



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **58468** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
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 ДЕРЕВІЮ ЗВИЧАЙНОГО (ACHILLEA MILLEFOLIUM L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

(21) u201012041
(22) 11.10.2010
(24) 11.04.2011
(46) 11.04.2011, Бюл.№ 7, 2011 р.
(72) ГУДЗЕНКО АНДРІЙ ВІКТОРОВИЧ, ЦУРКАН
ОЛЕКСАНДР ОЛЕКСАНДРОВИЧ, КОВАЛЬЧУК
ТЕТЯНА ВАСИЛІВНА
(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМА-
КОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ"
(57) Спосіб стандартизації деревію звичайного
(*Achillea millefolium* L.) в багатокомпонентних рос-

2

линних сумішах, який **відрізняється** тим, що тра-
ва деревію звичайного в рослинних сумішах, що
містять в своєму складі траву деревію звичайного,
плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної,
шишки хмелю, корені цикорію дикого, квітки бузи-
ни, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, ко-
рені кульбаби лікарської, траву звіробою та насін-
ня льону визначають за наявністю та вмістом
апігеніну за методом високоефективної рідинної
хроматографії з попередньою 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 трава деревію звичайного широко
використовується в медичній практиці як у вигляді
монопрепаратів, так і у вигляді складових частин
багатокомпонентних рослинних лікарських засобів
[1, 2, 3, 4].

Фармакологічна активність трави деревію зви-
чайного обумовлена наявністю в її складі комплек-
су біологічно активних речовин, зокрема флавоно-
їдів [1]. Основним представником цього класу
сполук в траві деревію звичайного є апігенін, який
за даними літератури має широкий спектр біологі-
чної дії, зокрема антиоксидантні, антиканцерогенні
властивості тощо [5, 6, 7].

За прототип нами взята методика кількісного
визначення рослини в фармакопейній статті на
траву деревію, в якій стандартизація сировини
трави деревію звичайного проводиться за кількіс-
ним вмістом суми поліфенольних сполук, в пере-
рахунку на пірогалол, що проводиться за допомо-
гою методу УФ-спектрофотометрії. В прототипі
адсорбція досліджуваних розчинів після деривати-
зації вимірюється за довжини хвилі 720 нм, вико-
ристовуючи в якості стандартного розчин пірога-
лолу. В якості дериватизатора використовується
фосфорномолібденово-вольфрамовий реактив [8].

Недоліком існуючого способу стандартизації
сировини є те, що найближчий аналог передбачає

стандартизацію моносировини деревію звичайно-
го.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб
ідентифікації та визначення вмісту біологічно ак-
тивних речовин, що містяться в сировині трави
деревію звичайного в багатокомпонентних рос-
линних сумішах. Зокрема, до складу яких входить
трава деревію звичайного, плоди глоду колючого,
листя кропиви двудомної, шишки хмелю корені
цикорію дикого, квітки бузини, квітки нагідок лікар-
ських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської,
трава звіробою та насіння льону. Зазначена лікар-
ська сировина широко використовується для виго-
товлення як монопрепаратів так і полікомпонент-
них фітозасобів трави деревію звичайного, що
представлені на фармацевтичному ринку України
[3, 4].

Як зазначалося, в сировині трави деревію зви-
чайного міститься біологічно активна речовина
апигенін [1]. Виходячи з цього, з застосуванням
методу високоефективної рідинної хроматографії
(ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну
методику визначення апігеніну в сировині трави
деревію звичайного. За розробленою методикою
було проаналізовано траву деревію звичайного
різних вітчизняних виробників. Зокрема, були про-
аналізовані наступні препарати деревію: Трава
деревію в пачках по 50 г та 75 г (Виробники: ЗАТ
«Ліктрави» (серії: 40310, 50310, 70510); ЗАТ КП
«Фармацевтична фабрика» (серії 20709, 10208);

(13) **U**
(11) **58468**
(19) **UA**

ТЗОВ «Чиста флора» (дата виробництва 26.07.2010)).

Вміст апігеніну в траві деревію звичайного різних вітчизняних виробників представлений в табл.1.

Згідно даних, представлених в таблиці, в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено флавоноїд апігенін. Його вміст в досліджуваній сировині лежить в межах від $0,0101 \pm 0,0006$ % до

$0,0166 \pm 0,0013$ % в перерахунку на висушену сировину.

Процес ідентифікації та кількісного визначення апігеніну як компонента сировини деревію звичайного в багатокомпонентних рослинних сумішах полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення апігеніну як компонента деревію звичайного та біологічно активних речовин інших рослин.

Таблиця 1

Вміст апігеніну в досліджуваних препаратах деревію звичайного

№ п/п	Препарат трави деревію звичайного	Виробник, № серії	Вміст апігеніну (в %) в перерахунку на висушену сировину
1	Трава деревію в пачках по 50 г	КП «Фармфацевтична фабрика», серія 20709	$0,0164 \pm 0,0016$
2	Трава деревію в пачках по 50 г	КП «Фармфацевтична фабрика», серія 10208	$0,0166 \pm 0,0013$
3	Трава деревію в пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 40310	$0,0109 \pm 0,0010$
4	Трава деревію в пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 50310	$0,0141 \pm 0,0011$
5	Трава деревію в пачках по 50 г	ЗАТ «Ліктрави», серія 70510	$0,0139 \pm 0,0008$
6	Трава деревію в пачках по 75 г	ТЗОВ «Чиста флора» дата виробництва 26.07.2010	$0,0101 \pm 0,0006$

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

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення апігеніну як компонента деревію 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-ацетонітрильної рухомої фази, застосування якої дозволяє добитися розділення піків апігеніну деревію звичайного та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: 5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: трави деревію звичайного - 1 г, плодів глоду колючого - 1 г, листя кропиви дводомної - 1 г, шишок хмелю - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, квіток бузини - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, плодів шипшини - 1 г, коренів кульбаби лікарської - 1 г, трави звіробою 1 г, насіння льону - 1 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 45 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію

проводять ще раз, та доводять об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 25 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активованій (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 25 % 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 стандарту апігеніну поперемінно хроматографують в наступних умовах: колонка С18 Х-Тегга, розміром 150 мм x 4,6 мм, розмір часток 5 мкм; рухома фаза: 0-10 хв: ізократичне елюювання 80 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та 20 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 10-16 хв: градієнтне елюювання від 80 % до 74 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та від 20 % до 26 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 16-30 хв: ізократичне елюювання 74 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та 26 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 30-35 хв: градієнтне елюювання від 74 % до 10 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та від 26 % до 90 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 35-40 хв: ізократичне елюювання 10 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та

90 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об); 40-55 хв: ізократичне елюювання 80 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (10:90) (об/об) та 20 % суміші ацетонітрил - 5 % розчин ортофосфорної кислоти (90:10) (об/об) температура колонки 34 °C; довжина хвилі детектування 350 нм; швидкість потоку рухомої фази 1 мл / хв.

Вміст апігеніну 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 апігеніну на хроматограмі досліджуваного розчину;

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

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

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

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування стандартного розчину апігеніну: 0,005 г (точна наважка) достовірного стандарту апігеніну вміщують в мірну колбу місткістю 25 мл, розчиняють в 15 мл метанолу, доводять метанолом до мітки та перемішують. 1 мл отриманого розчину вміщують в мірну колбу місткістю 100 мл, доводять до мітки метанолом та перемішують.

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

На підставі експериментальних даних для сировини трави деревію звичайного нами рекомендований наступний граничний вміст апігеніну: не менше 0,008 % в перерахунку на висушену сировину.

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

Модельна суміш без вмісту деревію звичайного.

5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: плодів глоду колючого - 1 г, листя кропиви дводомної - 1 г, шишок хмелю - 1 г, коренів цикорію дикого - 1г, квіток бузини - 1 г, квіток нагідок лікарських - 1 г, плодів шипшини - 1 г, коренів кульбаби лікарської - 1 г, трави звіробою 1 г, насіння льону - 1 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному грівнику протягом 45 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводять ще раз, та доводять об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 25%, та пропускають отриманий зразок через попередньо активованій (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 25 % 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 деревію звичайного.

1 г (точна наважка) подрібненої сировини трави деревію звичайного вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному грівнику протягом 45 хвилин. Після цього екстракт охолоджують до кімнатної температури та фільтрують через фільтр "червона стрічка" в мірну колбу об'ємом 100 мл. Екстракцію проводять ще раз, та доводять об'єм витягів до 100 мл 50 % етиловим спиртом. До 5 мл отриманого розчину додають таку кількість води, щоб концентрація спирту становила 25 %, та пропускають отриманий зразок через попередньо активованій (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 25 % 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 апігеніну, екстракту трави деревію звичайного, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту трави деревію звичайного представлені на фіг.1, фіг. 2, фіг. 3 та фіг.4 відповідно.

За даних умов аналізу пік апігеніну має час виходу біля 26,5 хвилин (фіг. 1).

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

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять трава деревію звичайного, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, шишки хмелю, корені цикорію дикого, квітки бузини, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, трава звіробою та насіння льону, присутність та вміст трави деревію звичайного можна визначати за наявністю та кількісним вмістом флавоноїду апігеніну.

Корисна модель обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини трави деревію звичайного в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входить трава деревію звичайного, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, шишки хмелю, корені цикорію дикого, квітки бузини, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, трава звіробою та насіння льону за наявністю та вмістом апігеніну як фізіологічно активного компонента, що присутній в траві деревію звичайного. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та винаході наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика способів стандартизації трави деревію звичайного

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	сума поліфенольних сполук, в пере-рахунку на пірогалол	Моносировина трави деревію звичайного	Метод УФ- спектрофотометрії. Можливість кількісної стандартизації моно сировини трави деревію звичайного; неспецифічне визначення
2	Корисна модель	Апігенін	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: трава деревію звичайного, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, шишки хмелю, корені цикорію дикого, квітки бузини, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, трава звіробою та насіння льону	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей трави деревію звичайного; специфічне визначення

Джерела інформації:

1) Куцик Р.В., Зузук Б.М. Тысячелистник обыкновенный. *Achillea millefolium* L. (Аналитический обзор) // Провизор. - 2002. - № 14. - С. 28-33.

2) Куцик Р.В., Зузук Б.М. Тысячелистник обыкновенный. *Achillea millefolium* L. (Аналитический обзор) // Провизор. - 2002. - № 15. - С. 34-38.

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

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

5) Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention // *Pharm Res.* - 2010. - Vol. 27(6). - P. 962-978.

6) Cameiro C, Amorim J., Cadena S., Noleto G., Di Mascio P., Rocha M., Martinez G. Effect of flavonoids on 2'-deoxyguanosine and DNA oxidation caused by singlet molecular oxygen // *Food Chem Toxicol.* -2010. -Vol. 48.-P. 2380-2387.

7) Said A., Tundis R., Hawas U. W., El-Kousy S. M., Rashed K., Menichini F., Bonesi M., Huefner A., Loizzo M. R., Menichini F. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of flavonoids from *Ailanthus excelsa* (Roxb.) (Simaroubaceae) leaves // *Z. Naturforsch. C* -2010.-Vol. 65. P.180-186.

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

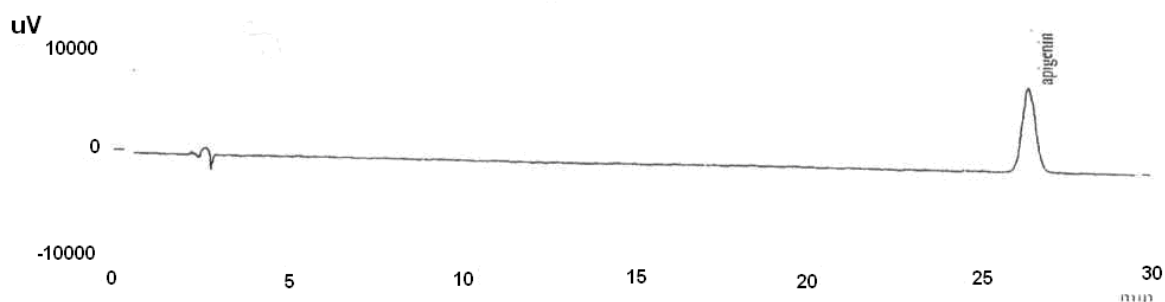


Fig. 1

