



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,  
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2007111089/15, 26.03.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
26.03.2007

(45) Опубликовано: 20.07.2008 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ЗЕНКЕВИЧ И.Г., КОСМАН В.М., ТКАЧЕВ К.Г. Некоторые особенности количественного анализа компонентов эфирных масел в высокоэффективной жидкостной хроматографии. - Растительные ресурсы, №1, 1999, с.128-137. SU 2025717 C1, 30.12.1994. SU 1456856 A1, 07.02.1989. БАНАЕВА Ю.А., ПОКРОВСКИЙ Л.М., ТКАЧЕВ А.В. Исследование химического состава эфирного масла (см. прод.)**

Адрес для переписки:

167982, Республика Коми, г.Сыктывкар, ул.  
Коммунистическая, 28, Институт биологии Коми  
НЦ УрО РАН, Пат. пов. Л.Б. Печерской

(72) Автор(ы):

**Алексеева Людмила Ивановна (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Институт биологии Коми научного центра  
Уральского отделения Российской академии  
наук (RU)**

## (54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТИМОЛА И КАРВАКРОЛА В ЛЕКАРСТВЕННОМ РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к аналитической химии, а именно к способу количественного определения тимола и карвакрола при совместном присутствии в лекарственном растительном сырье, в экстрактах и настойках растительного сырья высокоэффективной жидкостной хроматографией. Результат достигается тем, что в способе количественного определения тимола и карвакрола при совместном присутствии использовали колонку размером 250×4.6 мм, заполненную силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной

фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38, скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм, с последующим расчетом концентрации тимола и карвакрола по отношению площадей пиков анализируемого и стандартного вещества, в качестве которого используют стандартные растворы тимола карвакрола. Способ позволяет разделить и определить количественное содержание индивидуальных веществ тимола и карвакрола в лекарственном растительном сырье, в экстрактах и настойках растительного сырья, упростить процесс пробоподготовки, уменьшить время анализа и упростить идентификацию веществ. 1 табл.

(56) (продолжение):

представителей рода *Thymus L.*, произрастающих на Алтае. - Химия растительного сырья, №3, 1999, с.41-48.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,  
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

**G01N 33/15** (2006.01)**G01N 30/02** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2007111089/15, 26.03.2007**(24) Effective date for property rights: **26.03.2007**(45) Date of publication: **20.07.2008 Bull. 20**

Mail address:

**167982, Respublika Komi, g.Syktyvkar, ul.  
Kommunisticheskaja, 28, Institut biologii  
Komi NTs UrO RAN, Pat. pov. L.B. Pecherskoj**

(72) Inventor(s):

**Alekseeva Ljudmila Ivanovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Institut biologii Komi nauchnogo tsentra  
Ural'skogo otdelenija Rossijskoj akademii  
nauk (RU)**

**(54) QUANTITATIVE METHOD OF DETERMINING THYMOL AND CARVACROL IN MEDICINAL PLANT RAW MATERIAL**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention pertains to the quantitative method of determining thymol and carvacrol in medicinal plant raw material, in extracts and infusions of plant raw material using high-performance liquid chromatography. The result is attained by that, in the quantitative measurement of thymol and carvacrol present in the extract, a column with dimensions 250×4.6 mm is used. The column is filled with silica gel with grafted straight alkyl groups, in which the number of atoms equals sixteen (C 16), with particle size of 7 mcm. The mobile phase used is a methanol-water solution with ratio of 62:38.

The speed of the mobile phase is 1 ml/min. Detection is done using a UV-detector with wavelength of 277 nm, with subsequent calculation of thymol and carvacrol relative to the area of peaks of the analysed and standard substance. The standard substance used is a standard solution of thymol-carvarol.

EFFECT: method allows for separation and quantitative measurement of content of separate thymol and carvacrol in medicinal raw material, in extracts and infusions of plant raw material, simplifies the sample preparation process, reduces the time of analysing and simplifies identification of the substance.

8 ex, 1 tbl

Изобретение относится к аналитической химии и может быть использовано для количественного определения тимола и карвакрола при их совместном присутствии в лекарственном растительном сырье, в экстрактах и настойках растительного сырья.

Известен способ количественного определения тимола в этанольных экстрактах лекарственного сырья спектрофотометрически (Патент 2025717, Россия, С15 G01N 21/33. Способ количественного определения тимола в лекарственном растительном сырье. / Мазулин А.В., Петренко В.В., Калошина Н.А.; Мазулин А.В.; 4906687/25; Заявл. 31.01.1991; Опубл. 1994.12.30). Недостатком указанного способа является наличие в экстракте растительного сырья сопутствующих веществ, мешающих спектрофотометрическому определению, невозможность определения тимола, минуя стадию осаждения мешающих веществ 10%-ным раствором ацетата свинца.

Известен способ количественного определения в эфирном масле тимола и карвакрола спектрофотометрически (Маркова О.М., Клочков С. В. Охрана окружающей среды, вопросы экологии и контроль качества продукции. М.: НИИТЭХИМ, 1994, вып.2, с.6-7). Недостатком указанного способа является необходимость выделения из растительного материала или экстрактов растений эфирного масла методом перегонки с водяным паром и возможность определения только суммарного содержания тимола и карвакрола.

Известен способ качественного определения тимола с помощью тонкослойной хроматографии (Маркова О.М., Карпенко В.А., Саушкина А.С., Лихота Т.Т. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. 2003. №1. С.99-100). Недостатком указанного способа является невозможность количественного определения тимола, громоздкость и длительность эксперимента.

Известны способы определения тимола и карвакрола методом хромато-масс-спектрометрии и газовой хроматографии (Банаева Ю.А., Покровский Л.М., Ткачев А.В. Исследование химического состава эфирного масла представителей рода *Thymus* L., произрастающих на Алтае // Химия растительного сырья. 1999. №3. С.41-48). Недостатком указанного способа является необходимость большого количества растительного материала, необходимость выделения из растительного материала или их экстрактов эфирного масла методом перегонки с водяным паром, длительность перегонки с водяным паром, длительность анализа, большое количество сопутствующих компонентов эфирного масла и их близкие времена удерживания и вследствие этого трудность идентификации.

Известен способ определения суммарного содержания тимола и карвакрола высокоэффективной жидкостной хроматографией с использованием колонки Силасорб SPH и элюента ацетонитрил - фосфатный буфер (Зенкевич И.Г., Косман В.М., Ткачев К.Г. Некоторые особенности количественного анализа компонентов эфирных масел в высокоэффективной жидкостной хроматографии // Растительные ресурсы. 1999. №1. С.128-137), выбранный в качестве наиболее близкого аналога определения тимола и карвакрола в растительном сырье. Силасорб SPH является немодифицированным силикагелем производства «Lachema» (Спутник хроматографиста. Методы жидкостной хроматографии / Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Воронеж: Изд. Водолей, 2004, стр.156). Недостатком указанного способа является невозможность разделения тимола и карвакрола.

В медицине и парфюмерии широко используются *Thymus serpyllum* (тимьян ползучий, чабрец), *Thymus vulgaris* (тимьян обыкновенный), *Origanum vulgare* (душица обыкновенная), *Ledum palustre* (багульник болотный), *Ledum decumbens* (багульник стелющийся), *Ledum hypoleucum* (багульник-круп), *Ledum macrophyllum* (багульник крупнолистный), *Paeonia anomala* (пион уклоняющийся), *Ruta graveolens* (рута душистая), *Mentha piperita* (мята перечная), их экстракты и настойки, а также препараты на их основе (Фармакогнозия. Атлас: Учебн. пособие. М.: Медицина, 1989. 512 с.). Для этих растений и препаратов, изготовленных на их основе, показана антимикробная, противовоспалительная, антинематоцидная и антиоксидантная активность (Фармакогнозия, 1989), обусловленная высоким содержанием тимола и карвакрола (Couladis M., Tzakou O.,

Kujundzic S., Sokovic M., Mimica N. Chemical analysis and antifungal activity of *Thymus striatus* // *Phytother. Research*. 2004. Vol.18, №1. P.40-42; Kahkonen M.P., Hopia A.I., Vuorela H.J. Rauha J.-P, Pihiaja K., Kujala T.S, Heinonen M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic // *J.Agric. Food Chem*. 1999. №47.

5 P.3954-3962; Korayem M., Hasabo S., Ameen H. Effects and mode of action of some plant extracts on certain plant parasitic nematodes // *J.Pest Science*. 1999. Vol.66, №2. P.32-36).

Растения одного и того же вида, но собранное в различное время, а также различного хемотипа могут резко отличаться содержанием тимола и карвакрола. Например, для *Thymus vulgaris* (тимьяна обыкновенного) было показано, что растения, где преобладает тимол и карвакрол, имеют высокую антиоксидантную активность в сравнении с растениями, где преобладает ланоолол (Jukic M., Milos M. *Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (Thymus vulgarae L.)* // *Croatia Chemica Acta*. 2005. Vol.78, №1. P.105-110).

15 Задачей, на которую направлено изобретение, является определения тимола и карвакрола в растительном сырье, в экстрактах и настойках растительного сырья.

Применяемый способ позволяет расширить спектр применения, разделить и определить количественное содержание индивидуальных веществ тимола и карвакрола в лекарственном растительном сырье, в экстрактах и настойках растительного сырья, упростить процесс пробоподготовки, уменьшить время анализа и упростить идентификацию веществ.

20 Технический результат достигается тем, что способ количественного определения тимола и карвакрола при их совместном присутствии в лекарственном растительном сырье, которое предварительно экстрагируют, в экстрактах и настойках растительного сырья, включающий высокоэффективную жидкостную хроматографию, согласно изобретению используют колонку, заполненную силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм, в качестве подвижной фазы используют раствор метанол - вода при соотношении 62:38 со скоростью подвижной фазы 1 мл /мин, детектирование проводят на УФ-детектере при длине волны 277 нм, с последующим расчетом концентрации тимола и карвакрола по отношению площадей пиков анализируемого и стандартного вещества, в качестве которого используют стандартные растворы тимола и карвакрола соответственно, с учетом его концентрации, объема экстракта, навески сырья или степени разведения исследуемого препарата.

Пример 1.

35 Контроль. Стандартные растворы тимола и карвакрола с концентрацией 0.001 мг/мл анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в различных соотношениях, скорость подвижной фазы 1 мл /мин. Детектирование осуществляли на УФ-детектере при длине волны 277 нм.

Таблица 1		
Элюент	Время удерживания карвакрола, мин	Время удерживания тимола, мин
метанол 100	2.5	2.5
метанол - вода 90:10	3.2	3.2
метанол - вода 70:30	6.8	7.1
метанол - вода 65: 35	8.3	8.9
метанол - вода 62:38	11.0	12.7

Пример 2.

50 Навеску травы чабреца (ООО «Медицинская компания «Народная медицина»») 0.15 г экстрагировали 10 мл 96%-ного метанола при нагревании на водяной бане при 60°C 30 мин. Экстракт анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор

метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл /мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Карвакрол в экстракте травы чабреца не детектировался. Время удерживания тимола составляет 12.7 мин. Количественного содержание тимола в траве чабреца (мг/г) рассчитывали по

5 формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot c_0 \cdot V}{S_0 \cdot m},$$

где  $S_1$  - значение площади пика тимола в экстракте исследуемого образца травы чабреца;

10  $c_0$  - концентрация стандартного раствора карвакрола, мг/мл;

$V$  - объем 96%-ного метанола, в котором экстрагировали навеску травы чабреца, в данном примере равен 10 мл;

$S_0$  - значение площади пика тимола стандартного раствора;

$m$  - навеска травы чабреца, в данном примере равна 0.15 г.

15 Содержание тимола в траве чабреца составляет 0.08 мг/г.

Пример 3.

Навеску травы чабреца (ООО «Медицинская компания «Народная медицина»») 0.15 г экстрагировали 10 мл 96%-ного метанола при нагревании на водяной бане при 60°C 30

20 мин. Экстракт травы чабреца перед анализом предварительно очищали на концентрирующем патроне Диапак С16 (АО «Биохиммак», Россия). К 1 мл экстракта добавляли 3 мл воды, отбирали аликвоту 1 мл и пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (АО «Биохиммак», Россия), предварительно активированный метанолом и промытый дистиллированной водой. Затем патрон промывали

25 последовательно 1 мл воды и 1 мл метанола. Фракцию, полученную при элюировании метанолом, анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (С16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Карвакрол в экстракте травы тимьяна ползучего не детектировался. Количественного содержание тимола в траве чабреца (мг/г) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot c_0 \cdot V \cdot n}{S_0 \cdot m},$$

35 где  $S_1$  - значение площади пика тимола в экстракте исследуемого образца травы чабреца;

$c_0$  - концентрация стандартного раствора карвакрола, мг/мл;

$V$  - объем 96%-ного метанола, в котором экстрагировали навеску травы чабреца, в данном примере равен 10 мл;

40  $n$  - разбавление экстракта перед очисткой на концентрирующем патроне, равно 4;

$S_0$  - значение площади пика тимола стандартного раствора;

$m$  - навеска травы чабреца, в данном примере равна 0.15 г.

Содержание тимола в траве чабреца составляет 0.08 мг/г.

Пример 4.

45 Препарат «Пиносол» (Zentiva, Словацкая Республика) - комбинированный препарат растительного происхождения, содержащий 0.0032 г тимола в 10 мл препарата (0.32 мг/мл), а также масло сосны обыкновенной, масло мяты перечной и масло эвкалипта. К 0.1 мл пиносола добавляли 9.9 мл метанола и нагревали на водяной бане при 60°C 30 мин. Отбирали 1 мл пробы и добавляли 3 мл воды. Аликвоту 1 мл пропускали через концентрирующий патрон Диапак С16 (АО «Биохиммак», Россия), предварительно активированный метанолом и промытый дистиллированной водой. Затем патрон промывали последовательно 1 мл воды и 1 мл метанола. Фракцию, полученную при элюировании метанолом, анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной

силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (С16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Время удерживания карвакрола составляет 11.0 мин, тимол - 12.7 мин. Концентрацию карвакрола (мг/мл) в препарате «Пиносол» рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot c_0 \cdot n_1 \cdot n_2}{S_0},$$

где  $S_1$  - значение площади пика карвакрола исследуемого раствора;

$c_0$  - концентрация стандартного раствора карвакрола, мг/мл;

$n_1$  - разбавление препарата, в данном примере равно 10;

$n_2$  - разбавление перед очисткой на концентрирующем патроне, равно 4;

$S_0$  - значение площади пика карвакрола стандартного раствора.

Концентрация карвакрола в препарате «Пиносол» составляет 0.029 мг/мл.

Концентрацию тимол (мг/мл) в препарате «Пиносол» рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot c_0 \cdot n_1 \cdot n_2}{S_0},$$

где  $S_1$  - значение площади пика тимол исследуемого раствора;

$c_0$  - концентрация стандартного раствора тимол, мг/мл;

$n_1$  - разбавление препарата, в данном примере равно 10;

$n_2$  - разбавление перед очисткой на концентрирующем патроне, равно 4;

$S_0$  - значение площадей пиков тимол стандартного раствора.

Содержание тимол в препарате «Пиносол» составляет 0.420 мг/мл.

Пример 5.

Препарат «Пертуссин» (ЗАО «Эколаб») - препарат растительного происхождения, содержащий 12 г экстракта чабреца жидкого или экстракт тимьяна жидкого в 100 мл препарата. К 1 мл препарата «Пертуссин» добавляли 3 мл воды, отбирали аликвоту 1 мл и пропускали через концентрирующий патрон с Диапак С 16 (АО «Биохиммак», Россия), предварительно активированный метанолом и промытый дистиллированной водой. Затем патрон промывали последовательно 1 мл воды и 1 мл метанола. Фракцию, полученную при элюировании метанолом, анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (С16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Время удерживания карвакрола составляет 11.0 мин. Тимол не детектировался. Концентрацию карвакрола (мг/мл) в препарате «Пертуссин» рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_1 \cdot c_0 \cdot n}{S_0},$$

где  $S_1$  - значение площади пика карвакрола исследуемого раствора;

$c_0$  - концентрация стандартного раствора карвакрола, мг/мл;

$n$  - разбавление перед очисткой на концентрирующем патроне, равно 4;

$S_0$  - значение площади пика карвакрола стандартного раствора.

Концентрация карвакрола (мг/мл) в препарате «Пертуссин» составляет 0.0015 мг/мл.

Пример 6.

Навеску побегов багульника болотного (ЗАО «Фирма «Здоровье»») 0.15 г экстрагировали 10 мл 96%-ного метанола при нагревании на водяной бане при 60°C 30 мин. Экстракт фильтровали и анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (С-16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл /мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Карвакрол не

детектировался. Время удерживания тимола составляет 12.7 мин. Количественное содержание тимола в побегах багульника болотного рассчитывали аналогично примеру 2. Содержание тимола в побегах багульника болотного составляет 0.156 мг/г.

Пример 7.

5 Навеску травы душицы (ООО «Медицинская компания «Народная медицина»») 0.15 г экстрагировали 10 мл 96%-ного метанола при нагревании на водяной бане при 60°C 30 мин. Экстракт фильтровали и анализировали на колонке размером 250×4.6 мм, заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы  
10 использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл/мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Время удерживания карвакрола составляет 11.0 мин, тимола - 12.7 мин. Количественное содержание карвакрола и тимола в траве душицы рассчитывали аналогично примеру 2. Содержание карвакрола в траве душицы составляет 0.035 мг/г.  
15 Содержание тимола в траве душицы составляет 0.132 мг/г.

Пример 8.

Навеску листьев мяты перечной (ООО «Медицинская компания «Народная медицина»») 0.15 г экстрагировали 10 мл 96%-ного метанола при нагревании на водяной бане при 60°C 30 мин. Экстракт фильтровали и анализировали на колонке размером 250×4.6 мм,  
20 заполненной силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм. В качестве подвижной фазы использовали раствор метанол - вода в соотношении 62:38 (по объему), скорость подвижной фазы 1 мл /мин. Детектирование осуществляли на УФ-детекторе при длине волны 277 нм. Время удерживания карвакрола составляет 11.0 мин, тимола - 12.7 мин.  
25 Количественное содержание карвакрола и тимола в листьях мяты перечной рассчитывали аналогично примеру 2. Содержание карвакрола в листьях мяты перечной составляет 0.093 мг/г. Содержание тимола в листьях мяты перечной составляет 0.110 мг/г.

30 Таким образом, применение предлагаемого способа позволяет определить количественно содержание тимола и карвакрола в лекарственном растительном сырье, в экстрактах и настояках растительного сырья.

#### Формула изобретения

Способ количественного определения тимола и карвакрола при их совместном присутствии в лекарственном растительном сырье, которое предварительно экстрагируют,  
35 в экстрактах и настояках растительного сырья, включающий высокоэффективную жидкостную хроматографию, отличающийся тем, что используют колонку, заполненную силикагелем с привитыми прямыми алкильными группами, число атомов в которых равно шестнадцати (C16), с размером частиц 7 мкм, в качестве подвижной фазы используют раствор метанол - вода при соотношении 62:38 со скоростью подвижной фазы 1 мл/мин,  
40 детектированием на УФ-детекторе при длине волны 277 нм, с последующим расчетом концентрации тимола и карвакрола по отношению площадей пиков анализируемого и стандартного вещества, в качестве которого используют стандартные растворы тимола и карвакрола соответственно, с учетом его концентрации, объема экстракта, навески сырья или степени разведения исследуемого препарата.  
45

50