

Рекомендована д. фармац. наук, проф. В. М. Ковальовим

УДК 615.322.074:547:615.218.3

## **ЯКІСНИЙ СКЛАД ТА КІЛЬКІСНИЙ ВМІСТ ОРГАНІЧНИХ КИСЛОТ У ЗБОРІ АНТИАЛЕРГІЧНОМУ**

© С. С. Козачок<sup>1</sup>, С. М. Марчишин<sup>1</sup>, Б. О. Виноградов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

<sup>2</sup>Національний інститут винограду і вина "Магарач"

**Резюме:** здійснено дослідження збору лікарських рослин для лікування і профілактики хворих з алергічними захворюваннями (збір антиалергічний) та його інгредієнтів на наявність вільних органічних кислот. Встановлено якісний склад і кількісний вміст вільних органічних кислот у зборі антиалергічному та його компонентах.

**Ключові слова:** вільні органічні кислоти, тонкошарова хроматографія, газова хроматографія, потенціометричне титрування, збір антиалергічний.

**Вступ.** Алергії є досить поширеними захворюваннями. За даними різних авторів від алергію страждає 20–35 % населення. Найбільш розповсюдженими є алергічний риніт (АР), алергічний дерматит (АД), бронхіальна астма (БА). Є дані, що АР (сезонний і цілорічний) зустрічається у 10–22 % населення, АД – у 5–12 %, БА – у 5–9 %. За останні 10–15 років частота АР (обидві форми) у європейських країнах зросла, кількість хворих сягає 47 млн чоловік (лише зареєстровані випадки) [7].

Для лікування багатьох захворювань, особливо хронічних, застосовують рослинні композиції – збори, які при правильному їх складанні мають вищу ефективність лікувальної дії, ніж одна лікарська рослина [1]. Це забезпечує можливість потенціювання фармакологічного і терапевтичного ефектів, що базується на полівалентності дії однойменних компонентів, розширення якісного складу біологічно активних речовин та зменшення ймовірності побічних проявів [5].

У наукових працях останніх років є інформація, що найчастіше для лікування алергій у традиційній та народній медицині використовують такі лікарські рослини та їх збори: череду трироздільну, бузину чорну, фіалку триколірну, кропиву дводомну, подорожник великий, солодку голу, календулу лікарську, цикорій дикий, мелісу лікарську, пирій повзучий, кульбабу лікарську тощо [5, 8]. Інгредієнти антиалергічного збору ми відбирали після ретельного аналізу літератури, які згідно з народними прописами широко використовують для лікування та профілактики алергічних захворювань.

Метою нашого дослідження було визначення якісного складу та кількісного вмісту вільних органічних кислот у зборі антиалергічному та його рослинних компонентах.

**Методи дослідження.** Об'єктами для дослідження обрано інгредієнти антиалергічного збору: листки кропиви, листки меліси, листки подорожника великого, квітки ромашки, трава фіалки, трава череди, кореневище з коренями пирію та збір. Сировину збору заготовляли у 2011 році в селі Вербівці Тербовлянського району Тернопільської області.

Визначення якісного складу вільних органічних кислот проводили методом хроматографії у тонкому шарі сорбента за допомогою хроматографічних пластинок «Silufol» із силікагелем LS 5-40 на алюмінієвій підкладці. Для хроматографування використовували попередньо одержані екстракти збору антиалергічного і його компонентів [4] та розчини свідків органічних кислот: саліцилова, шавлева, бензойна, лимонна, бурштинова, винна, яблучна. Дослідження здійснювали у системі розчинників 95 % етиловий спирт-концентрований розчин амоніаку (16:4,5) [6]. Хроматограми після хроматографування добре висушували й обробляли розчином бромкрезолового зеленого, нагрівали у сушильній шафі та спостерігали проявлення речовин у вигляді жовтих плям на синьому фоні.

Встановлення кількісного вмісту індивідуальних органічних кислот здійснювали за допомогою модифікованої методики визначення жирних кислот для рослинної сировини з подальшим виявленням органічних кислот. Вона оснований на добуванні метилових естерів кислот (жирних, органічних, фенольних) за допомогою метилуючого агента та їх вилучення для подальшого хроматографування на газовому хроматографі [10, 11].

Для цього до 50 мг (точна наважка) висушеної рослинної сировини у віалі на 2 мл додавали внутрішній стандарт (50 мкг тридекана в гек-

сані) і 1 мл 14 %  $\text{VCl}_3$  у метанолі. Суміш витримували в герметично закритій віалі 8 годин при  $65^\circ\text{C}$ . Реакційну рідину зливали з осаду рослинної сировини, упарювали до сухого залишку і розводили 1 мл дистильованої води. До одержаного розчину додавали 0,2 мл метилен хлориду, струшували декілька разів впродовж 1 години. Вилучений екстракт метилових естерів використовували для хроматографування на газовому хроматографі Agilent Technologies 6890 з мас-спектрометричним детектором 5973.

Введення проби (2 мкл) у хроматографічну колонку здійснюють у режимі splitless, без поділу потоку. Швидкість введення проби 1,2 мл/хв протягом 0,2 хв. Хроматографічна колонка – капілярна INNOWAX із внутрішнім діаметром 0,25 мм і довжиною 30 м. Швидкість газу-носія (гелій) 1,2 мл/хв. Температура нагрівання введення проби –  $250^\circ\text{C}$ . Температура термостата з програмуванням від  $50$  до  $250^\circ\text{C}$  із швидкістю  $4^\circ\text{C}/\text{хв}$ .

Для ідентифікації компонентів використовували бібліотеки мас-спектрів NIST05 і WILEY 2007 із загальною кількістю спектрів більшою за 470000 у поєднанні з програми для ідентифікації AMDIS та NIST.

Визначення кількісного вмісту вільних органічних кислот у перерахунку на яблучну кислоту проводили для листків кропиви і трави фіалки; на лимонну кислоту – для квіток ромашки, трави череди, кореневищ з коренями пирію, листків меліси, збору антиалергічного; на малонову кислоту – для листків подорожника великого проводили за методикою ДФ СРСР [2] та потенціометрично для кореневищ з коренями пирію і збору [3].

pH-потенціометричне титрування здійснювали на приладі «Іономер И – 130» з використанням індикаторного електрода і скляний електрод «ЭСЛ – 43-07» (виробник ЗИП, Гомель) та електроду порівняння – хлоридосрібний електрод, насиченим розчином калій хлориду типу «ЭВЛ – 1 М 3.1».

Кількісний вміст вільних органічних кислот для збору антиалергічного визначали за різницею результатів двох титрувань: основного розчину з пробю (10 мл витягу [2] збору антиалергічного і 1 мл 0,1 М розчин хлоридної кислоти) та основного розчину без проби (сліпа («холоста») проба – 0,1 М розчин хлоридної кислоти); для водного витягу кореневищ з коренями пирію [9] – прямим титруванням, в обох випадках використовували як титрант 0,1 М розчин натрій гідроксиду, який виготовляли за Гілебрандом та стандартизували за хімічно чистою бурштиною кислотою згідно з рекомендованою методикою [9].

**Результати й обговорення.** Результати досліджень представлені на рисунках 1–3 та наведено у таблицях 1 і 2.

За результатами хроматографування у тонкому шарі сорбенту ідентифікували щавлеву, лимонну, яблучну, бурштинову кислоти у зборі антиалергічному та його 7 інгредієнтах. Крім того, бензойна кислота була виявлена у листках кропиви, квітках ромашки, траві фіалки, кореневищах з коренями пирію та у зборі; у листках меліси та коренях з кореневищем пирію, крім щавлевої, лимонної, яблучної, бурштинової кислот, спостерігали наявність саліцилової кислоти. У досліджуваних об'єктах не виявлено винної кислоти.

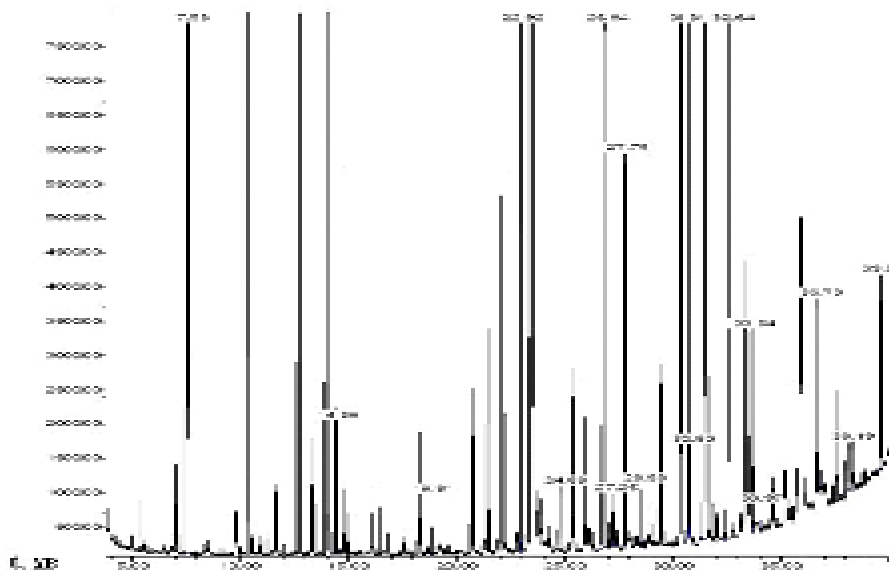


Рис. 1. Хроматограма органічних кислот збору антиалергічного.

Таблиця 1. Вміст органічних кислот у зборі антиалергічному та його інгредієнтах

№	Назва кислоти (RT*)	Листки кропиви	Листки меліси	Листки ПВ*	Квітки ромашки	Трава фіалки	Трава череди	К-ще з к-ми пірію	Збір антиалерг.
		мг/кг							
1	диметоксиоцтова (9,87)	151	30	17	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
		1,49	0,80	0,36					
2	щавлева (10,33)	2150	861	184	445	717	341	69	398
		21,20	23,06	3,9	6,58	15,69	7,82	6,08	10,50
3	3,3-димето-ксіпропіонова (10,55)	54	20	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
		0,53	0,54						
4	оцтова (11,73)	64	27	н/в	н/в	34	34	н/в	26
		0,63	0,72			0,74	0,78		0,69
5	малонова (12,68)	583	504	2276	1155	199	594	56	1026
		5,75	13,50	48,18	17,07	4,35	13,62	4,94	27,06
6	4,4-димето-ксімасляна (13,28)	64	61	41	45	17	37	н/в	25
		0,63	1,63	0,87	0,67	0,37	0,85		0,66
7	фумарова (13,39)	66	23	49	63	47	40	н/в	43
		0,65	0,62	1,04	0,93	1,03	0,92		1,13
8	фуранова (14,16)	66	22	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
		0,65	0,59						
9	бурштинова (14,52)	309	265	172	181	295	141	39	138
		3,05	7,10	3,64	2,68	6,45	3,23	3,44	3,64
10	бензойна (15,02)	49	н/в	н/в	71	7	н/в	7	16
		0,48			1,05	0,15		0,62	0,42
11	фенілоцтова (16,9)	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	2	н/в
								0,18	
12	саліцилова (18,29)	н/в	52	н/в	н/в	н/в	н/в	2	н/в
			1,39					0,18	
13	3-окси-2-метилглютарова (21,48)	447	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
		4,41							
14	яблучна (23,08)	3433	515	1085	2304	2311	1447	166	1006
		33,86	13,79	22,97	34,06	50,56	33,18	14,64	26,53
15	3-форміл-3-метилгіо-валеріанова (24,32)	н/в	70	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в
			1,87						
16	азелаїнова (25,40)	301	126	70	н/в	н/в	н/в	51	н/в
		2,97	3,37	1,48				4,50	
17	аконітова (25,42)	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	341	н/в
								30,07	
18	вератрова (27,16)	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	19	н/в
								1,68	
19	лимонна (30,34)	2403	1158	731	2437	944	1685	343	1039
		23,70	31,01	15,47	36,02	20,65	38,64	30,25	27,40
20	ванілінова (33,46)	н/в	н/в	82	64	н/в	42	10	75
				1,74	0,95		0,96	0,88	1,98
21	3(6-метокси-3метил-2бензофураніл)пропіонова(34,38)	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	н/в	29	н/в
								2,56	

Примітки: н/в – не виявлено; RT – час утримання; ПВ – подорожник великий.

Методом хромато-мас-спектрометрії (ХМС) ідентифікували органічні кислоти збору антиалергічного та його інгредієнтів, а за методом внутрішнього стандарту розраховували їх кількісний вміст (рис. 1, табл. 1). Встановили, що антиалергічна композиція у максимальній кількості містить лимонну кислоту (1039 мг/кг, що відповідно становить 27,40 % від загального вмісту органічних кислот), найменше є бензойної кислоти (16 мг/кг, 0,42 %), тому обчислення загального кількісного вмісту вільних органічних кислот для збору антиалергічного здійснювали у перерахунку на лимонну кислоту (рис. 2, 3, 4, табл. 2). Серед компонентів збору найбільша кількість лимонної кислоти спостерігається у листках меліси (1158 мг/кг, 31,01 %),

квітках ромашки (2437 мг/кг, 36,02 %), траві череди (1685 мг/кг, 38,64 %), кореневищах з коренями пирію (343 мг/кг, 30,25 %). Щодо інших інгредієнтів, то у листках подорожника великого переважає малонова кислота – 2276 мг/кг (48,18 %); у листках кропиви, траві фіалки – яблучна кислота, що становить 3433 мг/кг (33,86 %) та 2311 мг/кг (50,56 %) відповідно (табл. 1).

Кількісний вміст вільних органічних кислот у листках кропиви, траві фіалки, квітках ромашки, траві череди, листках меліси, листках подорожника великого, кореневищах з коренями пирію та у зборі антиалергічному встановили за допомогою кислотно-основного титрування з індикаторним фіксуванням точки еквівалентності згідно з методикою ДФ СРСР [2] (табл. 2).

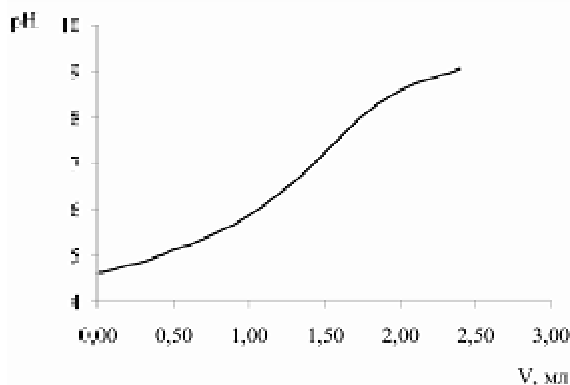
**Таблиця 2.** Кількісний вміст вільних органічних кислот у перерахунку на суху сировину у зборі та його рослинних компонентах

Назва ЛРС	Вміст органічних кислот, %
Листки кропиви	0,37±0,02
Листки меліси	0,55±0,025
Листки подорожника великого	0,43±0,01
Квітки ромашки	0,21±0,01
Трава фіалки	1,1±0,14
Трава череди	0,52±0,02
К-ще з к-ми пирію	0,57±0,03
Збір антиалергічний	0,45±0,02

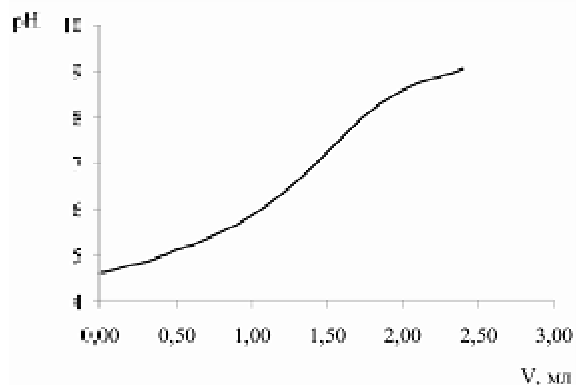
Результати досліджень показали, що трава фіалки містить найбільшу кількість органічних кислот (1,1±0,14) %, квітки ромашки – найменшу (0,21±0,01) %. Збір антиалергічний містить (0,45±0,02) % органічних кислот.

pH-потенціометричним методом титрування визначили вміст вільних органічних кислот у зборі антиалергічному та кореневищах з коренями пирію. Для водного витягу композиції на титрування основного розчину з пробєю (рис. 1, 2) витрачено 1,56 мл 0,1 М розчину натрій

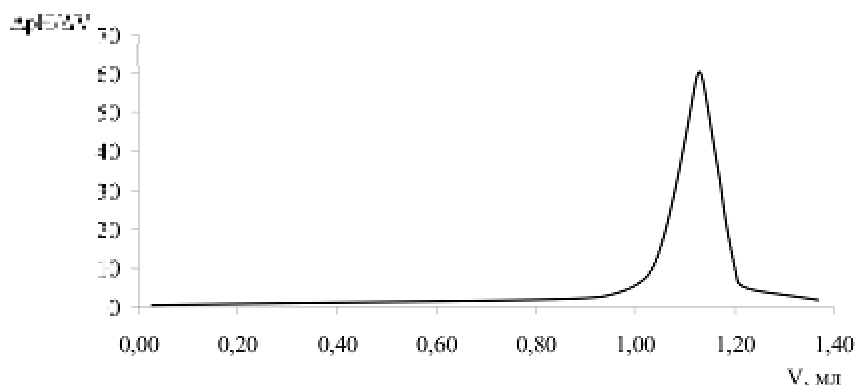
гідроксиду, а основного розчину без проби (рис. 3) і 1,15 мл титранту. За різницею двох титрувань розраховали вміст вільних органічних кислот для збору антиалергічного, що у перерахунку на лимонну кислоту становив (0,3±0,02) %. У результаті прямого титрування водного витягу кореневищ з коренями пирію 0,1 М розчином натрій гідроксиду, який прореагував у кількості 0,62 мл, вміст вільних органічних кислот у перерахунку на лимонну кислоту становив (0,45±0,02) %.



**Рис. 2.** Інтегральна крива потенціометричного титрування основного розчину (1 мл 0,100 М HCl) з пробєю (10 мл витягу збору антиалергічного).



**Рис. 3.** Диференціальна крива потенціометричного титрування основного розчину (1 мл 0,1000 М HCl) з пробєю (10 мл витягу збору).



**Рис. 4.** Диференційна крива потенціометричного титрування основного розчину (у сліпому досліді – 1,00 мл 0,1000 моль/л розчину HCl).

**Висновки.** 1. Проведено якісне та кількісне визначення вільних органічних кислот у зборі антиалергічному та його інгредієнтах.

2. Методом хроматографії у тонкому шарі сорбенту визначено у досліджуваних об'єктах наявність лимонної, бурштинової, яблучної, саліцилової, бензойної, щавлевої кислот.

3. За допомогою газової хроматографії вста-

новлено якісний та кількісний склад індивідуальних органічних кислот збору антиалергічного та його інгредієнтів.

4. Визначено кількісний вміст вільних органічних кислот у досліджуваних об'єктах титриметричним методом із індикаторним та потенціометричним фіксуванням кінцевої точки титрування.

#### Література

1. Гарник Т. П. Деякі аспекти застосування лікарських рослин та рослинної сировини в медицині / Т. П. Гарник, Ф. А. Мітченко, Т. К. Шураєва // Фітотерапія. Часопис. – 2002. – № 1-2 – С. 70–72.
2. Государственная фармакопея СРСР. Вип. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СРСР. – 11-е изд. – М. : Медицина, 1989. – 408 с.
3. Державна Фармакопея України / МОЗ України. – 1-ше видання. – Харків, 2001. – С. 30-32.
4. Ємельянова І. В. Вивчення якісного складу та динаміки накопичення вільних органічних кислот у вегетативних і генеративних органах гринделії розчепіреної / І. В. Ємельянова, В. М. Ковальов, С. В. Ковальов // Фармацевтичний журнал. – 2009. – № 1. – С. 80-83.
5. Кобзар А. Я. Фармакогнозія в медицині / А. Я. Кобзар. – Київ, 2004. – 479 с.
6. Кусова Р. Дз. Исследование плодов барбариса обыкновенного произрастающего в республике Северная Осетия – Алания / Р. Дз. Кусова // Фармация.

– 2008. – № 5. – С. 22–23.

7. Пухлик Б. М. Алергологія : посібник для студ. мед. вузів, лікарів-інтернів / Б. М. Пухлик. – Вінниця: Нова книга, 2004. – 240 с.

8. Рибак О. В. Пошук перспективних рослин для лікування алергічних захворювань / О. В. Рибак, Ю. О. Платинова // Фармацевтичний часопис. – 2007. – № 3. – С. 65–67.

9. Сусленикова В. М. Руководство по приготовлению титрованных растворов / В. М. Сусленикова, К. К. Киселева. – Л. : Химия, 1978. – 184 с.

10. Carrapiso A.I. Development in lipid analysis: some new extraction techniques and in situ transesterification / A.I. Carrapiso, C. Garcia // Lipids. – 2000. – Volume 35, № 11. – P. 1167–1177.

11. Lewis T. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from lipid-producing microheterotrophs / T. Lewis, P. D. Nichols, T. A. McMeekin // J Microbiol Methods. – 2000. – Volume 43, № 2. – P. 107–116.

## КАЧЕСТВЕННЫЙ СОСТАВ И КОЛИЧЕСТВЕННОЕ СОДЕРЖАНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ В СБОРЕ АНТИАЛЛЕРГИЧЕСКОМ

**С. С. Козачок<sup>1</sup>, С. М. Марчишин<sup>1</sup>, Б. А. Виноградов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>Тернопольский государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского

<sup>2</sup>Национальный институт винограда и вина “Магарач”

**Резюме:** осуществлено исследование сбора лекарственных растений для лечения и профилактики больных с аллергическими заболеваниями (сбор антиаллергический) и его ингредиентов на наличие органических кислот.

Установлено качественный состав и количественное содержание свободных органических кислот в сборе антиаллергическом и его составляющих.

**Ключевые слова:** свободные органические кислоты, тонкослойная хроматография, газовая хроматография, потенциометрическое титрование, сбор антиаллергический.

## QUALITATIVE COMPOSITION AND QUANTITY CONTENT OF ORGANIC ACIDS IN THE HERBAL ANTIALLERGIC COMPOSITION

<sup>1</sup>S. S. Kozachok, <sup>1</sup>S. M. Marchyshyn, <sup>2</sup>B. O. Vynogradov

<sup>1</sup>*Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky*

<sup>2</sup>*National Institute of Grapes and Vine "Maharach"*

**Summary:** there was carried out the study of herbal composition for treatment and preventing allergic diseases (anti-allergic composition) and its ingredients for the presence of organic acids. It was established the qualitative composition and quantitative content of free organic acids in the anti-allergic composition and its constituents.

**Key words:** free organic acids, thin layer chromatography, gas chromatography, potentiometric titration, the anti-allergic composition.