

ЗАСТОСУВАННЯ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ ДЛЯ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТРАВИ МЕЛІСИ ЛІКАРСЬКОЇ

©Л. В. Вронська

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

Резюме: запропоновано хроматографічну систему для ідентифікації методом тонкошарової хроматографії флавоноїдів і фенолкарбонових кислот меліси лікарської у її траві. Рекомендовано проводити ідентифікацію трави за наявністю лютеолін-7-О-глюкозиду, хлорогенової, розмаринової і кофейної кислот.

Ключові слова: трава меліси лікарської, флавоноїди, фенолкарбонові кислоти, тонкошарова хроматографія.

Вступ. Лікувальні властивості меліси зумовлені ефірною олією, ідентифікаційними компонентами якої є цитраль і цитронелаль, а також гераніол, ліналоол, цитронелол. За сучасними дослідженнями, в ефірній олії меліси виявлено понад 60 терпеноїдів [1]. Важливими класами БАР меліси лікарської є також фенолкарбонові кислоти і флавоноїди [1–7], які мають різну фармакологічну активність, як, наприклад, антирадикальну [8]. Серед фенолкарбонових кислот виявлені: кофейна, розмаринова, хлорогенова, р-кумарова, ферулова, р-гідроксибензойна, саліцилова, протекатехова, ванілінова, гентизова, синапова, сирингінова, мелітринові кислоти А і В; з флавоноїдів – 7-О-глюкозид лютеоліну, 7-О-глюкозид апігеніну, 7-метоксикемпферол, 3-глюкозид кверцитрину. Більшість робіт присвячені вивченню фенолкарбонових кислот [2–5], хоча біологічна активність, як було вказано у роботі [8], пов'язана не лише із вмістом тільки фенолкарбонових кислот.

Сировиною меліси лікарської є листя, на яке є відповідні фармакопейні статті у Британській та Європейській фармакопеї [9-11]. В Україні застосовують також траву меліси лікарської, для якої немає відповідної монографії у Державній фармакопеї України. З огляду на сучасні вимоги стандартизації ЛРС, мета роботи – розробка методики ідентифікації ЛРС трави меліси лікарської шляхом ідентифікації фенолкарбонових кислот і флавоноїдів. Звертаючи увагу на структуру монографій на ЛРС у Європейській фармакопеї, а також, беручи до уваги останні дослідження із застосування різних фізичних і фізико-хімічних методів для оцінки якості ЛРС та препаратів на її основі [12], нами обрано метод тонкошарової хроматографії.

Методи дослідження. У роботі використано метод тонкошарової хроматографії із застосуванням хроматографічних пластинок Silica gel 60 F₂₅₄ (фірми “Мерск”, Німеччина), хроматогра-

фічної камери “СМАГ”, приладу для нанесення проб Linomat 5 (“СМАГ”, Швейцарія), лампи для перегляду хроматограм в ультрафіолетовому світлі “СМАГ”.

Для досліджень використовували стандартні взірці флавоноїдів і фенолкарбонових кислот: апігенін (Fluka), кверцетин (Fluka), рутин (Sigma), лютеолін-7-О-глюкозид (ФСЗ), апігенін-7-О-глюкозид (Fluka), хлорогенова кислота (Fluka), кофейна кислота (Fluka), розмаринова кислота (Fluka). Точні наважки стандартних взірців розчиняли у відповідних об'ємах метанолу.

Для вивчення якісного складу методом ТШХ використали дві найчастіше застосовуваних рухомих фази: кислота мурашина безводна – вода – еталацетат (6:9:90), етилацетат – кислота оцтова льодяна – вода (5:1:1).

Використовували етилацетат, кислоту оцтову льодяну, кислоту мурашину безводну, аміноетиловий ефір дифенілборної кислоти та макрогол 400 кваліфікації, що відповідає вимогам ДФУ, а також готували за тими ж вимогами їхні розчини чи рухомі фази з ними [13].

У роботі використовували зразки трави меліси лікарської виробництва ЗАТ “Ліктрави” (серії 10807, 41007, 131209, 30210, 40410, 60410). Підготовку сировини для дослідження проводили, готуючи метанольні витяги шляхом кип'ятіння на водяній бані зі зворотним холодильником наважки подрібненої ЛРС з метанолом протягом 30 хв.

Для виявлення фенолкарбонових кислот та флавоноїдів ми використовували два способи: перегляд хроматограм в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм і перегляд в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм після попередньої обробки хроматограм розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і розчином макро голу 400. В УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм фенолкарбонові кислоти проявляються флуоресціюючими зонами, а флавоноїди дають зони поглинання. Після обробки вказаними вище реактивами при пере-

гляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм фенолкарбонові кислоти детектуються за яскравою голубою і зелено-голубою флуоресценцією, флавоноїди – за жовто-оранжевою флуоресценцією. Чутливість виявлення після обробки реактивами є значно вищою, ніж при простому перегляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Результати й обговорення. У результаті проведених досліджень шести серій трави меліси лікарської ми встановлено, що краще розділення її БАР з метанольних вилучень спостерігається при

застосуванні рухомої фази у вигляді суміші кислота мурашина безводна – вода – етилацетат (6:9:90). Інша система розчинників (етилацетат – кислота оцтова льодяна – вода (5:1:1)) не забезпечувала чіткого розділення рутину і хлорогенової кислоти, кофейної кислоти і кверцетину у розчині порівняння. Результати аналізу отриманих хроматограм досліджуваних зразків сировини після обробки метанольним розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і метанольним розчином макрополу 400 представлені у таблиці 1.

Таблиця 1. Фактори рухливості і забарвлення біологічно активних речовин трави меліси лікарської та речовин-свідків

№ за/п	Значення R _f		Забарвлення / флуоресценція	Речовина
	1 система	2 система		
1	0,07	-	голуба	-
2	0,16	-	салатово-голуба	-
3	0,20	0,21	блакитно-голуба	кислота хлорогенова
4	0,24	0,22	голуба	-
5	0,34	0,23	салатова	-
6	0,42	0,27	жовто-оранжева	лютеоліну -7-глюкозид
7	0,62	0,45	салатово-голуба	-
8		0,61	голуба	-
9		0,71	голуба	-
10	0,74	0,75	зеленкувато-блакитна	кислота розмаринова
11	0,87	0,81	синьо-фіолетова	кислота кофейна
12	0,95	0,98	рожево-червона	хлорофіли
Речовини-свідки				
13	0,18	0,06	жовто-оранжева	рутин
14	0,20	0,21	блакитно-голуба	кислота хлорогенова
15	0,42	0,27	жовто-оранжева	лютеоліну -7-глікозид
16	0,49	0,33	жовто-зелена	апигеніну-7-глікозид
17	0,74	0,75	зеленкувато-блакитна	кислота розмаринова
18	0,87	0,81	синьо-фіолетова	кислота кофейна
19	0,88	0,78	жовтогаряча	кверцетин
20	0,96	0,89	лимонно-жовто-зелена	апигенін

Примітка: 1 система – етилацетат – кислота оцтова льодяна – вода (5:1:1); 2 система – кислота мурашина безводна – вода – етилацетат (6:9:90).

Як впливає з представлених результатів, в обох системах розчинників у метанольних витягах трави меліси ідентифікуються лютеолін-7-О-глюкозид, хлорогенова, розмаринова і кофейна кислоти з факторами рухливості відповідно, наведеними у таблиці 1. Крім вказаних речовин, у метанольних витягах спостерігали багато інших флуоресціюючих зон, що вказує на присутність інших поліфенольних сполук.

Для додаткової перевірки присутності лютеолін-7-О-глюкозиду, апигенін-7-О-глюкозиду, хлорогенової, розмаринової і кофейної кислот нами отримані етанольно-водні витяги для усіх шести серій сировини. Їх отримували шляхом кип'ятіння на водяній бані зі зворотним холодильником наважки подрібненої ЛРС з 50 % розчином спирту етилового протягом 30 хв.

Хроматографічні дослідження водно-етанольних витягів показали, що вони бідніші на БАР поліфенольної природи, хоча чітко ідентифікуються лютеолін-7-О-глюкозид, хлорогенова, кофейна і розмаринова кислота. Проте при підготовці зразків трави меліси лікарської для ТШХ-аналізу необхідно використовувати метанол, який, порівняно з етанольно-водною сумішшю, є кращим екстрагентом поліфенольних сполук.

Отже, проведені дослідження дозволяють нам запропонувати наступну методику ідентифікації трави меліси лікарської за наявністю флавоноїдів і фенолкарбонових кислот.

Методика. Випробовуваний розчин. 0,4 г порошку подрібненої сировини поміщають у плоскодонну колбу місткістю 50 мл зі шліфом, додають 20 мл метанолу Р, нагрівають на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником протягом 30 хв. Охолоджують, фільтрують у мірну колбу місткістю 25 мл та доводять об'єм фільтрату до позначки метанолом Р.

Розчин порівняння. 2,5 мг фармакопейного стандартного зразка лютеоліну-7-глюкозиду, 2,5 мг стандартного зразка розмаринової кислоти, 2,5 мг стандартного зразка кофейної кислоти, 2,5 мг стандартного зразка хлорогенової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 10 мл, додають 7 мл метанолу Р і розчиняють, витримуючи колбу з розчином в ультразвуковій бані 5 хв, доводять об'єм розчину тим ж розчинником до позначки і перемішують.

Пластинка: ТШХ силікагелева пластинка Р (5-40 мкм) [або ТШХ силікагелева пластинка Р (2-10 мкм)].

Рухома фаза: кислота мурашина безводна Р – вода Р – еталацетат Р (6:9:90) (V/V).

Нанесення: 10 мкл [5 мкл] випробованого розчину і 10 мкл [або 5 мкл] розчину порівняння смугами завдовжки 1 см [або 6 мм].

Висушування: на повітрі.

Відстань, що має пройти рухома фаза: 12 см [або 6 см].

Висушування: у сушильній шафі при температурі 100 – 105 °С протягом 10 хв.

Проявлення: пластинку переглядають в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм (1 спосіб).

Результати: на хроматограмі розчину порівняння повинні виявлятися (у порядку зростання R_f): блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті хлорогеновій; інтенсивна блакитна флуоресценціююча зона, відповідна кислоті розмариновій, і слабка синьо-фіолетова флуоресціююча зона, відповідна кислоті кофейній.

На хроматограмі випробованого розчину мають виявлятися три зони (кислоти хлорогенової, кислоти розмаринової і кислоти кофейної) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією. Можуть виявлятися інші зони блакитної або синьої флуоресценції, а вище зони кислоти кофейної – зона червоного забарвлення (хлорофіли).

Проявлення: гарячу 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 (2 спосіб).

Результати: на хроматограмі розчину порівняння повинні виявлятися (у порядку зростання R_f): блакитна флуоресціююча зона, відповідна кислоті хлорогеновій; жовто-оранжева зона, відповідна лютеолін-7-О-глюкозиду; зеленкувато-блакитна флуоресценціююча зона, відповідна кислоті розмариновій, і синьо-фіолетова флуоресціююча зона, відповідна кислоті кофейній.

На хроматограмі випробованого розчину мають виявлятися чотири зони (кислоти хлорогенової, лютеолін-7-О-глюкозиду, кислоти розмаринової і кислоти кофейної) на рівні зон на хроматограмі розчину порівняння, відповідні їм за забарвленням і флуоресценцією. Вище зони лютеолін-7-О-глюкозиду і нижче зони кислоти розмаринової можуть виявлятися декілька зон блакитної або синьої флуоресценції, а вище зони кислоти кофейної – зона червоного забарвлення (хлорофіли).

Схема хроматограми, яка має спостерігатись при цьому виявленні, представлена на рисунку 1.

Верх пластинки	
<i>Кислота кофейна:</i> синьо-фіолетова флуоресціююча зона <i>Кислота розмаринова:</i> зеленкувато-блакитна флуоресценціююча зона <i>Лютеолін-7-О-глюкозид:</i> жовто-оранжева зона <i>Кислота хлорогенова:</i> блакитна флуоресціююча зона	червона зона (хлорофіли) синьо-фіолетова флуоресціююча зона зеленкувато-блакитна флуоресценціююча зона жовто-оранжева зона блакитна флуоресціююча зона
Розчин порівняння	Випробовуваний розчин

Рис. 1. Схема хроматограми в умовах дослідження поліфенольних сполук після обробки розчином аміноетилового ефіру дифенілборної кислоти і макроголу при перегляді в УФ-світлі з довжиною хвилі 365 нм.

Висновки. Усі шість досліджуваних серій трави меліси лікарської ЗАТ "Ліктрави" містили вибрані поліфенольні сполуки. Отже, сукупна ідентифікація лютеолін-7-О-глюкозиду, хло-

рогенової, розмаринової і кофейної кислот дозволить достовірно встановлювати тожність і контролювати якість сировини трави меліси лікарської.

Література

1. Зузук Б. М. Мелисса лекарственная (Melissa officinalis L.): Аналитический обзор / Б. М. Зузук, Р. В. Куцик // Провизор. – 2002. – № 2. – С. 21–25.
2. Попова Н. В. Аналіз гідроксикоричних кислот в мелісі лікарській / Н. В. Попова, В. І. Литвиненко, О. А. Певнева // Фармаком. – 2009. – № 2. – С. 45–49.
3. Toth J. Rosmarinic acid – an important phenolic active compound of lemon balm (Melissa officinalis L.) / J. Toth, M. Mrljanova, D. Tekelova // Acta. Facult. Pharm. Univ. Comenianaе. – 2003. – Vol. 50. № 87. – P. 139-146.
4. Comparison of rosmarinic acid content in commercial tinctures produced from fresh and dried lemon balm (Melissa officinalis) / A. S. Medina, C. J. Etheridge, G. E. Hawkes [et al.] // J. Pharm. Pharmaceut. Sci. – 2007. – Vol. 10, № 4. – P. 455–463.
5. Petersen M. Rosmarinic acid / M. Petersen, M. S. J. Simmonds // Phytochemistry. – 2003. – Vol. 62. № 56. – P. 121–125.
6. Patora J. Badanie flawonoidow melisy lekarskiej – Mellisa officinalis L. / J. Patora, B. Klimek // Flavonoidy i ich zastosowanie : III Konferencja " Flavonoidy i ich zastosowanie ", 8-10 czerwiec. 2000 r. : Materialy konf. – Rzeszow, S. 15–19.
7. Aqueous extracts from peppermint, sage and lemon balm leaves display potent anti-HIV-1 activity by increasing the virion density / S. Geuenich, C. Goffinet, S. Venzke [et al.] // Retrovirology. – 2008. – № 5. – P. 27.
8. Гудзенко А. В. Вміст біологічно-активних речовин та антирадикальні властивості спиртових настоек трави меліси (Melissa officinalis L.) / А. В. Гудзенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2010. – № 5. – С. 17-22.
9. European Pharmacopoeia. – 5-ed. – Electronic version. – 2779 p.
10. European Pharmacopoeia. – 6-ed. – Electronic version. – 2956 p.
11. European Pharmacopoeia. – 7-ed. – Electronic version. – 3357 p.
12. Сур С. В. Методологія оцінки якості рослинних лікарських засобів на підставі результатів, одержаних за допомогою сучасних аналітичних методів / С. В. Сур // Фармацевтичний журнал. – 2002. № 3 – С. 64-70.
13. Державна Фармакопея України. – [1-е вид.] – Х.: PIPEГ, – 2001. – 556 с.

ПРИМЕНЕНИЕ ТОНКОСЛОЙНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТРАВЫ МЕЛИССЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ

Л. В. Вронска

Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

Резюме: предложено хроматографическую систему для идентификации методом тонкослойной хроматографии флавоноидов и фенолкарбоновых кислот мелиссы лекарственной в ее траве. Рекомендовано проводить идентификацию травы по наличию лютеолин-7-О-глюкозида, хлорогеновой, розмариновой и кофейной кислот.

Ключевые слова: трава мелиссы лекарственной, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, тонкослойная хроматография.

APPLICATION OF THIN LAYER CHROMATOGRAPHY FOR LEMON BALM HERB IDENTIFICATION

L. V. Vronska

Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky

Summary: there was proposed chromatographic system for identification by thin-layer chromatography of flavonoids and cinnamic acids in lemon balm herb. The identification method of herbs is recommended to provide on lyuteolin-7-O-glucoside, chlorogenic, rosmarinic and caffeic acids presence.

Key words: lemon balm herb, flavonoids, cinnamic acids, thin layer chromatography.