



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53863** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61K 31/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ МЕЛІСИ ЛІКАРСЬКОЇ В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

2

(21) u201003040

(22) 17.03.2010

(24) 25.10.2010

(46) 25.10.2010, Бюл.№ 20, 2010 р.

(72) ЦУРКАН ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
КОВАЛЬЧУК ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА, ГУДЗЕНКО
АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМА-
КОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"

(57) Спосіб стандартизації меліси лікарської в ба-
гатокомпонентних рослинних сумішах, який **відрі-**

зняється тим, що листя та траву меліси лікарської в рослинних сумішах, що містять в своєму складі траву або листя меліси лікарської, плоди глоду колючого, траву кропиви собачої, шишки хмелю, зерна вівса посівного, плоди коріандру, траву буркуну лікарського, визначають за наявністю та вмістом розмаринової кислоти за методом ВЕРХ з використанням рухомої фази з мінімально можливим вмістом органічного розчинника, з попередньої очисткою проби з застосуванням твердофазної екстракції.

Корисна модель належить до галузі фармації, зокрема до фітохімії, і може бути використана для стандартизації лікарської рослинної сировини та рослинних сумішей.

Відомо, що меліса лікарська широко використовується в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складових частин багатокомпонентних рослинних лікарських засобів [1, 2].

Фармакологічна активність меліси лікарської обумовлена наявністю в її складі комплексу біологічно активних речовин, зокрема похідних гідроксикоричної кислоти [1, 2]. Основним представником цього класу сполук в мелісі лікарській є розмаринова кислота, яка за даними літератури має широкий спектр біологічної активності [2, 3].

За прототип нами прийнято спосіб стандартизації сировини меліси лікарської за кількісним вмістом суми гідроксикоричних кислот, в перерахунку на розмаринову кислоту, що проводиться за допомогою методу УФ-спектрофотометрії. В прототипі адсорбція досліджуваних розчинів вимірюється за довжини хвилі 326нм, та при розрахунку вмісту гідроксикоричних кислот використовується

коефіцієнт екстинції розмаринової кислоти за вказаної довжини хвилі [4].

Недоліком існуючого способу стандартизації сировини є те, що найближчий аналог передбачає стандартизацію моносировини меліси лікарської.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині трави меліси лікарської в багатокомпонентних рослинних сумішах. Зокрема, до складу яких входить трава меліси лікарської, плоди глоду колючого, трава кропиви собачої, шишки хмелю, зерна вівса посівного, плоди коріандру та трава буркуну лікарського. Зазначена лікарська сировина широко використовується для виготовлення як монопрепаратів так і полікомпонентних фітозасобів що представлені на фармацевтичному ринку України [5, 6].

За даними проведених досліджень в сировині меліси лікарської в значній мірі міститься біологічно активна речовина розмаринова кислота. Вміст розмаринової кислоти в сировині трави меліси лікарської, зібраній в різних регіонах України, представлені в таблиці 1.

(19) **UA** (11) **53863** (13) **U**

Таблиця 1

Вміст розмаринової кислоти в сировині меліси лікарської

Сировина трави меліси лікарської, регіон та рік заготівлі, n=5	Вміст розмаринової кислоти (%) в перерахунку на висушену сировину, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$
Київська область, 2008 р.	1,648±0,115
Одеська область, 2008 р.	1,4634±0,107
Республіка Крим, 2008 р.	1,931±0,110

Згідно даних, представлених в табл.1, вміст розмаринової кислоти в досліджуваній сировині лежить в межах від 1,4634±0,107% до 1,931±0,110% в перерахунку на висушену сировину.

Процес ідентифікації та кількісного визначення розмаринової кислоти як компонента сировини меліси лікарської в багатокомпонентних рослинних сумішах полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення розмаринової кислоти як компонента меліси лікарської та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини меліси лікарської (листя, трава) в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності розмаринової кислоти та визначення її вмісту, і таким чином забезпечити можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина меліси лікарської.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення розмаринової кислоти як компонента меліси лікарської за допомогою методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) в присутності біологічно активних речовин інших рослин. Це досягається застосуванням твердофазної екстракції для очищення досліджуваних розчинів від заважаючих речовин. При цьому використовується рухома фаза наступного складу: ацетонітрил - вода - оцтова кислота (17:80:3), застосування якої дозволяє добитися розділення піків розмаринової кислоти меліси лікарської та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклад 1: 7г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: трави меліси лікарської - 1г, плодів глodu колючого - 1г, трави кропиви собачої - 1г, шишок хмелю - 1г, зерен вівса посівного - 1г, плодів коріандру - 1г, трави буркуну лікарського - 1г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 100мл суміші метанол - вода у співвідношенні 70:30 та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 60 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100мл, доводять до мітки сумішшю метанол - вода (70:30) та перемішують. До 5мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація метанолу становила 20%, та пропускають отриманий зразок через попередньо активованій (метанол 5мл) та промитий 10мл води патрон для твердо-фазної екстракції

"Superclean Ic-18 SPE Tubes 1 ml" виробництва фірми Supeico (США). Патрон промивають 30мл 20% розчину метанолу. Отриманий розчин випаровують у вакуумі досуха та сухий залишок розчиняють в 5мл 70% метанолу, фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45мкм.

По 5мкл досліджуваного розчину та розчину стандарту розмаринової кислоти поперемінне хроматографують в наступних умовах: колонка C18 X-Тегга, розміром 250мм x 4,6мм, розмір часток 5мкм; рухома фаза: ацетонітрил - вода - оцтова кислота (17:80:3); температура колонки 30°C; довжина хвилі детектування 330нм; швидкість потоку рухомої фази 1мл/хв.

Вміст розмаринової кислоти в досліджуваній багатокомпонентній рослинній суміші (в %) обчислюється за наступною формулою:

$$X = \frac{A_{\text{пр}} * C_{\text{ст}} * 100 * 100 * 100}{A_{\text{ст}} * m_{\text{пр}} * (100 - W)};$$

де $A_{\text{пр}}$ - площа піку розмаринової кислоти на хроматограмі досліджуваного розчину;

$A_{\text{ст}}$ - площа піку розмаринової кислоти на хроматограмі стандартного розчину розмаринової кислоти;

$C_{\text{ст}}$ - концентрація розмаринової кислоти в стандартному розчині розмаринової кислоти, г/мл;

$m_{\text{пр}}$ - наважка досліджуваної сировини, г;

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування стандартного розчину розмаринової кислоти: 0,010г достовірного стандарту розмаринової кислоти вміщують в мірну колбу місткістю 25мл, розчиняють в 15мл суміші метанол-вода (70:30), доводять тією ж сумішшю до мітки та перемішують. 1мл отриманого розчину вміщують в мірну колбу місткістю 50мл, доводять до мітки сумішшю метанол-вода (70:30) та перемішують.

На хроматограмі досліджуваного розчину повинен бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку розмаринової кислоти на хроматограмі стандартного розчину розмаринової кислоти.

На підставі експериментальних даних для сировини трави меліси лікарської нами рекомендований наступний граничний вміст розмаринової кислоти: не менше 1,2% в перерахунку на висушену сировину.

За вказаних вище умов було проаналізовано досліджувані розчини, приготовлені наступним чином:

Моделна суміш без вмісту меліси лікарської.

6г (точна наважка) подрібненої суміші лікарсь-

ких рослин наступного складу: плодів глоду колючого - 1г, трави кропиви собачої - 1г, шишок хмелю - 1г, зерен вівса посівного - 1г, плодів коріандру - 1г, трави буркуну лікарського - 1г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 100мл суміші метанол - вода (70:30) та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 60 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100мл, доводять до мітки сумішшю метанол - вода (70:30) та перемішують. До 5мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація метанолу становила 20%, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5мл) та промитий 10мл води патрон для твердо-фазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 1 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 30мл 20% розчином метанолу. Отриманий розчин випаровують у вакуумі досуха та сухий залишок розчиняють в 5мл 70% метанолу, фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45мкм.

Екстракт трави меліси лікарської.

1г трави меліси лікарської вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 100мл суміші метанол - вода (70:30) та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 60 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100мл, доводять до мітки сумішшю метанол - вода (70:30) та перемішують. До 5мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація метанолу становила 20%, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5мл) та промитий 10мл води патрон для

твердо-фазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 1 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 30мл 20% розчину метанолу. Отриманий розчин випаровують у вакуумі досуха та сухий залишок розчиняють в 5мл 70% метанолу, фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45мкм.

Хроматограми екстракту меліси лікарської, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту меліси лікарської представлені на фіг.1, 2 та 3 відповідно.

На хроматограмах екстракту меліси лікарської та досліджуваного розчину присутній пік цикорієвої кислоти (фіг.1 та фіг.2 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту меліси лікарської (фіг.3) - даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять трава меліси лікарської, плоди глоду колючого, трава кропиви собачої, шишки хмелю, зерна вівса посівного, плоди коріандру та трава буркуну лікарського, присутність та вміст меліси лікарської можна визначати за наявністю та кількісним вмістом розмаринової кислоти.

Винахід обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини меліси лікарської в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входить меліса лікарська, плоди глоду колючого, трава кропиви собачої, шишки хмелю, зерна вівса посівного, плоди коріандру та трава буркуну лікарського за наявністю та вмістом розмаринової кислоти як фізіологічно активного компонента, що присутній в траві та листях меліси лікарської. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та винаході наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика способів стандартизації меліси лікарської

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	Сума оксикоричних кислот	Моносировина меліси лікарської	Метод УФ-спектрофотометрії Можливість кількісної стандартизації моно сировини меліси лікарської; неспецифічне визначення
2	Корисна модель	Розмаринова кислота	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: трава меліси лікарської, плоди глоду колючого, трава кропиви собачої, шишки хмелю, зерна вівса посівного, плоди коріандру та трава буркуну лікарського	Метод ВЕРХ Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей меліси лікарської; специфічне визначення

Джерела інформації:

1) Зузук Б.М., Куцик Р.В. Мелисса лекарственная (Melissa Officinalis L.)// Провизор. - 2002. - № 1. - С. 36-39.

2) Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Современная энциклопедия лекарственных растений. - М.: ОЛМА Медиа Групп, 2007. - 272 с.

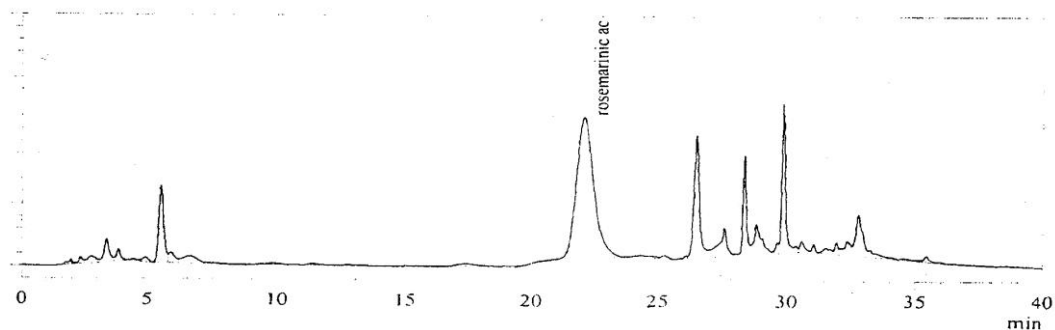
3) Chlabicz J., Galasinski W. The components of

Melissa officinalis L. that influence protein biosynthesis in-vitro // J. Pharm. Pharmacol. - 1986 - Vol. 38, №11 - P. 791-794.

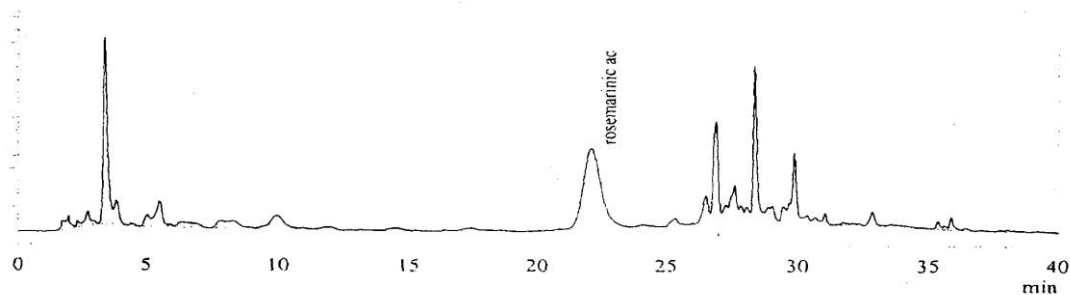
4) Авдеева Е.В., Куркин В.А., Запесочная Г.Г., Болтабекова З.В. Качественный и количественный анализ сырья и настойки Melissa officinalis L.// Распространенные ресурсы. - 1999. - Т. 35. - Вып. 3. - С.116-121.

5) Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 1. / За ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. - К: Моріон, 2007. - 1128 с.

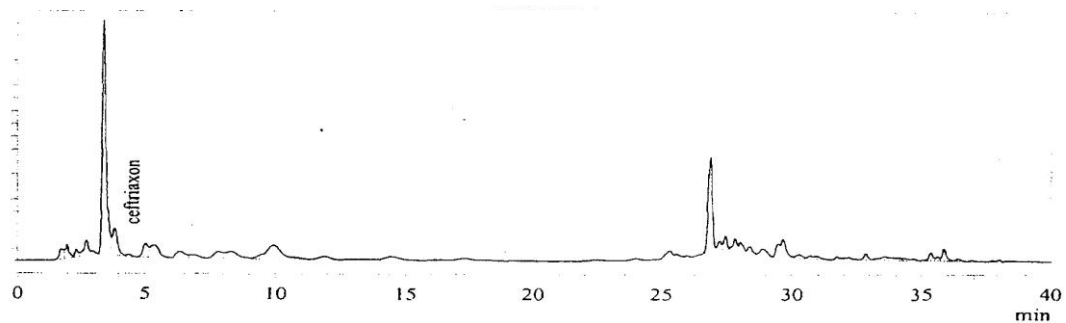
6) Компендиум. Лекарственные препараты 2007: т. 2. / За ред. В.М. Коваленка, О.П. Вікторова. - К: Моріон, 2007. - 1126 с.



Фіг. 1



Фіг.2



Фіг. 3