



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64788 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 31/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ КВІТОК РОМАШКИ ЛІКАРСЬКОЇ (MATRICARIA RECUTITA L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

1

2

(21) u201101429

(22) 08.02.2011

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 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 квіток ромашки лікарської (Matricaria recutita L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах, що включає використання методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), який відрізняється тим, що квітки ромаш-

ки лікарської в рослинних сумішах, що містять в своєму складі квітки ромашки лікарської, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, корені цикорію дикого, траву споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, кору дуба, траву звіробою та насіння льону визначають хроматографуванням у градієнтному режимі з використанням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та обернено фазної колонки, з попередньою очисткою проби, із застосуванням твердофазної екстракції за наявності та вмістом апігеніну та лютеоліну, вміст яких повинен бути не менше ніж 0,012 % та не менше ніж 0,007 %, відповідно, 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 квітки ромашки лікарської широко використовуються в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складових частин багатокомпонентних рослинних лікарських засобів [1, 2, 3, 4].

Фармакологічна активність квіток ромашки обумовлена наявністю в їх складі комплексу біологічно активних речовин, зокрема флавоноїдів [1, 2]. Основними представниками цього класу сполук в квітках ромашки є апігенін та лютеолін, які за даними літератури мають широкий спектр біологічної дії, зокрема антиоксидантні, антиканцерогенні, протизапальні властивості тощо [5, 6, 7].

За прототип нами обрано методику кількісного визначення рослини в фармакопейній статті на квітки ромашки, в якій стандартизація сировини квіток ромашки лікарської проводиться за кількісним вмістом флавоноїду апігенін-7-глюкозиду, що відбувається за допомогою методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). В прототипі хроматографування проводиться з використанням обернено-фазових колонок з застосуванням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та градієнтного режиму хроматографування [8].

Недоліки існуючого способу стандартизації сировини наступні: найближчий аналог передбачає стандартизацію моносировини квіток ромашки лікарської; використання методу ВЕРХ саме для аналізу флавонових глікозидів не є ефективним, тому що сучасні хроматографічні сорбенти в більшості своїй не здатні селективно розділити флавонові глікозиди, які відрізняються один від одного лише цукровою частиною [9]. І тому більш оптимальним рішенням є використання як маркерів ромашки в багатокомпонентних сумішах саме агліконів флавоноїдів, зокрема апігеніну та лютеоліну, що містяться в ромашці, та за даними літератури виявляють широкий спектр біологічної дії [5-7].

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині квіток ромашки лікарської в багатокомпонентних рослинних сумішах. Зокрема, до складу яких входять квітки ромашки лікарської, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, корені цикорію дикого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, кора дуба, трава звіробою та насіння льону. Квітки ромашки лікарської широко використовуються при виготовленні як монопрепаратів так і полікомпонентних фітозасобів, що представлені на фармацевтичному ринку України [3, 4].

UA (11) 64788 (13) U

Як зазначалося, в сировині квіток ромашок містяться біологічно активні речовини апігенін та лутеолін [1, 2]. Виходячи з цього, з застосуванням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну методику визначення апігеніну та лутеоліну в сировині квіток ромашки. За розробленою методикою було проаналізовано квітки ромашки різних вітчизняних виробників. Зокрема, були проаналізовані наступні препарати ромашки лікарської:

квітки ромашки в упаковці по 40 г (Виробники: ЗАТ "Ліктрави" (серії: 550810, 640910) та КП "Фармація" (серія 3631)); квітки ромашки в пачках по 75 г (Виробник: "Мудрий травник" (серія 10N)); квітки ромашки в фільтр-пакетах по 1,5 г (Виробники: ЗАТ "Ліктрави" (серія 281010) та ЗАТ ФФ "Віола" (серія 231110)).

Вміст апігеніну та лутеоліну в квітках ромашки лікарської різних вітчизняних виробників представлено в табл.1.

Таблиця 1

Вміст апігеніну та лутеоліну в досліджуваних препаратах квіток ромашки лікарської

№ п/п	Препарат квіток ромашки	Виробник, № серії	Вміст лутеоліну (в %) в перерахунку на висушену сировину	Вміст апігеніну (в %) в перерахунку на висушену сировину
1	Квітки ромашки в упаковці по 40 г	КП "Фармація", серія 3631	0,0134±0,0010	0,0481±0,0032
2	Квітки ромашки в пачках по 75 г	"Мудрий травник" серія 10N	0,0140±0,0011	0,0479±0,0045
3	Квітки ромашки в пачках по 40 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 550810	0,0113±0,0011	0,0230±0,0016
4	Квітки ромашки в пачках по 40 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 640910	0,0114±0,0010	0,0257±0,0021
5	Квітки ромашки в фільтр-пакетах по 1,5 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 281010	0,0087±0,0008	0,0149±0,0010
6	Квітки ромашки в фільтр-пакетах по 1,5 г	ЗАТ ФФ "Віола", серія 231110	0,0086±0,0005	0,0157±0,0014

Згідно з даними, представленими в таблиці, в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено флавоноїди апігенін та лутеолін. Вміст зазначених флавоноїдів в досліджуваній сировині лежить в межах від 0,0086±0,0005 % до 0,0140±0,0011 % в перерахунку на висушену сировину для лутеоліну і від 0,0149±0,0010 % до 0,0481±0,0032 % для апігеніну.

Процес ідентифікації та кількісного визначення апігеніну та лутеоліну як компонентів сировини квіток ромашки в багатокомпонентних рослинних сумішах полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення апігеніну та лутеоліну як компонентів ромашки лікарської та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини квіток ромашки в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності апігеніну та лутеоліну і визначення їх вмісту. Таким чином забезпечується можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина квіток ромашки лікарської.

Поставлена задача вирішується тим, що запропонована ідентифікація та кількісне визначення апігеніну та лутеоліну як компонентів квіток ромашки 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 та лутеоліну ромашки лікарської та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: 5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: квіток ромашки лікарської - 1 г, плодів глodu колючого - 1 г, листя кропиви дводомної - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, трави споришу - 1 г, кори дуба - 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 на 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 активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції "Superclean Ic-18SPE Tubes2ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 25 % етилового спирту. Пробу із патрона 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 стандартів апігеніну та лютеоліну поперемінно хроматографують в наступних умовах: колонка C18 X-Terra, розміром 150 мм × 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 1мл/хв.

Вміст апігеніну та лютеоліну 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 або лютеоліну на хроматограмі досліджуваного розчину;

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

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

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

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування стандартного розчину: по 0,005 г (точна наважка) достовірного стандарту апігеніну та лютеоліну 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 повинні бути присутні піки, час виходу яких відповідає часу виходу піків апігеніну та лютеоліну на хроматограмі стандартного розчину.

На підставі експериментальних даних для сировини квіток ромашки нами рекомендовано наступні граничні вмісти: для апігеніну - не менше 0,012 %, для лютеоліну - не менше 0,007 %, у перерахунок на висушену сировину.

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

Модельна суміш без вмісту квіток ромашки.

5 г (точна наважка) подрібненої суміші лікарських рослин наступного складу: плодів глоду колючого - 1 г, листя кропиви дводомної - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, трави споришу - 1 г, кори дуба - 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 активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 25 % етилового спирту. Пробу із патрона 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 квіток ромашки.

1 г (точна наважка) подрібненої сировини квіток ромашки 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 активований (метанол 5 мл) та промитий 10 мл води патрон для твердофазної 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, екстракту квіток ромашки, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту квіток ромашки представлені на Фіг.1, Фіг.2, Фіг.3 та Фіг.4 відповідно.

За даних умов аналізу пік апігеніну має час виходу біля 27,0 хвилин, пік лютеоліну - 18,4 хвилин (Фіг.1).

На хроматограмах екстракту квіток ромашки та досліджуваного розчину присутні піки апігеніну та лютеоліну (Фіг.2 та Фіг.3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту квіток ромашки (Фіг.4) - дані піки відсутні.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять квітки ромашки лікарської, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, корені цикорію дикого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, кора дуба, трава звіробою та насіння льону, присутність та вміст квіток ромашки можна визначати за наявністю та кількісним вмістом флавоноїдів апігеніну та лютеоліну.

Спосіб дає можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини квіток ромашки

в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять квітки ромашки лікарської, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, корені цикорію дикого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, кора дуба, трава звіробою та насіння льону за наявністю та вмістом апігеніну та лютеоліну як фізіологічно активних компонентів, що присутні в квітках ромашки лікарської. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та корисній моделі наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика способів стандартизації квіток ромашки лікарської

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкти дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	Апігенін-7-глюкозид	Моносировина квіток ромашки аптечної	Метод ВЕРХ Можливість кількісної стандартизації моносировини квіток ромашки лікарської
2	Корисна модель	Апігенін, лютеолін	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: квітки ромашки лікарської, плоди глоду колючого, листя кропиви дводомної, корені цикорію дикого, трава споришу, квітки нагідок лікарських, плоди шипшини, корені кульбаби лікарської, кора дуба, трава звіробою та насіння льону	Метод ВЕРХ Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей квіток ромашки лікарської

Джерела інформації:

1. McKay D., Blumberg J. A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.) // *Phytother Res.* - 2006. - Vol. 20(7). P. 519-530.

2. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae). СПб.: Наука, 1993, - 351 с.

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.

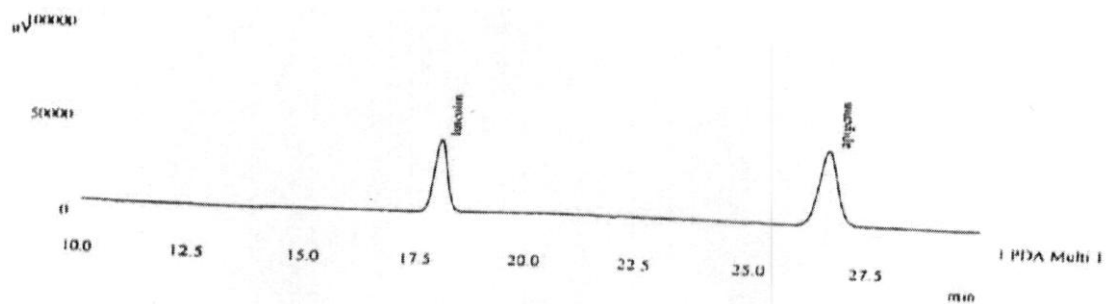
5. Shukla S., Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention // *Pharm Res.* - 2010. - Vol. 27(6). - P. 962-978.

6. Carneiro 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.

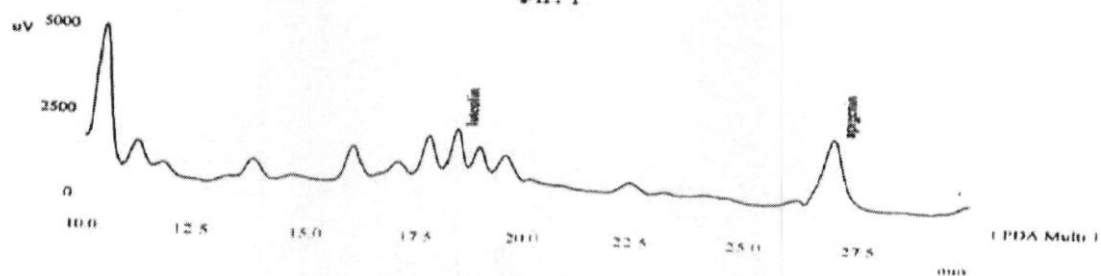
7. Said A., Tundis R., Hawas U.W., El-Kousy S.M., Rashed K., Menichini F., Bonesi M., Huefner A., Loizzo M.R., Menichini F. In vitro antioxidant and antiproliferative activities of flavonoids from *Ailanthus excelsa* (Roxb.) (Simaroubaceae) leaves // *Z. Naturforsch. C* - 2010. - Vol. 65. P. 180-186.

8. Державна Фармакопея України / ДП "Науково-експертний фармакопейний центр". - 1-е вид. - Доповнення 3. - Х.: ДП "Науково-експертний фармакопейний центр", 2009. - 280 с.

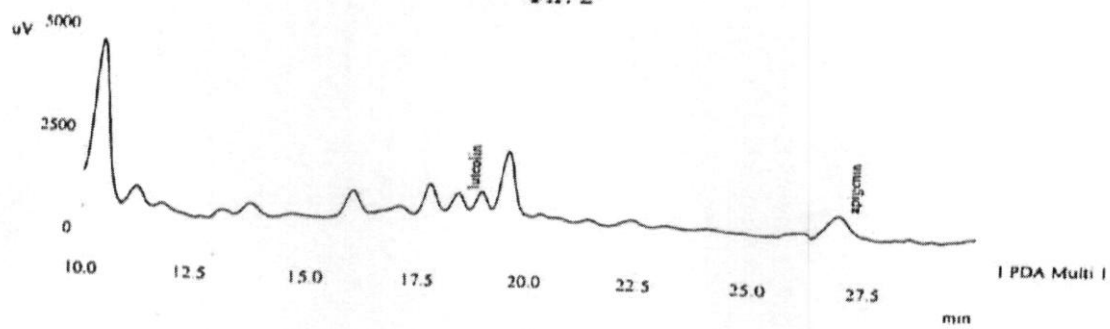
9. Stakilas S. Extraction, separation and detection methods for phenolic acids and flavonoids // *J. Sep. Sci.* - 2007. - Vol. 30(18). - P. 3268-3295.



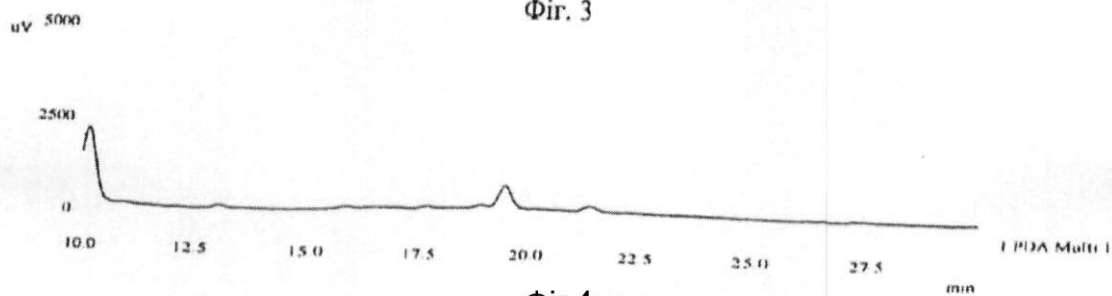
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4