



УДК 615.014.07:443.631.22:615.446:15:481.928.4

DEVELOPMENT OF A METHODOLOGY FOR DETERMINING THE QUALITATIVE COMPOSITION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN CREEPING THYME GRASS BY THE METHOD OF HIGHLY EFFECTIVE LIQUID CHROMATOGRAPHY AFTER PRELIMINARY HYDROLYSIS
РОЗРОБКА МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ТРАВІ ЧЕБРЕЦЮ ПОВЗУЧОГО МЕТОДОМ ВИСОКОЕФЕКТИВНОЇ РІДИННОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ПІСЛЯ ПРОВЕДЕННЯ ПОПЕРЕДНЬОГО ГІДРОЛІЗУ

Zarivna N.O. / Зарівна Н.О.

c.pharm.s., as.prof. / к.фарм.н., доц.

ORCID: 0000-0002-8522-4024

Horlachuk N.V. / Горлачук Н. В.

c.pharm.s., as.prof. / к.фарм.н., доц.

ORCID: 0000-0003-3575-6652

Horbachevsky Ternopil national medical university, Ternopil, Ruska, 36, 46000
Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського,
Тернопіль, Руська, 36, 46000

Анотація. В роботі представлено розробку методики визначення якісного складу флавоноїдів і фенолкарбонових кислот у траві чебрецю повзучого методом високоефективної хроматографії після проведення попереднього гідролізу. Попередніми нашими дослідженнями, було встановлено наявність фенольних сполук у сировині чебрецю повзучого методом тонкошарової хроматографії, в результаті якої обрано оптимальну систему розчинників із найкращою розділювальною здатністю (хлороформ – метанол – метилетилкетон – ацетилацетон 70:10:5:1). Це вказує на доцільність застосування даної системи розчинників в якості рухомої фази при ТШХ-аналізі, саме флавоноїдів-агліконів (лютеолін, апігенін, мірицитин, кверцетин, кемпферол, ізорамнетин). Крім того, вивчено нами, також метод високоефективної хроматографії (ВЕРХ) до проведення попереднього гідролізу для ідентифікації фенольних сполук чебрецю повзучого (ЧП). В результаті чого, встановлено наявність у ньому флавоноїдів, зокрема, рутину, гіперозиду, лютеолін-7-О-глюкозиду, апігенін-7-О-глюкозиду й одного глікозиду лютеоліну невідомого складу. З фенолкарбонових кислот виявлено: кофейну, хлорогенову та розмаринову кислоти. Для належного вибору ідентифікаційних маркерів якості при проведенні стандартизації сировини ЧП, необхідно дослідити якісний склад фенольних сполук, також, після проведення попереднього гідролізу, тому потрібно розробити методику їх ідентифікації методом ВЕРХ (після гідролізу) для підбору ідентифікаційних маркерів якості досліджуваної сировини.

Ключові слова: чебрець повзучий, фенольні сполуки, високоефективна рідинна хроматографія, стандартизація.

Вступ. У фармакотерапії захворювань бронхолегеневої системи важливе місце займають рослинні лікарські засоби (ЛЗ), які проявляють протизапальну, муколітичну та протикашлеву дію, що зумовлені комплексом біологічно активних речовин (БАР) відповідних рослин (чебрець повзучий, чебрець звичайний, плющ звичайний, фіалка триколірна тощо). Враховуючи те, що лікарські засоби на основі лікарської рослинної сировини (ЛРС) при правильному дозуванні практично нетоксичні, нешкідливі, відносно доступні, ефективні, тому пошук, дослідження БАР ЛРС та фармацевтична розробка на їх основі вітчизняних ЛЗ є актуальним завданням Фармації на сьогодні.



Аналізуючи джерела літератури, відомо що ЧП володіє муколітичною активністю. Це підтверджено виробництвом таких ЛЗ, як: «Пертусин», «Гербіон сироп первоцвіту», «Пектосол» тощо. З усіх груп БАР трави чебрецю найбільш вивченими є компоненти ефірної олії, виділення і дослідження яких здійснюється різними методами. Для аналізу сумішей терпенових сполук найширше застосування знайшли хроматографічні методи, які дозволяють розділити компоненти сумішей та здійснити їхнє кількісне визначення. У Державній Фармакопеї України (ДФУ) наведена фармакопейна стаття на досліджувану сировину, згідно якої ідентифікаційними та кількісними маркерами якості обрано тимол і карвакрол та вміст ефірної олії відповідно. Враховуючи леткість ефірної олії ЧП, доречно проаналізувати й інші БАР, які наявні у даній ЛРС. Попередніми дослідженнями нами встановлено наявність фенольних сполук у витягах з трави ЧП. Тому, для проведення її стандартизації, а також ГЛЗ на її основі, крім тимолу і карвакролу, доречно визначити якісний склад та кількісний вміст і фенольних сполук.

Джерело: [1- 8]

Основний текст. Ідентифікацію фенольних сполук у сировині чебрецю повзучого здійснювали фармакопейним методом - вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [6]. Попередніми дослідженнями нами використано ВЕРХ – аналіз із застосуванням методики до проведення попереднього гідролізу [8]. Як результат, ідентифіковано п'ять флавоноїдів та три фенолкарбонових кислот. Для вибору ідентифікаційних маркерів досліджуваної сировини, необхідно більш глибоко дослідити флавоноїди і фенолкарбонові кислоти. Для цього ми використовували метод ВЕРХ за запропонованими методиками до, та після, проведення гідролізу. Саме, ці методики, на нашу думку, дозволять глибоко дослідити ці БАР, а також, зробити висновок щодо вибору ідентифікаційних маркерів якості досліджуваної сировини. Для проведення відповідного методу аналізу, використовували траву чебрецю повзучого, попередньо підібрані реактиви, а також прилад – рідинний хроматограф “Agilent 1200” із застосуванням детектора “діодна матриця” та відповідних попередньо підібраних умов пробопідготовки: колонка “XTerraC18” (фірми “Waters”, Ірландія), розміром 4,6 x 250 мм, заповнена сорбентом з розміром частинок 5 мкм, або аналогічна, для якої виконуються вимоги тесту “Перевірка придатності хроматографічної системи”; рухома фаза А: 0,6 г натрію дигідрофосфату моногідрату Р розчиняють у 1000 мл води високоочищеної Р, доводять рН розчину кислотою фосфорною Р до 2,5 (потенціометрично); рухома фаза В: ацетонітрил Р; швидкість рухомої фази – 1,0 мл/хв; детектування за довжини хвилі 330 нм, 370 нм; температура колонки 25 °С; об'єм проби, що вводиться 50 мкл; час хроматографування 55 хв.

Розроблена методика ідентифікації досліджуваних БАР у траві чебрецю повзучого методом ВЕРХ (після гідролізу) представлена нами у такій редакції:

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 застосовуючи 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 позначки.

20,0 мл одержаного розчину поміщають у ділильну лійку 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 лійку 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. Лійку промивають 10 мл етилацетату Р і доводять вміст в мірній колбі до позначки тим самим розчинником. Об’єднані етилацетатні вилучення упарюють на водяній бані при температурі не вищій 70 °С до вологого залишку, який розчиняють у 5 мл рухомої фази А.

Розчин порівняння. 2,5 мг стандартних зразків (СЗ) кверцетину (Fluka), 5,0 мг СЗ ізорамнетину (Sigma), 2,5 мг СЗ апігеніну (Fluka), 5,0 мг СЗ лютеоліну (Sigma), 5,0 мг СЗ кемпферолу (Sigma), 5,0 мг СЗ мірицитину, 2,5 мг нарингеніну, 2,5 мг СЗ кофейної кислоти (Fluka), 2,5 мг СЗ ферулової кислоти (Fluka), 5 мг СЗ розмаринової кислоти (Fluka) розчиняють у розчиннику, доводять до 25 мл тим самим розчинником. 5,0 мл одержаного розчину доводять до 100 мл рухомою фазою А.

Результати ВЕРХ-аналізу представлені у таблиці 1.

Таблиця 1 - Результати аналізу спиртових вилучень з трави чебрецю повзучого, отриманих при хроматографічних дослідженнях методом ВЕРХ (після гідролізу)

№ з/п	Кофейна кислота		Ферулова кислота		Розмаринова Кислота		Ізосаліпурпу-зид		Мірицитин		Лютеолін		Апігенін	
	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%	S	%
Зр.1	3343	2,0	2930	1,8	24748	14,9	6102	3,7	5070	3,0	17245	10,4	1609	1,0
Зр.2	2676	3,5	2250	3,0	25708	34,0	3399	4,5	2718	3,6	4310	5,7	617	0,8
Зр.3	3927	2,1	1437	0,8	84042	45,8	1931	1,1	21534	11,7	3122	1,7	403	0,2
Зр.4	7702	3,2	2012	0,8	66235	27,9	3436	1,4	11937	5,0	13790	5,8	2516	1,1

Примітка: №1 – сировина ЧП Київської фармацевтичної фабрики;
 №2 – сировина ЧП Житомирської ФФ «Ліктрави», с. 40810;
 №3 – дикоросла сировина ЧП Гусятинського р-ну, Тернопільської обл. 2009 рік заготівлі;
 №4 – дикоросла сировина ЧП Гусятинського р-ну, Тернопільської обл. 2010 рік заготівлі;
 S – площа піку;
 % – вміст даної БАР у відсотках, розрахований методом внутрішньої нормалізації.

З отриманих результатів ВЕРХ-дослідження фенольних сполук (після гідролізу) випливає, що головним представником флавоноїдів є лютеолін, а з фенолкарбонових кислот – розмаринова кислота, вміст яких є різний відповідно до різних зразків сировини ЧП, але – порівнюваний. Відмінність складу фенольних сполук для різних зразків сировини пояснюється, насамперед, різними умовами зростання, заготівлі і сушіння трави ЧП.

В результаті розробленої методики ідентифікації фенольних сполук трави



ЧП після проведення гідролізу, встановлено наявність у ній флавоноїдів – апігеніну, лютеоліну, мірицитину та ізосаліпурпузиду, а також гідроксикоричних кислот – кофейної, ферулової та розмаринової відповідно, що дозволило об'єктивно обрати основні та додаткові ідентифікаційні маркери якості аналізованої сировини ЧП.

Висновки.

Розроблено ВЕРХ-методику для ідентифікації фенольних сполук у сировині чебрецю повзучого після проведення гідролізу, підібрано оптимальні умови хроматографування, в результаті чого, запропоновано додаткові маркери якості досліджуваної сировини з групи фенольних сполук при проведенні стандартизації ЛРС ЧП, а також препаратів на його основі. Також, необхідно їх прослідкувати в одержаних екстрактах ЧП і твердих капсулах відповідно.

Література:

1. Лікарські рослини і фітотерапія (фітотерапевтична рецептура): навч. посіб. / Л. В. Бензель, Р. С. Дармограй, П. В. Олійник, І. Л. Бензель. – К.: Медицина, 2010. – 400 с.
2. F. Zani, G. Massimo, S. Benvenuti [et al.] // *Planta Med.* – 1991. – Vol. 57, № 3. – P. 237–241
3. Thyme oil. Monograph N: 1374. Concerned also monograph N 865 (*Thymi herba*) and N 1891 (*Serpylli herba*). – PA/PH/ Exp. 13A/T (09) 35 1 R. – Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, April 2009.
4. Компендиум 2007 – лекарственные препараты / под ред. В. Н. Коваленко, А. П. Викторова. – К.: Морион, 2007. – 2270 с.
5. Зарівна Н.О. Аналіз ринку лікарських засобів на основі чебрецю звичайного / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська, М. М. Михалків // – *Фармацевтичний часопис.* – 2010. – № 4. – С. 59-63
6. Державна фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство „Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів”. – 2-е вид. – Харків: Державне підприємство „Український науково-експертний фармакопейний центр якості лікарських засобів”, 2015. Т.1 – 1128 с.
7. Зарівна Н. О. До питання стандартизації трави чебрецю повзучого за вмістом флавоноїдів / Н. О. Зарівна, Л. В. Вронська // *Управління, економіка та забезпечення якості в фармацевтиці.* – 2012. – № 5(25). – С. 21-27.
8. Н. О. Зарівна Розробка методики ідентифікації флавоноїдів та фенолкарбонових кислот у лікарській рослинній сировині чебрецю повзучого/ Зарівна Н. О.// *Scientific World Journal.*- 2023.- Part 1., Issue № 17.- P. 17-22.

References.

1. (2010) Benzell L. V., Darmohrai R. Ye., Oliinyk P. V., Benzell I. L. *Likarski roslyny i fitoterapiia (fitoterapevtychna retseptura: navch. posib.)* [Medicinal plants and phytotherapy (phytotherapeutic formulation)], – K.: Medytsyna, 400. [in Ukrainian].
2. (1991) F. Zani, G. Massimo, S. Benvenuti [*Planta Med*], 57 (3).
3. (2009) Thyme oil. Monograph N: 1374. Concerned also monograph N 865 (*Thymi herba*) and N 1891 (*Serpylli herba*). Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines.
4. Kovalenko V. N., Vyktorova A. P. *Kompendyum– lekarstvennyye preparaty*



[Compendium- medicines]. – K. : MORYON, 2270. [in Ukrainian]. (2015)

5. (2010) Zarivna N.O. Analiz rynku likarskykh zasobiv na osnovi chebretsiu zvychainoho [Market analysis of medicinal products based on common thyme]. Farmatsevychnyi chasopys, 4, 59-63. [in Ukrainian].

6. (2015) Derzhavna Farmakopeia Ukrainy: v 3 t. [State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 vol.]. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality Medicines " [in Ukrainian].

7. (2012) Zarivna N. O. Do pytannia standartyzatsii travy chebretsiu povzuchoho za vmistom flavonoidiv [To the issue of standardization of creeping thyme herb by flavonoid content] Upravlinnia, ekonomika ta zabezpechennia yakosti v farmatsii, 5(25), 21-27. [in Ukrainian].

8. (2023) N. O. Zarivna Rozrobka metodyky identyfikatsii flavonoidiv ta fenolkarbonovykh kyslot u likarskii roslynnii syrovyni chebretsiu povzuchoho [Development of a methodology for the identification of flavonoids and phenolic acids in medicinal plant raw materials of creeping thyme]. Scientific World Journal, Part 1(17), 17-22. [in Ukrainian].

Abstract. The paper presents the development of a methodology for determining the qualitative composition of flavonoids and phenol carboxylic acids in creeping thyme grass by the method of highly effective chromatography after preliminary hydrolysis. Our previous studies have established the presence of phenolic compounds in the raw material of creeping thyme by thin-layer chromatography, as a result of which the optimal solvent system with the best separation capacity was selected (chloroform – methanol – methyl ethyl ketone – acetylacetone 70:10:5:1). This indicates the feasibility of using this solvent system as a mobile phase in TLC analysis, namely flavonoids-aglycones (luteolin, apigenin, myricetin, quercetin, kaempferol, isoramnetin). In addition, we have studied the method of highly effective chromatography (HPLC) before pre-hydrolysis to identify phenolic compounds of creeping thyme (CT). As a result, the presence of flavonoids in it was established, in particular, rutin, hyperoside, luteolin-7-O-glucoside, apigenin-7-O-glucoside and one glycoside luteolin of unknown composition. From phenol carboxylic acids found: caffeine, chlorogenic and rosemary acids. For the proper selection of identification markers of quality when standardizing the raw materials of the CT, it is necessary to investigate the qualitative composition of phenolic compounds, also, after pre-hydrolysis, therefore, it is necessary to develop a methodology for their identification by the HPLC method (after hydrolysis) for the selection of identification markers of the quality of the studied raw materials.

Key words: creeping thyme, phenolic compounds, highly efficient liquid chromatography, standardization.

Стаття відправлена: 13.02.23

© Зарівна Н.О.