



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **67509** (13) **U**
(51) **МПК (2012.01)**
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЧИСТОТІЛУ ЗВИЧАЙНОГО (CHELIDONIUM MAJUS L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

2

(21) u201109156

(22) 21.07.2011

(24) 27.02.2012

(46) 27.02.2012, Бюл.№ 4, 2012 р.

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

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

(57) Спосіб стандартизації чистотілу звичайного
(*Chelidonium majus* L.) в багатокомпонентних рос-
линних сумішах з використанням методу високое-
фективної рідинної хроматографії, який **відрізня-**

ється тим, що трава чистотілу звичайного в рос-
линних сумішах, що містять в своєму складі траву
чистотілу звичайного, траву деревію звичайного,
листя м'яти перцевої, квітки ромашки лікарської,
квітки нагідок лікарських, квітки пижмо звичайного
та квітки лаванди колоскової, визначають хрома-
тографуванням в градієнтному режимі з викорис-
танням водно-метанольних рухомих фаз та обер-
нено фазної колонки, з попередньою очисткою
проби, з застосуванням твердофазної екстракції за
нааявністю та вмістом кофеїл-яблучної кислоти,
вміст якої повинен бути не менше ніж 0,03 % у
перерахунку на висушену сировину.

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

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

Даній лікарській сировині притаманний широ-
кий спектр біологічної дії, зокрема жовчогінні, спа-
змолітичні, болезаспокійливі, протизапальні та
протиракові властивості, тощо [3, 4, 5].

За літературними даними протизапальна дія
чистотілу пов'язана з високим вмістом алкалоїдів
та гідроксикоричних кислот [5]. Виходячи з того,
що одним із мажоритарних представників гідрок-
сикоричних кислот в чистотілі є кофеїл-яблучна
кислота [6, 7], розповсюдження якої в рослинній
сировині велими обмежене, вважалося за доціль-
не дослідити можливість використання цієї сполу-
ки в якості маркера для визначення чистотілу в
рослинних сумішах.

За прототип нами взято методику кількісного
визначення рослини в фармакопейній статті на
траву чистотілу, в якій стандартизація сировини
трави чистотілу звичайного проводиться за кількі-
сним вмістом суми алкалоїдів, в перерахунку на
хелідонін, що проводиться за допомогою методу

УФ-спектрофотометрії. В прототипі адсорбція дос-
ліджуваних розчинів після дериватизації вимірю-
ється за довжини хвилі 570 нм. Як дериватизатор
використовується розчин хромотропової кислоти
[8].

Недоліком існуючого способу стандартизації
сировини є те, що найближчий аналог передбачає
стандартизацію моносировини чистотілу звичайно-
го.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб
ідентифікації та визначення вмісту біологічно ак-
тивних речовин, що містяться в сировині трави
чистотілу звичайного в багатокомпонентних рос-
линних сумішах. Зокрема, до складу яких входить
трава чистотілу звичайного, трава деревію зви-
чайного, листя м'яти перцевої, квітки ромашки лі-
карської, квітки нагідок лікарських, квітки пижмо
звичайного та квітки лаванди колоскової. Зазначе-
на лікарська сировина широко використовується
для виготовлення як монопрепаратів так і поліком-
понентних фітозасобів трави чистотілу звичайного,
що представлені на фармацевтичному ринку Укра-
їни [1, 2].

Як зазначалося, в сировині трави чистотілу
звичайного міститься біологічно активна речовина
кофеїл-яблучна кислота [6, 7]. Виходячи з цього, з
застосуванням методу високоефективної рідинної
хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено
хроматографічну методику визначення кофеїл-

(13) **U**
(11) **67509**
(19) **UA**

яблучної кислоти в сировині трави чистотілу звичайного. За розробленою методикою було проаналізовано траву чистотілу звичайного вітчизняного виробництва. Зокрема, було проаналізовано траву чистотілу в пачках по 50 г (Виробник: ЗАТ "Ліктрави" (серії: 10111, 20111, 30311)).

Згідно з отриманими даними, в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено кофеїл-яблучну кислоту. Її вміст в досліджуваній сировині знаходився в межах від 0,0444±0,0021 % до 0,0604±0,0029 % в перерахунку на висушену сировину.

Процес ідентифікації та кількісного визначення кофеїл-яблучної кислоти, як компонента сировини чистотілу звичайного в багатокомпонентних рослинних сумішах, полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення кофеїл-яблучної кислоти як компонента чистотілу звичайного та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини трави чистотілу звичайного в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності кофеїл-яблучної кислоти та визначення її вмісту, і таким чином забезпечити можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина трави чистотілу звичайного.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення кофеїл-яблучної кислоти як компонента чистотілу звичайного за допомогою методу ВЕРХ в присутності біологічно активних речовин інших рослин. Це досягається застосуванням твердофазної екстракції для очищення досліджуваних розчинів від заважаючих речовин. При цьому використовується градієнтне елюювання з використанням водно-метанольної рухомої фази, застосування якої дозволяє добитися розділення піків кофеїл-яблучної кислоти чистотілу звичайного та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: До 1 г рослинної суміші наступного складу: трави чистотілу звичайного - 1 г, трави деревію звичайного - 1 г, листя м'яти перцевої - 1 г, квіток ромашки лікарської - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, квіток пижмо звичайного - 1 г та квіток лаванди колоскової - 1 г, додають 25 мл 40 % етилового спирту та екстрагують в ультразвуковій бані "Transsonic T 460/H" (Німеччина) при температурі 40 °C протягом 30 хвилин. Отриманий розчин фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 5 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердо-фазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 5 % етилового спирту. Пробу із патрону вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

По 5 мкл досліджуваного розчину та розчину достовірного зразку кофеїл-яблучної кислоти поперемінно хроматографують на рідинному хроматографі, обладнаному УФ-детектором в наступних умовах: колонка C18 X-Terra, розміром 150 мм × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм; температура колонки - 35 °C; довжина хвилі детектування - 330 нм; швидкість потоку рухомої фази - 1 мл/хв; об'єм проби, що вводиться - 5 мкл;
рухома фаза:

Час хроматографування (хв.)	Елюент А, %	Елюент Б, %
0-1	100	0
1-40	100→76	0→24
40-45	76→20	24→80
45-50	20	80
50-65	100	0

Елюент А: метанол - вода (5:95) (рН суміші доведено до 2,3 ортофосфорною кислотою);

Елюент Б: метанол.

Вміст кофеїл-яблучної кислоти в досліджуваній багатокомпонентній рослинній суміші (в %) обчислюється за наступною формулою:

$$X = \frac{A_{\text{пр}} \cdot C_{\text{ст}} \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{ст}} \cdot m_{\text{пр}} \cdot (100 - W)};$$

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

$A_{\text{ст}}$ - площа піку кофеїл-яблучної кислоти на хроматограмі розчину порівняння кофеїл-яблучної кислоти;

$C_{\text{ст}}$ - концентрація кофеїл-яблучної кислоти в розчині порівняння кофеїл-яблучної кислоти, г/мл;

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

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування розчину порівняння кофеїл-яблучної кислоти: 0,005 г (точна наважка) достовірного зразку кофеїл-яблучної кислоти вміщують в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 15 мл 40 % етилового спирту, доводять до мітки тим же розчинником та перемішують. В мірну колбу місткістю 10 мл вміщують 1 мл отриманого розчину, доводять до мітки метанолом та перемішують.

На хроматограмі досліджуваного розчину повинен бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку кофеїл-яблучної кислоти на хроматограмі розчину порівняння кофеїл-яблучної кислоти.

На підставі експериментальних даних для сировини трави чистотілу звичайного нами рекомендований наступний граничний вміст кофеїл-яблучної кислоти: не менше 0,03 % в перерахунку на висушену сировину.

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

Моделна суміш без вмісту чистотілу звичайного.

До 1 г рослинної суміші наступного складу: трави деревію звичайного - 1 г, листя м'яти перцевої - 1 г, квіток ромашки лікарської - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, квіток пижмо звичайного - 1 г

та квіток лаванди колоскової - 1 г, додають 25 мл 40 % етилового спирту та екстрагують в ультразвуковій бані "Transsonic T 460/H" (Німеччина) при температурі 40 °C протягом 30 хвилин. Отриманий розчин фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 5 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердо-фазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 5 % етилового спирту. Пробу із патрону вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Екстракт трави чистотілу звичайного.

До 0,2 г сировини додають 25 мл 40 % етилового спирту та екстрагують в ультразвуковій бані "Transsonic T 460/H" (Німеччина) при температурі 40 °C протягом 30 хвилин. Отриманий розчин фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 5 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердо-фазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 5 % етилового спирту. Пробу із патрону вимивають 10 мл метилового спирту. Отриманий аналіт концентрують за допомогою випаровування до об'єму 5 мл та фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45 мкм.

Хроматограми стандартного розчину кофеїл-яблучної кислоти, екстракту трави чистотілу звичайного, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту трави чистотілу звичайного представлені на фіг.1, фіг.2, фіг.3 та фіг.4 відповідно.

За даних умов аналізу пік кофеїл-яблучної кислоти має час виходу біля 29,2 хвилин (фіг.1).

На хроматограмах екстракту трави чистотілу звичайного та досліджуваного розчину присутній пік кофеїл-яблучної кислоти (фіг.2 та фіг.3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту трави чистотілу (фіг.4) - даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять трава чистотілу звичайного, трава деревію звичайного, листя м'яти перцевої, квітки ромашки лікарської, квітки нагідок лікарських, квітки пижмо звичайного та квітки лаванди колоскової, присутність та вміст трави чистотілу звичайного можна визначати за наявністю та кількісним вмістом кофеїл-яблучної кислоти.

Корисна модель обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини трави чистотілу звичайного в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входить трава чистотілу звичайного, трава деревію звичайного, листя м'яти перцевої, квітки ромашки лікарської, квітки нагідок лікарських, квітки пижмо звичайного та квітки лаванди колоскової за наявністю та вмістом кофеїл-яблучної кислоти як фізіологічно активного компонента, що присутній в траві чистотілу звичайного. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та винаході наведено в таблиці.

Таблица

Характеристика способів стандартизації трави чистотілу звичайного

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	сума алкалоїдів, в перерахунок на хелідонін	Моносировина трави чистотілу звичайного	Метод УФ-спектрофотометрії. Можливість кількісної стандартизації моносировини трави чистотілу звичайного; неспецифічне визначення
2	Корисна модель	кофеїл-яблучна кислота	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: трава чистотілу звичайного, трава деревію звичайного, листя м'яти перцевої, квітки ромашки лікарської, квітки нагідок лікарських, квітки пижмо звичайного та квітки лаванди колоскової	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей трави чистотілу звичайного; специфічне визначення

Джерела інформації:

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

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

3) Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник / Відп. ред. Гродзінський А.М. - К.: Головна ред. УРЕ, 1989. - 544 с.

4) Универсальная энциклопедия лекарственных растений / Сост. Путырский И., Прохоров В. - М.: "Дом". - 2000. - 656 с.

5) Gilca M., Gaman L., Panait E., Stoian I., Atanasiu V. Chelidonium majus-an integrative review: traditional knowledge versus modern findings // Forsch Komplementmed.-2010. - Vol. 17(5). - P. 241-248.

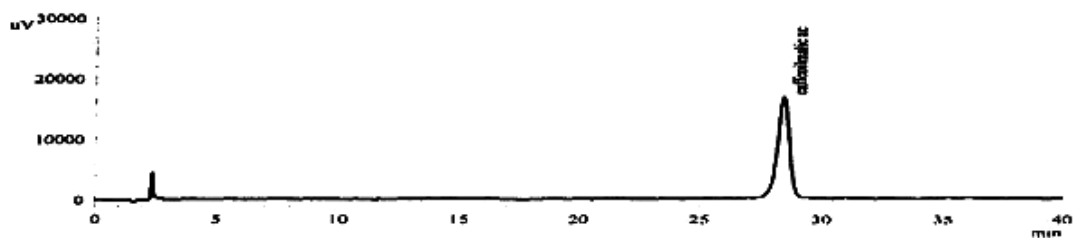
6) Boegge S., Kesper S., Verspohl E., Nahrstedt A. Reduction of ACh-induced contraction of rat

isolated ileum by coptisine, (+)-caffeoylmalic acid, Chelidonium majus, and Corydalis lutea extracts // Planta Med. - 1996. - Vol. 62(2). - P. 173-174.

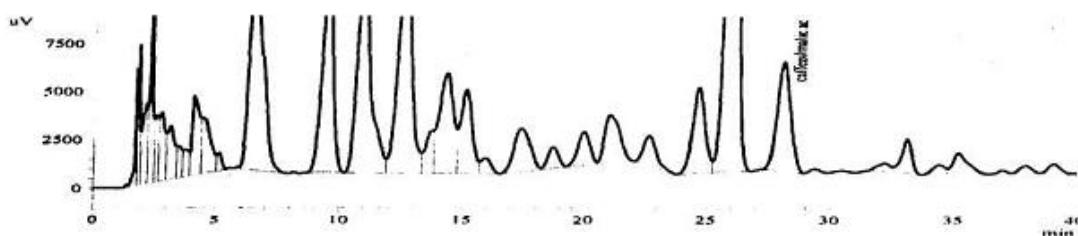
7) Hahn R., Nahrstedt A. Hydroxycinnamic acid derivatives, caffeoylmalic and new caffeoylaldonic

acid esters, from Chelidonium majus // Planta Med.- 1993. - Vol. 59(1). - P. 71-75.

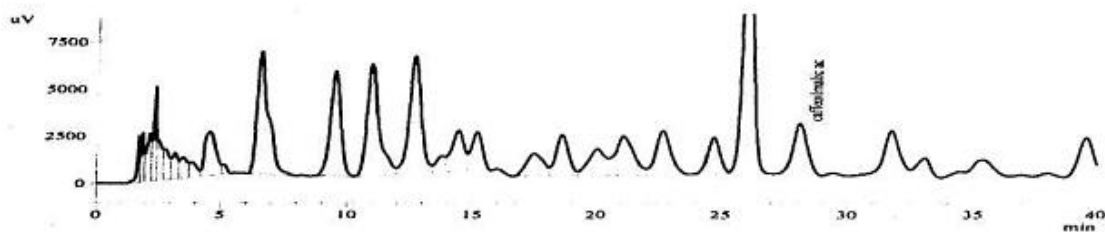
8) Державна Фармакопея України / ДП "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Доповнення 2. - Х.: ДП "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. - 620 с.



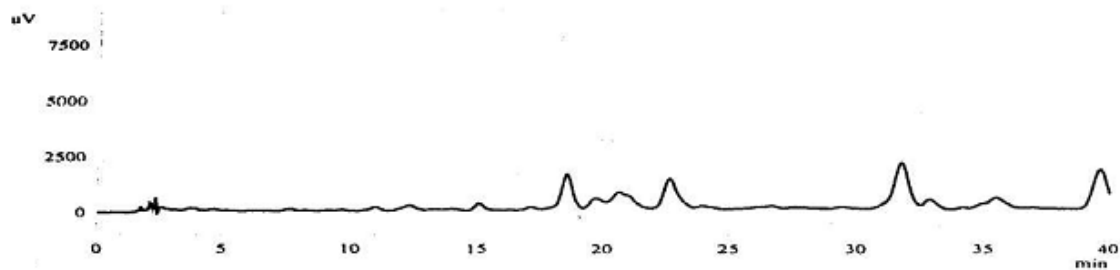
Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3



Фіг. 4