

Рекомендована д.ф.н., професором О.І.Тихоновим

УДК 615.451.16:616.233-002:543.544

## ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ НАСТОЙКИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ОРГАНІВ ДИХАННЯ

Л.І.Вишневська

Національний фармацевтичний університет

Методами паперової і тонкошарової хроматографії та якісними реакціями доведено наявність у настоянках кореневищ айру, кореневищ і коренів оману, коренів алтеї, коренів солодки, квіток липи, квіток бузини чорної, квіток нагідок, квіток ромашки, листя кропиви, листя м'яти перцевої, листя шавлії та трави чебрецю, а також у настоянці складній "Бронхофіт" таких класів сполук як полісахариди, флавоноїди, кумарини та терпеноїди. Отримані результати використані при розробці нормативної аналітичної документації на настойку складну "Бронхофіт".

Об'єктами дослідження стали настойка складна "Бронхофіт" та настойки кореневищ айру, кореневищ і коренів оману, коренів алтеї, коренів солодки, квіток липи, квіток бузини чорної, квіток нагідок, квіток ромашки, листя кропиви, листя м'яти перцевої, листя шавлії та трави чебрецю, отримані за відповідною методикою [4].

### Матеріали та методи

Для встановлення якісного складу біологічно активних речовин у обраних об'єктах використовували загальноприйняті методи досліджень — якісні реакції, паперову (ПХ) та тонкошарову хроматографію (ТШХ) [1, 6, 9, 15].

### Результати та їх обговорення

Для визначення наявності класу полісахаридів настойки упарювали до водного залишку та додавали трикратну кількість 96% етанолу. У всіх настоянках утворювався аморфний осад, що свідчить про наявність в сировині та настоянках полісахаридів. З огляду на відхаркувальну та муколітичну активність складної настойки "Бронхофіт" ця якісна реакція була використана для ідентифікації полісахаридів та було запропоновано контролювати їх кількісний вміст при розробці аналітичної нормативної документації на лікарський засіб [9].

Гідроксикоричні кислоти вивчали двомірною ПХ в системах н-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2) та 15% оцтова кислота з вірогідним зразком хлорогенової кислоти ("Sigma Chemical Company", США) та методом ТШХ в системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна —

вода (14:1:1:1). Настоянки упарювали до водного залишку та фракціонували етилацетатом. Для хроматографування використовували етилацетатні фракції отриманих водних залишків настоянок. Сполучки етилацетатної фракції на хроматограмі дають позитивну реакцію з розчином хлориду заліза (III), що свідчить про їх фенольну природу. Сіро-зелений колір, який утворюється при цьому, доводить присутність у молекулах ортодіоксигрупи. З розчином бромкрезолового зеленого дані сполучки утворюють синьо-зелене забарвлення, що підтверджує їхню кислотну природу. При хроматографуванні речовини етилацетатної фракції мають в УФ-світлі блакитне забарвлення різної інтенсивності, яке підсилюється або змінюється на зелено-блакитне під дією парів аміаку. Це характерно для похідних коричної кислоти [1, 9, 11, 14]. Таким чином, у настоянках було ідентифіковано не менше 3 похідних гідроксикоричної кислоти, у тому числі хлорогенову кислоту (рис. 1.)

Для виявлення кумаринових сполук спиртоводні залишки настоянок фракціонували ефіром. Отримані ефірні витяжки хроматографували на папері в системах хлороформ (формамід 25%), гексан (формамід 25%) та на пластинках Silicagel 60 F 254 (Merck) у системі бензол — етилацетат (3:2). При перегляді хроматограм у фільтрованому УФ-світлі та обробці 10% спиртовим розчином калію гідроксиду та діазореактивом виявлено не менше 4 речовин кумаринової природи (рис. 2), дві з котрих були ідентифіковані як скополетин ( $R_f = 0,6$ ) та умбеліферон ( $R_f = 0,3$ ).

Для диференціації виявлених речовин кумаринової природи від похідних коричної кислоти нами була проведена реакція відщеплення різних замісників у кумариновому ядрі йодистоводневою кислотою в середовищі рідкого фенолу та оцтового ангідриду [2, 10, 17, 18]. Для цього ефірні витяжки упарювали до видалення розчинників, а залишок змішували з 3 мл суміші, що складається з кислоти йодистоводневої, рідкого фенолу та оцтового ангідриду, взятих у співвідношенні (6:1:1). Колбу зі зворотним холодильником нагрівали на гліцериновому огрівнику до 130-135°C протягом

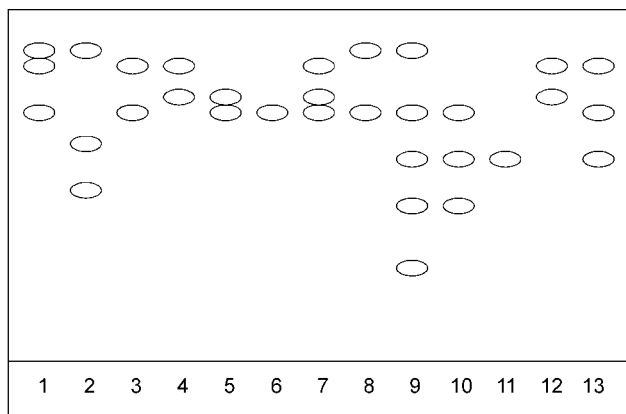


Рис. 1. Схема хроматограми гідроксикоричних кислот настойки складної "Бронхофіт" (1), настоек кореневищ айру (2), кореневищ і коренів оману (3), коренів алтеї (4), солодки (5), квіток липи (6), бузини чорної (7), нагідок (8), ромашки (9), листя кропиви (10), м'яти перцевої (11), шавлії (12) та трави чебрецю (13) у системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1).

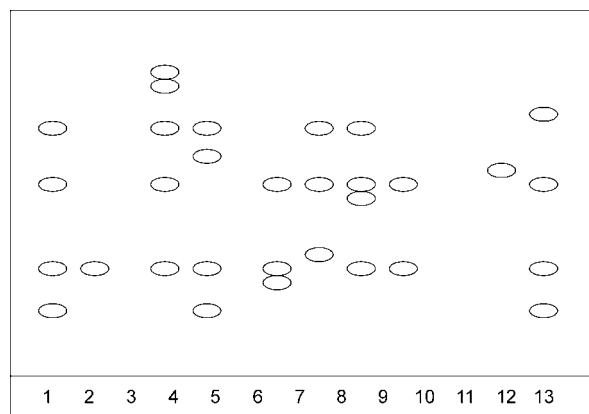


Рис. 2. Схема хроматограми кумаринів настойки складної "Бронхофіт" (1), настоек кореневищ айру (2), кореневищ і коренів оману (3), коренів алтеї (4), солодки (5), квіток липи (6), бузини чорної (7), нагідок (8), ромашки (9), листя кропиви (10), м'яти перцевої (11), шавлії (12) та трави чебрецю (13) у системі бензол-етилацетат (3:2).

2 год. Реакційну суміш охолоджували, розбавляли водою до об'єму 50 мл, переносили в ділильну лійку, обробляли етилацетатом 2 рази по 0,1 мл і хроматографували на папері в системі гексан (формамід 25%) паралельно з достовірним зразком кумарину. Після хроматографування хроматограму висушували і обробляли 10% спиртовим розчином калію гідроксиду і дивилися в УФ-світлі. При цьому виявлена пляма з блакитно-зеленою флуоресценцією, яка збігається за значенням  $R_f$  і кольором флуоресценції з достовірним зразком кумарину ("Sigma Chemical Company", США) та свідчить про присутність у дослідній сировині речовин кумаринової природи [2, 3, 13, 18].

Наявність флавоноїдів визначали у водно-спиртових настойках за допомогою загальновідомих якісних реакцій: ціанідинова проба за Бріантом, реакції з 3% розчином хлориду заліза. За результатами реакцій робили висновок про присутність глікозидів флавоноїдної природи [1, 7, 11, 9].

Крім того, речовини флавоноїдної природи виявляли ПХ етилацетатних фракцій настоек у класичних системах н-бутанол — оцтова кислота — вода (4:1:2) та хлороформ — оцтова кислота — вода (13:6:2) та ТШХ у системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1). Наявність даної групи сполук виявляли за флуоресценцією в УФ-світлі до і після обробки хроматограм парами аміаку та спиртовим розчином алюмінію хлориду. Встановлено, що в настойках міститься не менше 4 сполук флавоноїдної природи.

Хроматографічний аналіз індивідуальних настоек та складної настойки "Бронхофіт" показав, що система етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1) забезпечує кращий поділ речовин флавоноїдної природи, ніж класичні системи, тому ця система була обрана для проведення ідентифікації флавоноїдів у

лікарському засобі "Бронхофіт". Результати хроматографування наведені в табл. 1 та на рис. 3.

При хроматографуванні зі стандартними зразками встановлено, що речовина 1 з  $R_f = 0,3$  відповідає рутину, а речовина з  $R_f = 0,6$  — гіперозиду. Аналогічно речовина 1 була виявлена в настойках квіток липи та бузини чорної, а речовина 2 — в настойках коренів солодки та квіток бузини чорної.

Крім того, у настойці "Бронхофіт" було ідентифіковано ще 3 речовини флавоноїдної природи з  $R_f = 0,75$ ; 0,5; 0,4 відповідно. Аналогічні речовини були ідентифіковані в індивідуальних настойках квіток бузини чорної, липи, нагідок, ромашки, коренів солодки та листя шавлії.

Для ідентифікації флавоноїдів запропоновано використовувати метод ТШХ в системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1). У якості речовин-свідків застосовують розчини гіперозиду та рутину. На стадії пробопідготовки проводять екстракцію флавоноїдів етилацетатом. На хроматограмі розчину настоек "Бронхофіт" мають виявлятися: зона коричневого кольору на рівні зони на хроматограмі розчину гіперозиду і зона коричневого кольору на рівні зони на хроматограмі розчину рутину.

При розробці складу настоек "Бронхофіт" ми використовували декілька видів ефіроолійних рослин: айр, липу, оман, м'яту перцеву, ромашку, чебрець та шавлію, тому нами було проведено ідентифікацію терпеноїдів у складі настоек [12, 16]. Для цього з водних залишків настоек отримували хлороформні витяжки, відганяли розчинник, розчиняли в спирті та методом ТШХ хроматографували їх у системі розчинників бензол — етилацетат — 96% спирт етиловий (75:5:0,5). Детектування проводили за допомогою сірчанокислого розчину при нагріванні [9]. Результати хроматографування наведені в табл. 2.

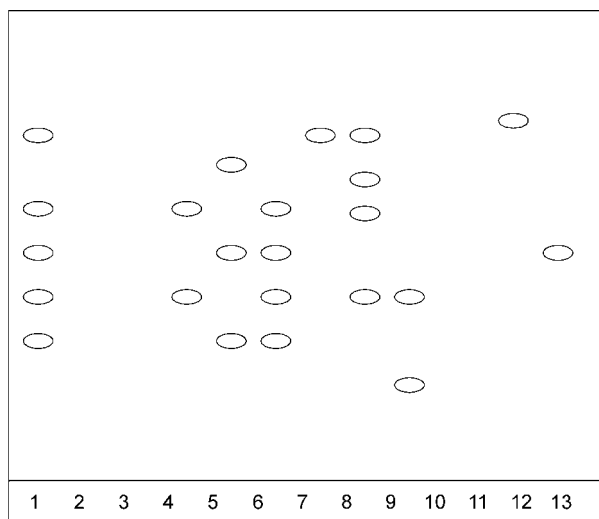


Рис. 3. Схема хроматограми флавоноїдів настойки складної "Бронхофіт" (1), настоек кореневищ айру (2), кореневищ і коренів оману (3), коренів алтеї (4), солодки (5), квіток липи (6), бузини чорної (7), нагідок (8), ромашки (9), листя кропиви (10), м'яти перцевої (11), шавлії (12) та трави чебрецю (13) у системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1).

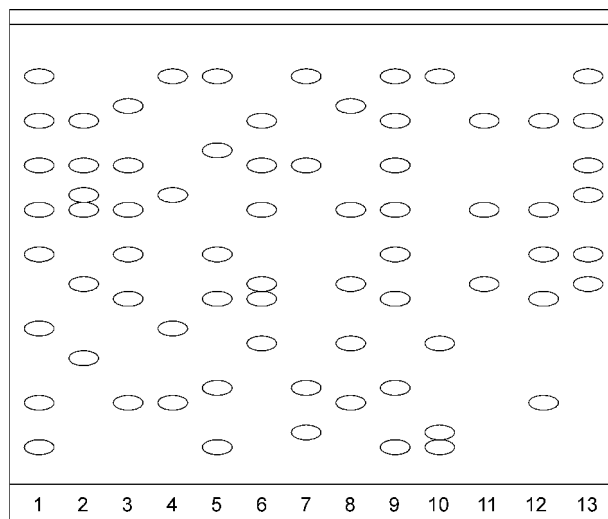


Рис. 4. Схема хроматограми терпеноїдів настойки складної "Бронхофіт" (1), настоек кореневищ айру (2), кореневищ і коренів оману (3), коренів алтеї (4), солодки (5), квіток липи (6), бузини чорної (7), нагідок (8), ромашки (9), листя кропиви (10), м'яти перцевої (11), шавлії (12) та трави чебрецю (13) у системі бензол — етилацетат — 96% спирт етиловий (75:5:0,5).

На хроматограмі (рис. 4) настойки складної "Бронхофіт" виявились зони темно-фіолетового кольору з  $R_f = 0,9$  (аналогічні плями виявились на хроматограмах індивідуальних настоек квіток бузини чорної, ромашки, коренів солодки та трави чебрецю), зони коричневого кольору з  $R_f = 0,8$  (аналогічна пляма — на хроматограмі індивідуальної настоек квіток ромашки), зони темно-фіолетового кольору з  $R_f = 0,7$  (аналогічні плями — на хроматограмах індивідуальних настоек кореневищ та коренів оману, кореневищ айру, квіток липи, бузини, ромашки та трави чебрецю), з  $R_f = 0,6$  (аналогічні плями — на хроматограмах індивідуальних настоек кореневищ айру, оману, квіток липи, нагідок, ромашки, листя м'яти перцевої та шавлії), з

$R_f = 0,5$  (аналогічні плями — на хроматограмах індивідуальних настоек кореневищ та коренів оману, квіток ромашки, коренів солодки, трави чебрецю та листя шавлії), з  $R_f = 0,35$  (аналогічні плями — на хроматограмах індивідуальних настоек коренів алтею та листя кропиви), з  $R_f = 0,2$  (аналогічні плями — на хроматограмах індивідуальних настоек коренів алтею, кореневищ та коренів оману, квіток нагідок та листя шавлії), зони рожевого кольору з  $R_f = 0,1$  (аналогічна пляма — на хроматограмі індивідуальної настоек коренів солодки).

Оскільки терпеноїди забезпечують антисептичну, спазмолітичну, відхаркувальну дію [12, 5, 11, 16], підвищують секреторну функцію бронхів, що має велике значення для загального терапевтич-

Таблиця 1

Результати хроматографії індивідуальних настоек та складної настоек "Бронхофіт" у системі етилацетат — кислота мурашина — кислота оцтова льодяна — вода (14:1:1:1)

Сировина	Значення R <sub>f</sub>																				
	Фініш	0,95	0,9	0,85	0,80	0,75	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	Старт
“Бронхофіт”		син	син	бл	син	т			т		т		т		т						
Кореневища айру	ж	син				сір		бл													
Корені алтеї			сз	син																	
Квітки липи					син						т				т						
Квітки бузини чорної			бл	син		жз			т		т		т		т						
Кореневища та корені оману	ж		бл		бл																бл
Квітки нагідок	ж	син			син	т															
Листя кропиви	чр				син		бл		син		сз	сз	ж				жз				
Листя м'яти перцевої							бл														
Квітки ромашки	т	син			ф	т	бл	т	т		бл		т								
Корені солодки	ж			бл	ф				т				т								
Трава чебрецю	ж	т	бл		ф		бл				ж										
Листя шавлії	чр		син	бл	т																

Примітки: ж — жовта, т — темна; син — синя; сір — сіра; сз — синьо-зелена; жз — жовто-зелена; ф — фіолетова; бл — блакитна; чр — червона плями.

Таблиця 2

Результати хроматографії індивідуальних настоек та складної настойки “Бронхофіт” у системі бензол — етилацетат — спирт 96% (75:5:0,5)

Сировина	Значення R <sub>f</sub>																				
	Фініш	0,95	0,9	0,85	0,80	0,75	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,25	0,2	0,15	0,1	0,05	старт
“Бронхофіт”			тф		кор		тф		тф		тф			тф			тф		р		
Кореневища айру					тф		тф	тф	тф			тф			тф						
Корінь алтеї			тф					тф						тф			тф				
Квітки липи					тф		тф		тф			тф	тф		тф				.		
Квітки бузини чорної			тф				тф									тф		тф	ж		
Кореневища та корені оману				тф			тф		тф		тф		тф				тф				
Квітки нагідок				тф					тф			тф			тф		тф				
Листя кропиви			тф											тф				тф	тф		
Листя м'яти перцевої					тф				тф			тф									
Квітки ромашки			тф		кор		тф		тф		тф		тф			тф		ж	тф		
Корінь солодки			тф			тф					тф		тф			тф	жг	тф	р		
Трава чебрецю			тф		тф		тф	тф			тф	тф						б			
Листя шавлії					тф				тф		тф		тф				тф				

Примітки: тф — темно-фіолетовий, кор — коричневий, р — рожевий, жг — жовтогарячий, ж — жовтий, б — бордовий кольори плям після проявлення розчином сірчаної кислоти.

ного ефекту складної настойки “Бронхофіт”, то при проведенні стандартизації препарату потрібно проводити ідентифікацію терпеноїдів.

Для цього нами запропоновано використовувати метод ТШХ хлороформних витяжок препарату у системі розчинників бензол — етилацетат — 96% спирт етиловий (75:5:0,5). У якості речовини-свідка використовують хлороформну витяжку з кореневищ з коренями оману, відносно якої описують розташування зон терпеноїдів. Детектування проводять за допомогою сірчано-кислого розчину при нагріванні. На хроматограмі розчину препарату мають виявлятися зона темно-фіолетового кольору на рівні зони на хроматограмі розчину порівняння оману з  $R_f$  близько 0,7 (сесквітерпеноїди оману), зона коричневого кольору з  $R_f$  близько 0,8 (терпеноїди ромашки), зона рожевого кольору з  $R_f$  близько 0,1 (терпеноїди солодки).

Таким чином, попередні хімічні дослідження показали, що настойка “Бронхофіт” містить по-

лісахариди, флавоноїди, терпеноїди, кумарини та гідроксикоричні кислоти. Виходячи з кількісного вмісту вказаних класів сполук за інтенсивністю плям та їх впливу на загальний фармакологічний ефект настойки, ми пропонуємо проводити ідентифікацію настойки складної “Бронхофіт” за наявністю терпеноїдів, флавоноїдів та полісахаридів.

#### ВИСНОВКИ

1. Вивчено якісний склад настойки “Бронхофіт” для лікування органів дихання.

2. Методами паперової та тонкошарової хроматографії, а також якісними реакціями доведено наявність у настоянках з лікарської рослинної сировини, що входить до складу настойки складної “Бронхофіт”, і у самій настойці таких класів сполук як полісахариди, флавоноїди, кумарини та терпеноїди.

3. Отримані результати використані нами при розробці нормативної аналітичної документації на настойку складну “Бронхофіт”.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Блажей А., Шутий Л. Фенольные соединения растительного происхождения. — М.: Мир, 1977. — 240 с.
2. Гиоргобиани Э.Д., Комиссаренко Н.Ф. Действие йодистоводородной и хлористоводородной кислот на природные кумарины // Сообщ. АН ГрССР. — 1969. — Т. 32, №2. — С. 265-268.
3. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И., Козаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. — Ростов: Изд-во Ростовского ун-та, 1988. — 131 с.
4. Державна фармакопея України / Державне підприємство “Науково-експертний фармакопейний центр”. — 1-е вид. — Х.: РІРЕГ, 2001. — 556 с.
5. Ковальов В.М., Павлій О.І., Ісакова Т.І. та ін. Фармакогнозія з основами біохімії рослин. — Х.: Прапор, 2000. — С. 350, 357, 638.
6. Лабораторное руководство по хроматографическим и смежным методам анализа: В 2-х ч. / Под ред. О.Микеша. — М.: Мир, 1982. — 781 с.
7. Лазуревский Г.В., Терентьева И.В., Шампури А.А. Практические работы по химии природных соединений. — М.: Высш. шк., 1996. — 335 с.
8. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. — Воронеж, 2004. — 527 с.
9. Хефтман Э., Кастер Т., Нидервизер А. и др. Хроматография. Практическое приложение метода: В 2-х ч., ч. 1. — М.: Мир, 1986. — 422 с.

10. Anesini C., Werner S., Borda E. // *Fitoterapia*. — 1999. — Vol. 70, №4. — P. 350-367.
11. Bicchi C., Brunelli C., Cordero C. et al. // *J. Chromatogr. A*. — 2004. — Vol. 1024, №1-2. — P. 190-207.
12. *European Pharmacopoeia*. — 4-th ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2002. — 2416 p.
13. Hachiya A., Ohuchi A., Kitahara T., Takema Y. // *Biol. Pharm. Bull.* — 2002. — Febr. — Vol. 25. — P. 229-234.
14. Kolhir V.K., Bykov V.A., Teselkin Yu.O. et al. // *Phytother. Res.* — 1998. — Vol. 12, №6. — P. 606-608.
15. *Quality method for medical plant materials* / World Health Organization. — Geneva, 1998. — 115 p.
16. Stuhlemmer U. // *Z. Phytother.* — 2003. — Vol. 24. — №3. — P. 120-218.
17. Theiss B., Theiss P. *The Family Herbal*. — Rochester, Vermont: Healing arts press, 1999. — 281 p.
18. *Urtica: therapeutic and nutritional aspects of stinging nettles* / Ed. by Gulsei Kavalali. — London, New York: Taylor&Francis Group, 2003. — 83 p.
19. *WHO monographs on selected medicinal plants*. — Geneva: World Health Organization, 2002. — Vol. 2. — 357 p.

---

УДК 615.451.16:616.233-002:543.544

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАСТОЙКИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ

Л.И.Вишневская

Методами бумажной и тонкослойной хроматографии, а также качественными реакциями доказано наличие в настойках корневищ аира, корневищ и корней девясила, корней алтея, корней солодки, цветков липы, цветков бузины черной, цветков календулы, цветков ромашки, листьев крапивы, листьев мяты перечной, листьев шалфея и травы чабреца, а также в настойке сложной “Бронхофит” таких классов соединений как полисахариды, флавоноиды, кумарины и терпеноиды. Полученные результаты использованы нами при разработке нормативной аналитической документации на настойку сложную “Бронхофит”.

---

UDC 615.451.16:616.233-002:543.544

IDENTIFICATION AND CHROMATOGRAPHIC INVESTIGATION OF THE TINCTURE FOR TREATING RESPIRATORY ORGANS

L.I.Vishnevskaya

The presence in the tinctures of *Acorus calamus* rhisomes, *Inula* rhizomes and roots, *Althaea* roots, *Glycyrrhiza* roots, *Tilia* flowers, *Sambucus nigra* flowers, *Calendula* flowers, *Chamomilla* flowers, *Urtica* leaves, *Mentha piperita* leaves, *Salvia officinalis* leaves and *Thymus* grass have been proven by the methods of paper and thin-layer chromatography, as well as by means of qualitative reactions. The “Bronkhofit” complex tincture has been proven to possess such groups of compounds as polysaccharides, flavonoids, coumarins and terpenoids. The results obtained were used while developing normative and analytical documentation for “Bronkhofit” complex tincture.