту та екстрагували при постійному перемішуванні протягом 2 год. Витяжки фільтрували через паперовий фільтр «червона стрічка» у мірну колбу місткістю 50 мл і доводили об'єм витяжки екстрагентом до позначки. Аналогічно здійснювали екстракцію БАР для окремих зразків з трави меліси, шишок хмелю, суцвіття лаванди та МНП.

Паралельно екстрагували БАР з сумішей: шишок хмелю 0,06 г, суцвіття лаванди 0,060 г та субстанції МНП 0,065 г (суміш №1,  $m_{\text{н}}=0,185$  г); трави меліси 0,060 г, суцвіття лаванди 0,060 г та субстанції МНП 0,065 г (суміш №2,  $m_{\text{н}}=0,185$  г).

Для зважування використовували ваги лабораторні електронні 2-го класу точності марки АВ 204 «Mettler Toledo», Швейцарія (зав. №14281). Спектри знімали на спектрофотометрі «Specord 200» виробництва «Analytik Jena», Німеччина (зав. №222 U213).

Вміст фенолкарбонових кислот у водно-спиртових витяжках у перерахунку на кислоту хлорогенову розраховували за формулою:

$$w, \% = \frac{A}{A_{1\text{см}}^{1\%}} \cdot n,$$

де:  $w$  – вміст фенолкарбонових кислот у водно-спиртових витяжках, %;  $A$  – оптична густина;  $A_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник світлопоглинання кислоти хлорогенової;  $n$  – ступінь розбавлення.

#### Результати та їх обговорення

При вивченні електронних спектрів розчинів екстрактів спостерігали наявність характерних двох смуг поглинання з максимумами  $\lambda \approx 280$  нм та  $\lambda \approx 320$  нм, що вказує на присутність БАР класу фенолкарбонових кислот у досліджуваному препараті. На рис. 1 наведені УФ-спектри світлопоглинання суми екстрактивних речовин у витяжках досліджуваного препарату залежно від концентрації спирту етилового в екстрагенті, які показують, що найбільше світлопоглинання, а отже найвищий вміст екстрактивних речовин, спостерігається при використанні спирту етилового 50%.

З метою з'ясування можливості опрацювання методик здійснення ідентифікації та кількісного визна-

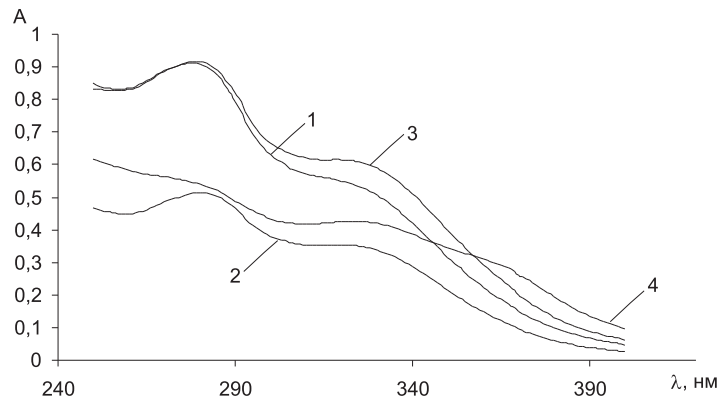


Рис. 1. УФ-спектр поглинання екстрактивних речовин витяжок діючих компонентів апіфітопрепарату «Апісед» залежно від вмісту спирту етилового в екстрагенті. 1 – 30% (1:100), 2 – 50% (1:200), 3 – 70% (1:100), 4 – 96% (1:25) (у дужках вказане розбавлення);  $m_n = 0,245$  г;  $V_{\text{спирту етилового}} = 5,0$  мл.

чення методом диференціальної УФ-спектрофотометрії БАР у витяжках досліджуваного препарату нами були зняті спектри поглинання розбавлених екстрагентом витяжок препарату стосовно розбавлених витяжок суміші №1 та паралельно за цих же умов спектри поглинання таким же чином розбавлених витяжок трави меліси. Диференціальний спектр світлопоглинання витяжки апіфітопрепарату «Апісед» стосовно витяжки суміші 1 (розбавлення 1:200, спирт етиловий 50%) наведений на рис. 2. Аналогічно на рис. 3 наведений спектр розбавлених екстрагентом витяжок препарату стосовно розбавленої витяжки суміші №2.

Експериментально встановлено, що отримані спектри витяжки препарату стосовно витяжок сумішей №1 і №2 та паралельно отримані спектри витяжок трави меліси і шишок хмелю є практично ідентичними.

Наявність у спектрах характерної для фенолкарбонових кислот смуги світлопоглинання ( $\lambda_{\text{макс}} = 326\text{-}327$  нм) свідчить про можливість здійснення ідентифікації та кількісного визначення фенолкарбонових кислот у досліджуваному препараті. Більше того, використовуючи як компенсаційні розчини витяжки сумішей №1 та №2, можна кількісно визначити вміст фенолкарбонових кислот у розробленому препараті «Апісед», які були внесені з травою меліси та шишками хмелю відповідно.

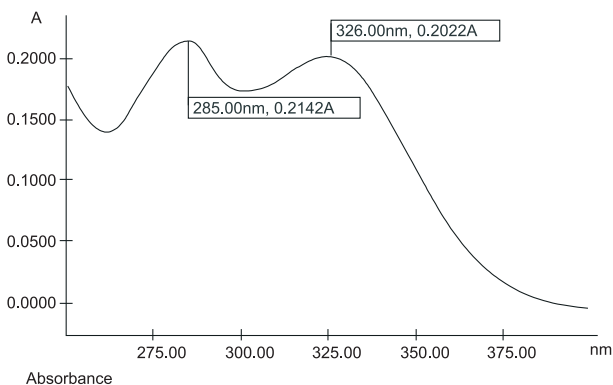


Рис. 2. Диференціальний спектр світлопоглинання досліджуваного апіфітопрепарату «Апісед» стосовно витяжки суміші №1. Розбавлення 1:200, спирт етиловий 50%.

Для трави *меліси лікарської* як спектральні маркери були обрані гідроксикоричні кислоти. В одержаних спектрах витяжок з трави меліси, а також спектрах сумішей №2, №3, які містили траву меліси, та спектрах досліджуваного препарату на ділянці 318-326 нм спостерігали характерні смуги поглинання гідроксикоричних кислот та їх гідроксицианових похідних.

**Методика кількісного визначення вмісту гідроксикоричних кислот.** Досліджувану витяжку (1,00 мл) поміщали у мірну колбу на 200 мл, об'єм доводили до позначки спиртом етиловим 50% та ретельно перемішували. Оптичну густина одержаного розчину вимірювали при довжині хвилі 327 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння витяжку суміш №1.

Вміст суми гідроксикоричних кислот у досліджуваному препараті у відсотках у перерахунку на кислоту хлорогенову обчислювали, використовуючи значення питомого показника поглинання кислоти хлорогенової при довжині хвилі 327 нм ( $A_{1\%}^{1\text{см}} = 515$ ).

Методом диференціальної УФ-спектрофотометрії встановлено, що вміст фенолкарбонових кислот у витяжках шишок хмелю звичайного у перерахунку на кислоту хлорогенову складає 0,034%, а у витяжках трави меліси лікарської – 0,086%. Загальний вміст фенолкарбонових кислот у складі досліджуваного апіфітопрепарату «Апісед» становить 0,12%.

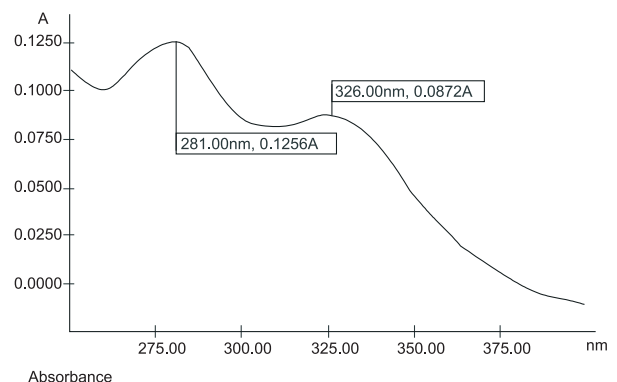


Рис. 3. Диференціальний спектр світлопоглинання досліджуваного апіфітопрепарату «Апісед» стосовно витяжки суміші №2. Розбавлення 1:200, спирт етиловий 50%.

Крім того, за характерними смугами поглинання можливе здійснення ідентифікації гідроксикоричних кислот у витяжках досліджуваного препарату ( $\lambda_{\text{макс}}=326\pm 1$  нм,  $A_{1\text{см}}^{1\%}=515$ ).

#### ВИСНОВКИ

1. Методом диференціальної УФ-спектрофотометрії здійснене кількісне визначення гідроксикоричних кислот трави меліси та шишок хмелю у водно-спиртових витяжках з ЛРС та у складі капсул досліджуваного апіфітопрепарату «Апісед». Вміст

гідроксикоричних кислот у витяжках шишок хмелю звичайного у перерахунку на кислоту хлорогенову складає 0,034%, а у витяжках трави меліси лікарської – 0,086%. Вміст гідроксикоричних кислот в розробленому апіфітопрепараті «Апісед» становить 0,12%.

2. За характерними смугами поглинання на ( $\lambda_{\text{макс}}=326\pm 1$  нм,  $A_{1\text{см}}^{1\%}=515$ ) можливе здійснення ідентифікації гідроксикоричних кислот у витяжках з ЛРС препарату «Апісед».

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Болтабекова З.В. Фармакогностическое исследование по стандартизации новых лекарственных средств на основе травы Melissa officinalis L.: Автореф. дис. ... канд. фармацевт. наук. – М., 2003. – 25 с.
2. Зузук Б.М., Куцук Р.В. // Провизор. – 2002. – №1. – С. 36-39.
3. Зузук Б.М., Куцук Р.В. // Провизор. – 2004. – №13. – С. 28-31.
4. Куркин В.А., Дубищев А.В., Ежков В.Н., Титова И.Н. // Растительные ресурсы. – 2007. – №3 (43). – С. 131-139.
5. Назаренко Л.Т., Бугаенко Л.А. Эфиромасличные, пряноароматические и лекарственные растения. – Симферополь: Таврия, 2003. – 202 с.
6. Натуральные антибиотики. Защита организма без побочных эффектов / Пер. с нем. Ю.Ю.Зленко. – М.: ООО ТД. Мир книги, 2008. – 160 с.
7. Попова Н.В., Литвиненко В.И. // Фармаком. – 2009. – №2. – С. 45-50.
8. Попова Н.В., Литвиненко В.И., Певнева О.И. // Фармац. часопис. – 2008. – №4. – С. 19-23.
9. Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И., Рябинин С.В. // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2009. – №2. – С. 49-53.
10. Agata I., Kusakabe H., Hatano T. et al. // Chem. Pharm. Bull. – 1993. – Vol. 41. – P. 1608-1611.
11. Cavanagh H.M.A., Wilkinson J.M. // J. Phyto Res. – 2002. – Vol. 16. – P. 301-308.
12. European Pharmacopoeia. – 6-th ed. – Strasbourg: Council of Europe, 2007. – P. 4668-4670.
13. Heuberger E., Redhammer S., Buchbauer G. // Neuropsychopharmacol. – 2004. – Vol. 29. – P. 1925-1932.
14. Kloeti F., Christen P., Kapetanidis I. // Fresenius' Z. Anal. Chem. – 1985. – Vol. 321. – №4. – P. 352-354.
15. Koch-Heitzmann I., Schultze W. // Z. Phytotherapie. – 1988. – Vol. 9 (3). – P. 77-85.
16. Leng-Peschlov E., Strenge-Hesse A. // Z. Phytotherapie. – 1991. – Vol. 11, №2. – P. 50-58.
17. Lis-Balchin Maria. Aromatherapy Science: A guide for healthcare professionals. – London-Chicago: Pharmaceutical Press, 2006. – 462 p.
18. Maegawa Y., Sugino K., Sakurai H. // Free Radic. Res. – 2007. – Vol. 41 (1). – P. 110-119.
19. Stevenson P.C., Aslam S.N. // Bioactive Natural Products (Part M). – 2006. – Vol. 33. – P. 905-956.
20. Toth J., Mrljanova M., Tekelova D., Korenova M. // Acta Facult. Pharm. Univ. Comeniana. – 2003. – Vol. 50. – P. 139-146.
21. Wagner H. Pharmazeutische Biologie. 5 Aufgabe. 2. Drogen und ihre Inhaltsstoffe. – Stuttgart – New York: Gustav Fischer Verlag, 1993. – 522 S.

УДК 615.07:615.32:54.061/062:543.42.062:547.587

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕНОЛКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ В ПРЕПАРАТЕ «АПИСЕД» МЕТОДОМ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ

О.С.Шпичак, А.И.Тихонов

Методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии разработаны методики и показана возможность осуществления идентификации и количественного определения фенолкарбонических кислот в траве Melissa officinalis L. и шишках хмеля обыкновенного, входящих в состав комплексного апифитопрепарата «АПИСЕД».

UDC 615.07:615.32:54.061/062:543.42.062:547.587

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF PHENOLCARBONIC ACIDS IN «APISED» MEDICINE BY THE METHOD OF DIFFERENTIAL UV-SPECTROPHOTOMETRY

O.S.Shpychak, O.I.Tikhonov

By differential UV-spectrophotometry the methods have been developed and the possibility of identification and quantitative determination of phenolcarboxylic acids in melissa herb medicinal and strobile hops included in the composition of the complex apiphytodrug «APISED».