



О.Г. Смалюх<sup>1</sup>, С.В. Сур<sup>2</sup>

## Стандартизація плодів моркви дикої за складом і вмістом флавоноїдів

<sup>1</sup>ВАТ «Галичфарм», м. Львів,

<sup>2</sup>Корпорація «Артеріум», м. Київ

**Ключові слова:** флавоноїди, моркви дикої плоди, ідентифікація, кількісне визначення.

Наведено результати ідентифікації флавоноїдів хроматографічними методами (ТШХ і ВЕРХ) та їх кількісного визначення у плодах моркви дикої методом диференційної спектрофотометрії. Показано, що якісний склад флавоноїдів у досліджених зразках плодів моркви дикої з різних регіонів України суттєво відрізнявся, при цьому у зразках у межах одного регіону він був подібним. Показано, що вміст флавоноїдів у досліджених зразках лікарської рослинної сировини становив від 0,071% до 0,792% у перерахунку на лютеолін або гіперозид. Запропоновано ввести у специфікацію на лікарську рослинну сировину плодів дикої моркви вимоги з ідентифікації лютеоліну (методом ТШХ та за максимумом поглинання спектра похідних з алюмінієм хлоридом при  $395 \pm 3$  нм) та за вмістом суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін не менше 0,10%.

### Стандартизація плодів моркви дикої по составу и содержанию флавоноидов

О.Г. Смалюх, С.В. Сур

Приведены результаты идентификации флавоноидов хроматографическими методами (ТСХ и ВЭЖХ) и их количественного определения в плодах моркови дикой методом дифференциальной спектрофотометрии. Показано, что качественный состав флавоноидов в образцах плодов моркови дикой из разных регионов Украины существенно отличался, при этом в образцах в пределах одного региона он был подобным. Показано, что содержание флавоноидов в исследованных образцах растительного сырья составляло от 0,071% до 0,792% в пересчете на лютеолин или гиперозид. Предложено ввести в спецификацию на лекарственное растительное сырье плодов дикой моркови требования по идентификации лютеолина (методом ТСХ и по максимуму поглощения спектра производных с алюминием хлоридом при  $395 \pm 3$  нм) и по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин не менее 0,10%.

**Ключевые слова:** флавоноиды, моркови дикой плоды, идентификация, количественное определение.

### Standardization of wild carrot (*Daucus carota* L.) seeds in composition and contents flavonoids

O.G. Smalyuh, S.V. Sur

The results of the identification of flavonoids by chromatographic methods (TLC and HPLC) and their quantitative determination by differential spectrophotometry in seed of Wild carrot. It is shown that both flavonoids content and composition in the investigated Wild carrot seeds samples from different regions of Ukraine were essentially different, with the samples within the same region, they were similar. It is shown that the flavonoid content in the samples was ranged from 0.071% to 0.792% calculated as luteolin and hyperoside. It is proposed to introduce the identification requirements for luteolin (TLC and for the maximum absorption spectrum of derivatives with aluminum chloride at  $395 \pm 3$  nm) and for the sum of flavonoids content calculated as luteolin in terms of at least 0.10% into specification for Wild carrot seeds.

**Key words:** flavonoids, Wild carrots seeds, identification, assay.

Для розробки готового рослинного лікарського засобу (ГЛЗ) з передбаченою терапевтичною активністю дуже важливо регламентувати якість лікарської рослинної сировини (ЛРС), з якої він вироблятиметься. Одним із найважливіших етапів стандартизації ЛРС є встановлення якісних і кількісних характеристик її біологічно активних речовин (БАР). Особливо важливим і актуальним є питання стандартизації рослинної сировини, що не описана у монографіях Державної фармакопеї України та в інших фармакопеях, зокрема плодів моркви дикої (*Daucus carota* L.) з родини губоцвітих (*Ariaceae*).

Плоди моркви дикої здавна використовуються у народній медицині та у промисловому виробництві лікарських засобів. Різноманітний склад БАР зумовлює різнобічну фармакологічну активність плодів моркви дикої. Згідно до спеціалізованої літератури, ця ЛРС містить ефірну олію, флавоноїди, кумарини, дубильні речовини, жирну

олію та інші біологічно активні сполуки [3,4]. У фармакологічному відношенні БАР плодів моркви дикої мало вивчені і відомі як сполуки, що мають широкий спектр активності і характеризуються спазмолітичними, протимікробними, протівірусними та літолітичними властивостями [1,3,4].

Для виробництва готових лікарських засобів на АТ «Галичфарм» використовують екстракти плодів дикої моркви, отримані екстракцією етанолом високої концентрації, що містять в основному гідрофобні БАР, зокрема флавоноїди. Тому важливою задачею стандартизації виробництва лікарських засобів, що містять плоди дикої моркви, є створення системи специфікацій, що дозволили б контролювати технологічний процес у ланцюзі ЛРС – екстракти – ГЛЗ.

#### Мета роботи

Вивчення складу флавоноїдів плодів моркви дикої за допомогою хроматографічних методів аналізу, їх кількісне визначення та обґрунтування вимог до ідентифікації

і кількісного вмісту на основі даних, отриманих при дослідженні зразків ЛРС різного походження.

#### Матеріали і методи дослідження

Для дослідження обрано зразки плодів моркви дикої (с. 1, с. 2, с. 031009, с. 10/10, с. 1-12.12.2011, с.011208, с.010309, с.20312, с. 10212140212), що використовували при виробництві готових лікарських засобів на АТ «Галичфарм». Для дослідження відібрали зразки ЛРС з регіонів Західної України (зразки 1–7) та Криму (зразки 8–9).

Для ідентифікації флавоноїдів у сировині використовували методи тонкошарової (ТШХ) та високоефективної рідинної (ВЕРХ) хроматографії.

Для випробування методом ТШХ сировину, подрібнену до розміру частинок, що проходять через сито з діаметром отворів 5 мм, екстрагували метанолом при нагріванні на водяній бані зі зворотним холодильником. Для хроматографування використовували хроматографічні пластинки MERCK Silica gel F<sub>254</sub> і систему розчинників мурашина кислота безводна – вода – етилацетат (10:10:80). Для проявлення хроматограм використовували розчин 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетилового ефіру в метанолі та 50 г/л макрогону 400 Р в метанолі Р. Оцінку результатів проводили шляхом порівняння величини R<sub>f</sub> зон на хроматограмі розчину порівняння та випробовуваного розчину. Для приготування розчину порівняння використовували наступні речовини-свідки: рутин, хлорогенову кислоту, гіперозид, апігеніну-7-глюкозид, цикорієву кислоту, лютеолін, апігенін, лютеолін-7-глюкозид, кавову кислоту, кверцетин (Fluka).

Для детальнішого вивчення складу флавоноїдів моркви дикої плодів використовували метод ВЕРХ.

Досліджували зразки, приготовані для випробування методом ТШХ. Для приготування розчину порівняння використовували речовини-свідки: хлорогенову, кавову, ферулову, цикорієву, розмаринову кислоти, рутин, гіперозид, апігенін-7-глюкозид, лютеолін, кверцетин, апігенін, кемпферол (Fluka). Аналіз проводили на рідинному хроматографі Agilent 1200, хроматографічна колонка XTerra C18, розміром 4,6×250 мм з розміром часток 5 мкм. Рухома фаза А: розчин натрію дигідрофосфату моногідрату 0,6 г/л, доведений до рН 2,5 кислотою фосфорною. Рухома фаза В: ацетонітрил. Швидкість рухомої фази – 1 мл/хв, градієнтне елювання. Детектування проводили за допомогою УФ-детектора при довжині хвилі 330 нм. Об'єм введеної проби – 100 мкл, температура колонки – 25°C. Ідентифікацію речовин проводили шляхом порівняння часу утримування піків на хроматограмі випробовуваного розчину з часом утримування стандартних речовин.

Оцінку кількісного вмісту флавоноїдів у плодах дикої моркви проводили спектрофотометричним методом. За основу взято методику кількісного визначення флавоноїдів, описану у ДФУ, у монографії Глоду плоди [2]. Методика ґрунтується на попередньому гідролізі флавоноїдів до агліконів, екстракції агліконів етилацетатом і наступному комплексоутворенні з алюмінію хлоридом. Як розчин порівняння використовували зразок лютеоліну (Fluka). Вимірювання оптичної густини і записи спектрів поглинання проводили на спектрофотометрі Cary-100

(Varian). Усі використовувані реактиви відповідали вимогам ДФУ [5, 6].

#### Результати та їх обговорення

Перший етап дослідження – ідентифікація флавоноїдів методами тонкошарової та високоефективної хроматографії.

У результаті аналізу методом ТШХ в УФ-світлі при довжині хвилі 365 нм у зразках моркви дикої плодів, зібраних у Західному регіоні, виявлено шість основних зон з жовто-оранжевою, жовто-зеленою та блакитною флуоресценцією, що характерні для фенольних сполук. За збігом величини R<sub>f</sub> та забарвленням зон на хроматограмі розчину порівняння та випробовуваного розчину в зразках ідентифіковано рутин, лютеолін-7-глюкозид і лютеолін. На хроматограмах випробовуваних зразків 3–8 спостерігали додаткові зони жовто-зеленої флуоресценції. На хроматограмах випробовуваних зразків 1, 5 та 8 визначено зони блакитної флуоресценції, що характерно для фенолкарбонових кислот. У зразках плодів моркви дикої, зібраних у Криму, ідентифіковано хлорогенову кислоту, гіперозид, лютеолін. Фотографії хроматограм наведено на *рис. 1*.

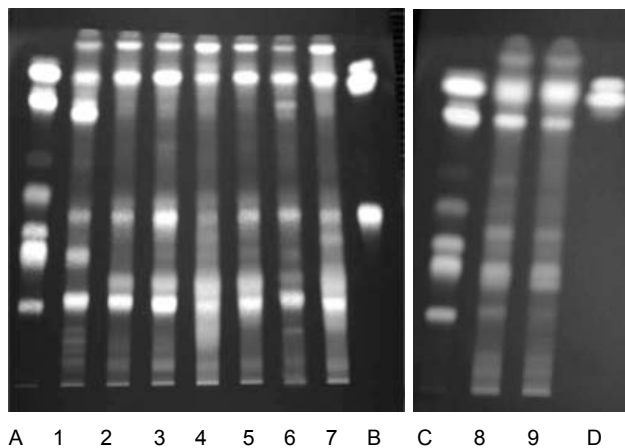


Рис. 1. Фотографії хроматограм, отриманих при ідентифікації флавоноїдів у моркви дикої плодах:

A, C	хроматограма розчину порівняння (рутин, хлорогенова кислота, гіперозид, апігеніну-7-глюкозид, цикорієва кислота, лютеолін, апігенін, знизу вгору)		
1–7	хроматограми випробовуваних зразків № 1–7 (зразки з Західного регіону України)	8, 9	хроматограми випробовуваних зразків № 8, 9 (зразки з Криму)
B	хроматограма розчин порівняння (лютеолін-7-глюкозид, кавова кислота, кверцетин, знизу вгору)	D	хроматограма розчин порівняння (кавова кислота, кверцетин, знизу вгору)

Методом рідинної хроматографії у моркви дикої плодах, зібраних у Західному регіоні України, за збігом часу утримування на хроматограмі розчину порівняння та випробовуваного розчину ідентифіковано лютеолін, апігенін, рутин, ферулову та хлорогенову кислоти. На хроматограмах випробовуваних зразків 1–5 та 7 спостерігали пік з часом виходу близько 28 хв, на хроматограмі

**Результати ідентифікація флавоноїдів у зразках моркви дикої плодів методом вискоєфективної рідинної хроматографії**

Речовина	Час утрим. хв	Відносний вміст, %								
		Зразок 1 Серія 2	Зразок 2 10/10	Зразок 3 Серія 1	Зразок 4 011208	Зразок 5 1-12.12.2011	Зразок 6 1010309	Зразок 7 031009	Зразок 8 20312	Зразок 9 10212140212
Хлорогенова кислота	15,1	7,1	0,5	0,6		0,3	1,7	0,4	17,9	20,1
Не ідентифікований пік	17,1	1,5						1,0	11,5	9,3
Кавова кислота	17,7	1,5					0,6		2,7	3,6
Ферулова кислота	24,4	12,9	13,0	11,0	2,2	4,1	17,4	3,4	5,8	
Рутин	25,7	2,5	4,1	5,7	0,9	1,8	7,4	1,2	3,5	1,3
Гіперозид	27,3	2,6						0,5	7,4	10,3
Не ідентифікований пік	28,1	1,1	48,8	47,1	62,4	73,9	19,3	63,4		
Апігенін-7-глюкозид	29,1				1,6	1,0	1,1	0,4		
Не ідентифікований пік	30,5	7,6	4,7	3,6	1,3	1,4	12,5	0,8		
Розмаринова кислота	30,9					0,5		1,0		
Не ідентифікований пік	31,2	20,1	2,5	3,1	9,5	4,8	1,7	13,8		
Не ідентифікований пік	34,3	24,4			1,6				3,2	
Лютеолін	41,0	2,2	6,3	5,5	3,4	3,0	9,8	2,6		
Кверцетин	42,0				0,8		0,9			
Апігенін	47,2		1,4	0,5	0,7	0,7	1,3	0,5		

випробовуваного зразка 6 спостерігали піки з часом виходу 30 та 34 хв. У зразках плодів моркви дикої, зібраних у Криму, ідентифіковано хлорогенову та кавову кислоти, гіперозид, наявні піки з часом виходу близько 17 хв. Результати дослідження кожного ідентифікованого компонента або не ідентифікованого (згідно до площі його піку) методом внутрішньої нормалізації наведено у таблиці 1, типові хроматограми приведено на рис. 2.1, 2.2, 2.3, 2.4.

Результати ідентифікації методами ТШХ і ВЕРХ підтверджують різницю складу і співвідношення фенольних сполук у зразках плодів моркви дикої, зібраних у Західному регіоні України та Криму. Для зразків ЛРС Західного регіону головними характерними компонентами були ферулова кислота, рутин, лютеолін та апігенін, а для зразків плодів моркви дикої, зібраних у Криму, – хлорогенова кислота, гіперозид і компонент з часом виходу піку близько 17 хв. Аналізуючи результати ідентифікації

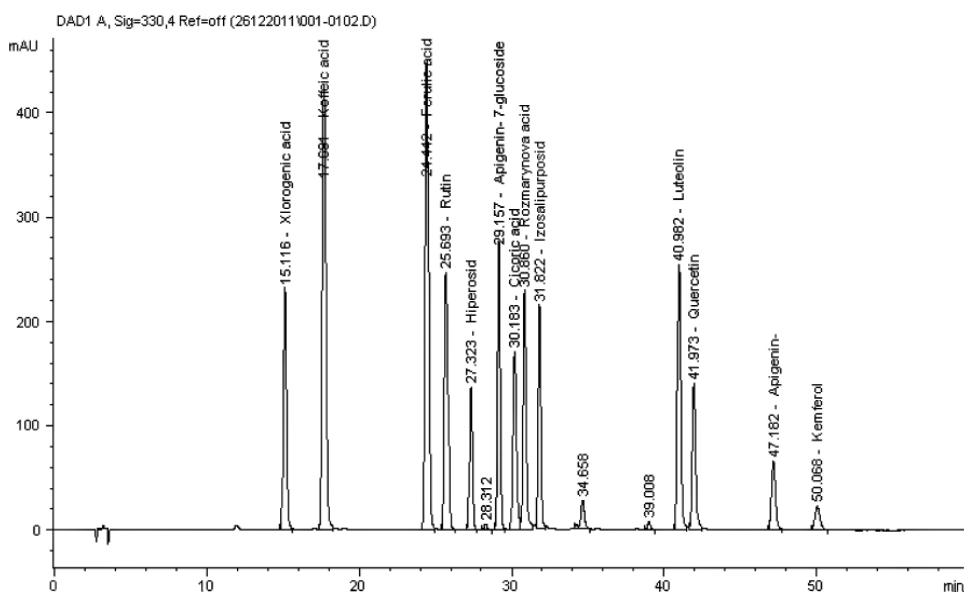


Рис. 2.1 Типова хроматограма розчину порівняння.

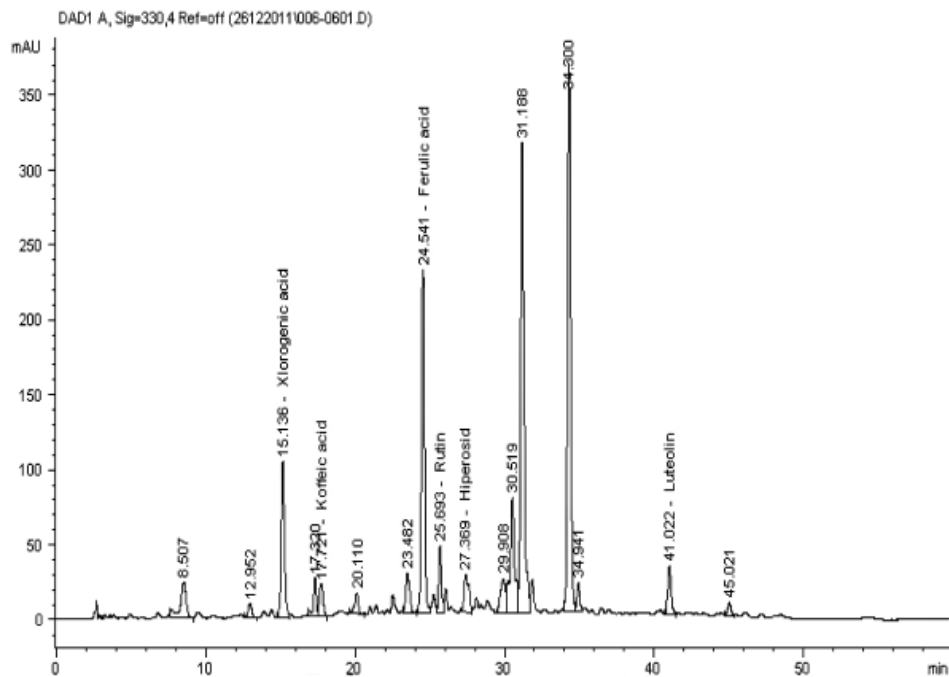


Рис. 2.1. Типова хроматограма випробовуваного розчину (зразок 1).

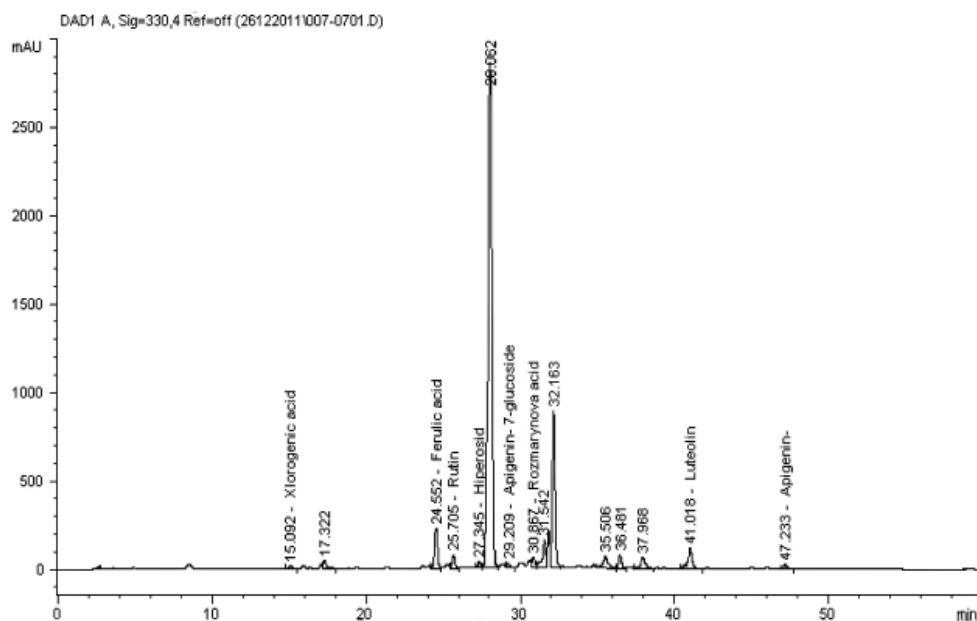


Рис. 2.1. Типова хроматограма випробовуваного розчину (зразки 2–7)

хроматографічними методами аналізу встановили, що в усіх досліджуваних зразках, зібраних у Західному регіоні України, міститься лутеолін. Саме тому для цих зразків обрано лутеолін як маркер для ідентифікації та розрахунку кількісного вмісту флавоноїдів. У досліджуваних кримських зразках міститься гіперозид, тому як маркер для ідентифікації та розрахунку кількісного вмісту флавоноїдів у сировині кримського регіону визначено гіперозид.

В обраних умовах прободготовки розчин порівняння лутеоліну мав максимум поглинання при 395 нм

( $\lambda_{\text{макс}} = 395$  нм, рис. 3), випробовувані розчини мали максимум поглинання при  $395 \pm 3$  нм, що відповідало максимуму поглинання лутеоліну в умовах кількісного визначення. Диференціальні спектри, що відповідають зразкам 6 та 7 мали два максимуми поглинання при 397 нм та 415 нм (рис. 4), зразки 1, 3, 5 мали чіткий максимум при 393 нм і розмите плече при 415–420 нм (рис. 5). Інші зразки мали один максимум при 394 нм (рис. 6). Наявність другого максимуму чи плеча свідчить про різноманітність флавоноїдного складу моркви дикої плодів, проте переважає група лутеоліну. Зразки 8 та 9 мали чіткий

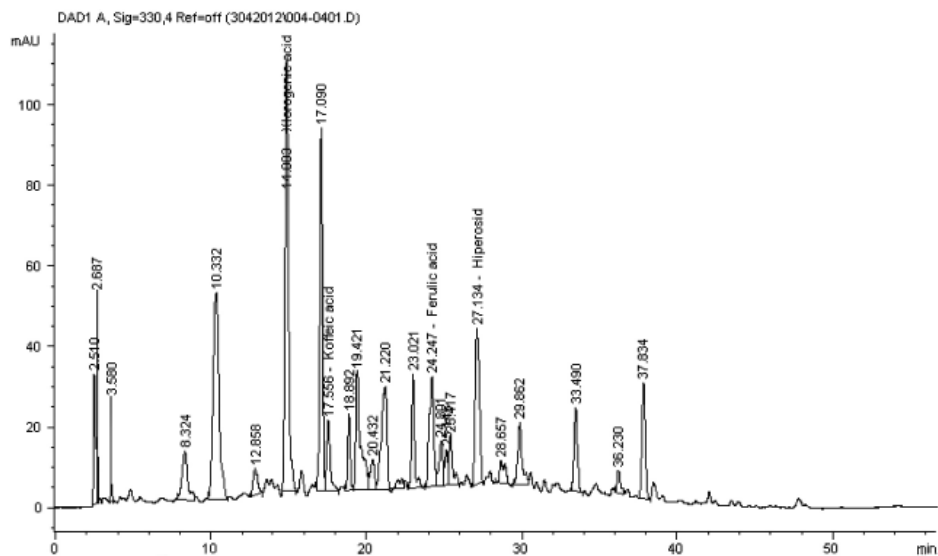


Рис. 2.1. Типова хроматограма випробовуваної розчину (зразки 8,9).

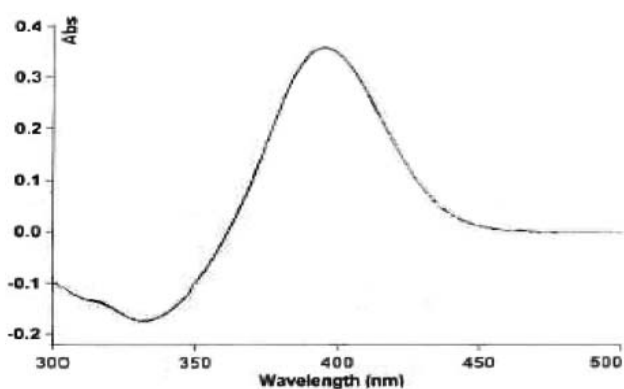


Рис. 3. Диференційний електронний спектр поглинання розчину поглинання лютеоліну в умовах кількісного визначення.

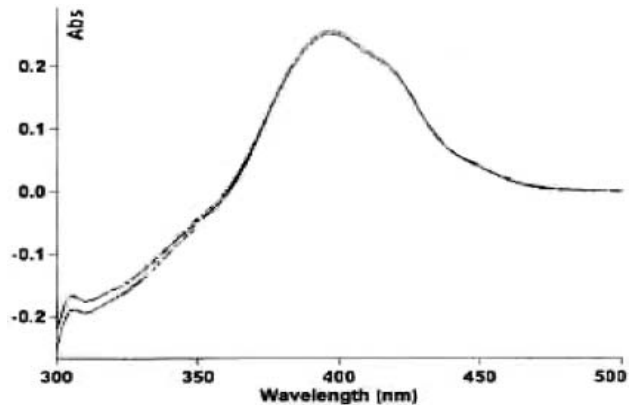


Рис. 5. Диференційний електронний спектр поглинання для зразків 2, 3, 4 в умовах кількісного визначення.

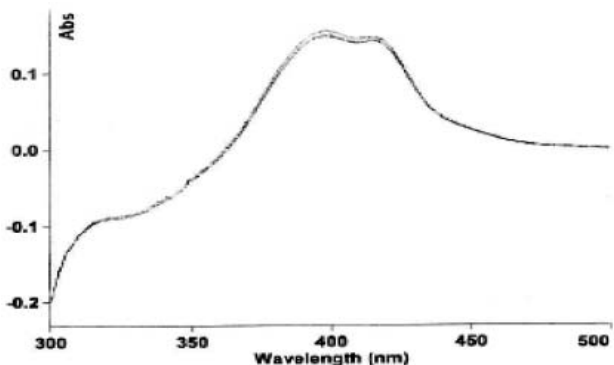


Рис. 4. Диференційний електронний спектр поглинання для зразків 1, 6 в умовах кількісного визначення.

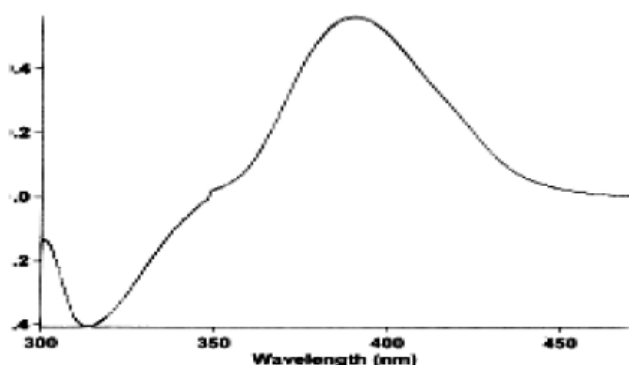


Рис. 6. Диференційний електронний спектр поглинання для зразків 5, 7 в умовах кількісного визначення.

максимум поглинання при  $420 \pm 2$  нм (рис. 7), що характерно для флавоноїдів рутину та гіперозиду. Це підтверджують і результати ідентифікації та кількісної оцінки флавоноїдів методом ВЕРХ, наведені в таблиці 1.

У результаті досліджень встановлено, що сумарний вміст флавоноїдів у зразках моркви дикої плодів, зібраних у Західному регіоні України (зразки № 1–7) становив від 0,114 % до 0,792% у перерахунку на лютеолін. У

зразках 8, 9, зібраних у Криму, вміст суми флавоноїдів визначали в перерахунку на гіперозид, оскільки для них максимум поглинання у вибраних умовах пробопідготовки спостерігали при  $420 \pm 2$  нм. Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид у зразках 8, 9 був суттєво меншим і становив 0,071–0,080%. Результати визначення суми флавоноїдів у досліджених зразках ЛРС наведено у таблиці 2.

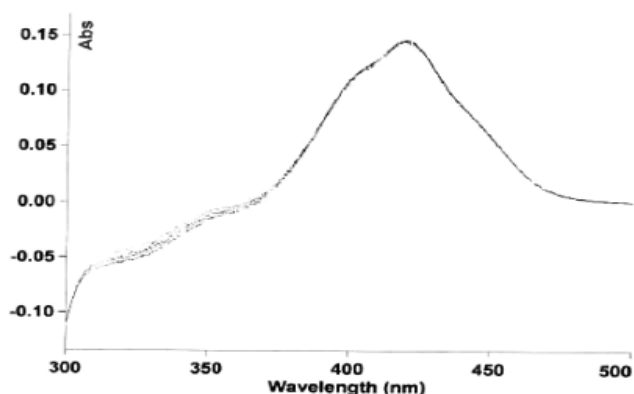


Рис. 7. Диференційний електронний спектр поглинання для зразків 8, 9 в умовах кількісного визначення.

Таблиця 2

**Вміст суми флавоноїдів  
у досліджуваних зразках моркви дикої плодів**

Зразок №	Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на лютеолін, %
1	0,353 ± 0,008
2	0,792 ± 0,007
3	0,261 ± 0,005
4	0,434 ± 0,004
5	0,645 ± 0,006
6	0,114 ± 0,003
7	0,213 ± 0,005
	Вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид, %
8	0,080 ± 0,004
9	0,071 ± 0,003

**Список літератури**

1. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. А.М. Гродзінський. – К.: Голов. ред. УРЕ, 1989. – 544 с.
2. Котова Е.Е. Стандартизація плодів глоду та лікарських препаратів на їх основі за показником «Кількісне визначення» / Е.Е. Котова, А.Г. Котов, Н.П. Хованська // Фармаком. – 2004. – № 4. – С. 35–41.
3. Морковь дикая, морковь обыкновенная / Б. Зузук, Р. Куцик, И. Гресько [и др.] // Провизор. – 2005. – №10. – С. 37–41.
4. Морковь дикая, морковь обыкновенная / Б. Зузук, Р. Куцик, И. Гресько [и др.] // Провизор. – 2005. – №11. – С. 30–33.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Доповнення 2. – Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. – 620 с.
6. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – 556 с.

**Відомості про авторів:**

Смалюх О.Г., начальник аналітичної лабораторії Дослідного центру АТ «Галичфарм».  
Сур С.В., д. фарм. н., директор департаменту з досліджень і розробок Корпорації «Артеріум».

Надійшла в редакцію 21.10.2012 р.