



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **40829** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 30/00
A61K 31/00
A61K 36/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЕХІНАЦЕЇ ПУРПУРОВОЇ В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

(21) u200813823
(22) 01.12.2008
(24) 27.04.2009
(46) 27.04.2009, Бюл.№ 8, 2009 р.
(72) ЦУРКАН ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ,
УА, КОВАЛЬЧУК ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА, УА, ГУ-
ДЗЕНКО АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ, УА
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМА-
КОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", УА
(57) Спосіб ідентифікації сировини ехінацеї пурпу-
рової в рослинних сумішах, який **відрізняється**
тим, що корені, квітки, листя та трава ехінацеї пур-

2

пурової в рослинних сумішах, що містять в своєму
складі траву деревію звичайного, листя кропиви
двodomної, листя м'яти перцевої, корені цикорію
дикого, плоди шипшини, корені з кореневищами
елеутерококу колючого, визначають за наявності
та вмістом цикорієвої кислоти за методом високо-
ефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з вико-
ристанням рухомої фази з мінімально можливим
вмістом органічного розчинника, з попередньою
очисткою проби з застосуванням твердофазної
екстракції.

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

Відомо, що ехінацея пурпурова широко вико-
ристовується в медичній практиці, як у вигляді
монопрепаратів, так і у вигляді складових частин
багатокомпонентних рослинних лікарських засобів
[1].

Фармакологічна активність ехінацеї пурпурової
обумовлена наявністю в її складі комплексу біоло-
гічно активних речовин, що мають різну хімічну
природу, одними з яких є похідні гідроксикоричної
кислоти [2-3]. Основним представником цього класу
сполук в ехінацеї пурпуровій є цикорієва (2,3-
дикофеїлвинна) кислота, яка за даними літератури
має широкий спектр біологічної активності [4].

Відомий спосіб стандартизації сировини ехіна-
цеї пурпурової, що здійснюється за вмістом суми
гідроксикоричних кислот, в перерахунку на цикорі-
єву кислоту, з використанням метода УФ-
спектрофотометрії [5].

За найближчий аналог нами прийнято спосіб
стандартизації сировини ехінацеї пурпурової за
кількісним вмістом суми гідроксикоричних кислот, в
перерахунку на цикорієву кислоту, що проводиться
за допомогою методу УФ-спектрофотометрії. В

найближчому аналозі адсорбція досліджуваних
розчинів вимірюється за довжини хвилі 330нм, та
при розрахунку вмісту гідроксикоричних кислот
використовується коефіцієнт екстинції цикорієвої
кислоти за вказаної довжини хвилі [5].

Недоліком існуючого способу стандартизації
сировини є те, що найближчий аналог передбачає
стандартизацію моносировини ехінацеї пурпуро-
вої, без ідентифікації біологічно активних речовин
ехінацеї пурпурової.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб
ідентифікації та визначення вмісту біологічно ак-
тивних речовин, що містяться в сировині ехінацеї
пурпурової (квітки, листя, корені) в багатокомпе-
нтних рослинних сумішах, до складу яких входить
ехінацея пурпурова, трава деревію звичайного,
листя кропиви двodomної, листя м'яти перцевої,
корені цикорію дикого, плоди шипшини та корені з
кореневищами елеутерококу колючого, які широко
представлені на фармацевтичному ринку України
[1].

За даними проведених нами досліджень в усіх
частинах ехінацеї пурпурової (коріння, листя, кві-
тки, стебло) в значній мірі міститься біологічно ак-
тивна речовина цикорієва кислота. Вміст цикоріє-
вої кислоти в сировині ехінацеї представлений в
таблиці 1.

(19) **UA** (11) **40829** (13) **U**

Таблиця 1.

Вміст цикорієвої кислоти в сировині ехінацеї пурпурової.

Сировина ехінацеї пурпурової, n=5	Вміст цикорієвої кислоти (%) в перерахунку на висушену сировину, $\bar{x} \pm \Delta\bar{x}$
Корені	1,21±0,05
Листя	1,36±0,06
Квітки	1,19±0,06
Стебло	0,34±0,02

Процес ідентифікації та кількісного визначення цикорієвої кислоти як компоненту сировини ехінацеї пурпурової в багатокомпонентних рослинних сумішах полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення цикорієвої кислоти та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі "Спосіб ідентифікації ехінацеї пурпурової в багатокомпонентних рослинних сумішах" поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини ехінацеї пурпурової (коренів, листя, квіток, трави) в багатокомпонентних рослинних сумішах, що містять ехінацею пурпурову, шляхом підтвердження наявності цикорієвої кислоти та визначення її вмісту, за рахунок чого забезпечити можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина ехінацеї пурпурової.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення цикорієвої кислоти як компонента ехінацеї пурпурової за допомогою методу ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) 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 цикорієвої кислоти ехінацеї пурпурової та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклад 1: 7г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: коренів ехінацеї пурпурової - 1г, трави деревію звичайного - 1г, листя кропиви дводомної - 1г, листя м'яти перцевої - 1г, коренів цикорію дикого - 1г, плодів шипшини - 1г, коренів з кореневищами елеутерококу колючого - 1г вносять в конічну колбу, обладнану зворотнім 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". 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 Supelco (США). Патрон промивають 30мл 20% розчином метанолу. Отриманий розчин випаровують у вакуумі досуха та сухий залишок розчи-

няють в 5мл 70% метанолу, фільтрують через фільтр з діаметром пор 0,45мкм.

По 5мкл досліджуваного розчину та розчину стандарту цикорієвої кислоти поперемінно хроматографують в наступних умовах: колонка С18 X-Terra, 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 цикорієвої кислоти в досліджуваній багатокомпонентній рослинній суміші (в %) обчислюється за наступною формулою:

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

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

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

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

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

W - втрата в масі при висушуванні в досліджуваній рослинній суміші.

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

На хроматограмі досліджуваного розчину повинен бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку цикорієвої кислоти на хроматограмі стандартного розчину цикорієвої кислоти (Фіг.1, 2).

На підставі експериментальних даних для сировини ехінацеї пурпурової нами рекомендований наступний граничний вміст цикорієвої кислоти: для листя не менше 1%, для квіток не менше 0,5%, для коренів не менше 0,5% в перерахунку на висушену сировину.

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

Модельна суміш без вмісту ехінацеї пурпурової.

7г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: трави деревію звичайного - 1г, листя кропиви дводомної - 1г, листя

м'яти перцевої - 1г, коренів цикорію дикого - 1г, плодів шипшини - 1г, корені з кореневищами елеутерококу колючого - 1г вносять в конічну колбу, обладнану зворотнім 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". 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 діаметром пор 0,45мкм.

Екстракт коренів ехінацеї пурпурової.

1г коренів ехінацеї пурпурової вносять в конічну колбу, обладнану зворотнім 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". 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 коренів ехінацеї пурпурової (А), досліджуваного розчину (Б) та модельної суміші без вмісту ехінацеї пурпурової (В) представлені на Фіг.3.

На хроматограмах А і Б присутній пік цикорієвої кислоти, на хроматограмі В - відсутній.

На підставі отриманих даних нами зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять корені з кореневищами ехінацеї пурпурової, трава звіробою звичайного, листя м'яти перцевої, надземна частина трави материнки звичайної, трава деревію звичайного, кореневища лепехи звичайної, сік плодів горобини звичайної та сік плодів горобини чорноплодної, присутність та вміст ехінацеї пурпурової можна визначати за наявністю та кількісним вмістом цикорієвої кислоти.

Винахід обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини ехінацеї пурпурової (коріння, листя, квітки, трава) в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входить ехінацея пурпурова, трава деревію звичайного, листя кропиви дводомної, листя м'яти перцевої, корені цикорію дикого, плоди шипшини та корені з кореневищами елеутерококу колючого за наявністю та вмістом цикорієвої кислоти як фізіологічно активного компонента, що присутній в усіх частинах ехінацеї пурпурової. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та винаході наведено в таблиці 2.

Таблиця 2.

Характеристика способів стандартизації ехінацеї пурпурової.

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	Сума оксикоричних кислот	Моносировина ехінацеї пурпурової	Метод УФ-спектрофотометрії Можливість кількісної стандартизації моно сировини ехінацеї пурпурової; неспецифічне визначення
2	Корисна модель	Цикорієва кислота	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: ехінацея пурпурова (листя, корені, квітки, трава); трава деревію звичайного; листя кропиви дводомної; листя м'яти перцевої; корені цикорію дикого; плоди шипшини; корені з кореневищами елеутерококу колючого	Метод ВЕРХ Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей ехінацеї пурпурової; специфічне визначення

Перелік посилань:

1. Компендиум 2004 - лекарственные препараты / Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Вікторова / К.: Морион, 2004. - 1664 с.

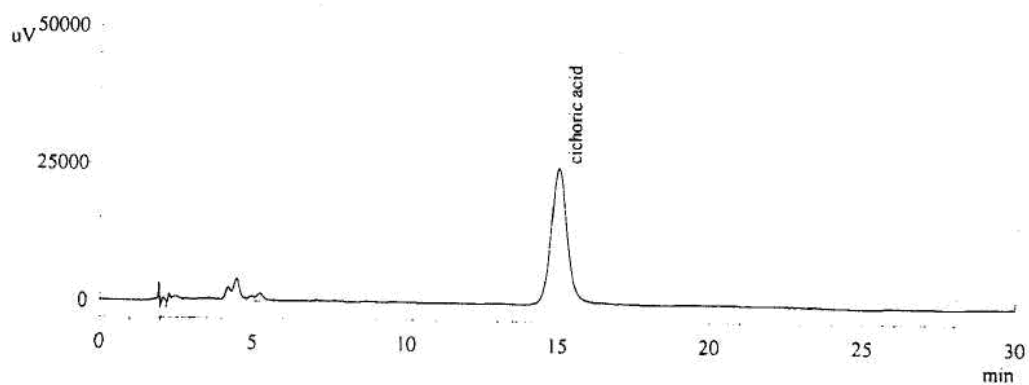
2. Лавренов В.К., Лавренова Г.В. Современная энциклопедия лекарственных растений. - М.: ОЛМА Медиа Групп, 2007. - 272 с.

3. Самородов В. К, Поспелов С. В., Моисеева Г. Ф., Середа А. В. Фитохимический состав представителей рода эхинацея (Echinacea Moench.) и его фармакологические свойства (обзор) // Хими-

ко-фармацевтический журнал. - 1996. - № 4. - с. 32-37.

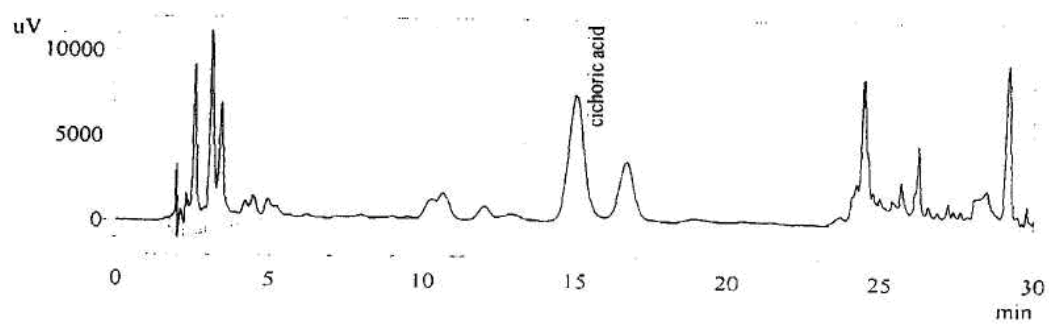
4. Чхиквишвили И.Д., Харебава Г.И. Цикориевая и хлорогеновая кислоты в некоторых растениях, произрастающих в Грузии // Прикладная биохимия и микробиология. - 2001. - Т. 37. - № 2. С. 214-217.

5. Куркин В.А., Авдеева О.И., Авдеева Е.В., Мизина П.Г. Количественное определение суммы гидроксикоричных кислот в надземной части Echinacea purpurea (L.) Moench // Растительные ресурсы. - 1998. - т. 34. - вып. 2.



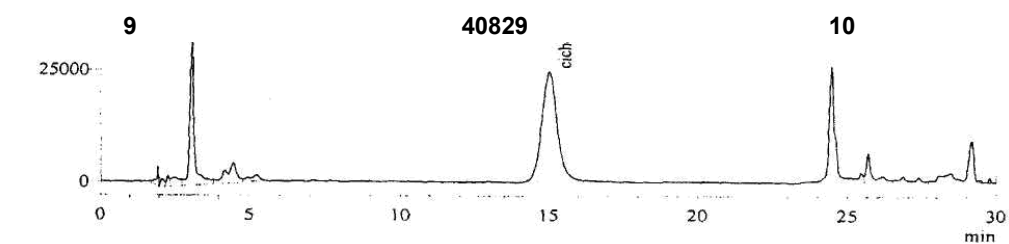
Хроматограмма цикорієвої кислоти

Фіг.1

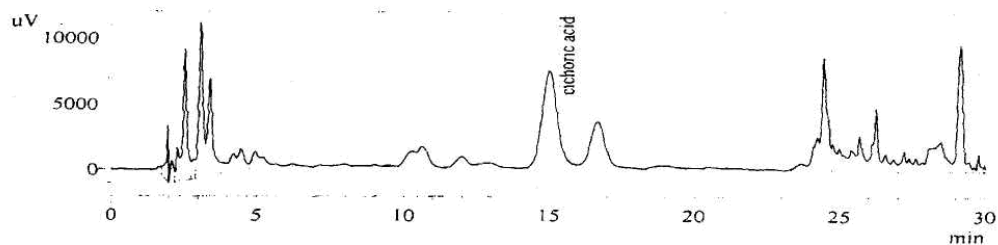


Хроматограма досліджуваного розчину

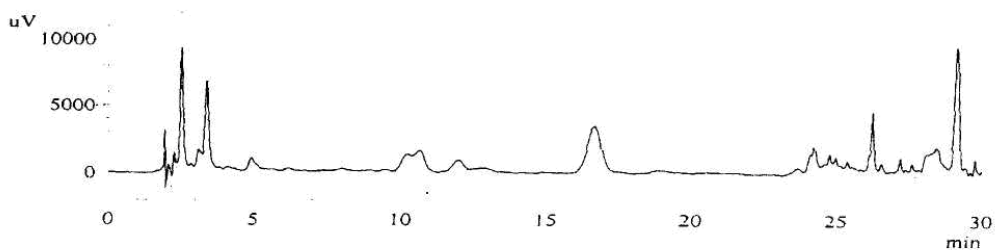
Фіг.2



A.



Б.



В.

Фіг.3