



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **69764** (13) **U**  
(51) МПК (2012.01)  
**A61K 31/00**

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: <b>u 2011 13087</b>	(72) Винахідник(и): <b>Гудзенко Андрій Вікторович (UA), Цуркан Олександр Олександрович (UA), Ковальчук Тетяна Василівна (UA)</b>
(22) Дата подання заявки: <b>07.11.2011</b>	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.05.2012</b>	(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ АМН УКРАЇНИ", вул. Є. Потьє, 14, м. Київ, 03680, Україна (UA)</b>
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.05.2012, Бюл.№ 9</b>	

## (54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ КВІТОК БУЗИНИ ЧОРНОЇ (SAMBUCUS NIGRA L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

### (57) Реферат:

Спосіб стандартизації квіток бузини чорної (*Sambucus nigra* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах з використанням методу ВЕРХ, при якому квітки бузини чорної в рослинних сумішах, що містять в своєму складі квітки бузини чорної, корені валеріани лікарської, траву звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону, визначають хроматографуванням в градієнтному режимі з використанням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та оберненофазної колонки, з попередньою очисткою проби, з застосуванням твердофазної екстракції за наявності та вмістом астрагаліну, вміст якого повинен бути не менше ніж 0,14 % у перерахунку на висушену сировину

UA 69764 U



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

Відомо, що квітки бузини чорної широко використовуються в медичній практиці як у вигляді монопрепаратів, так і у вигляді складових частин багатокомпонентних рослинних лікарських засобів [1].

Даній лікарській сировині притаманний широкий спектр біологічної дії, зокрема сечогінні, антиоксидантні, болезаспокійливі та протизапальні властивості, тощо [3, 4, 5, 6].

За літературними даними антиоксидантна дія квіток бузини чорної пов'язана з високим вмістом флавоноїдів [5]. Виходячи з того, що одним із мажоритарних представників флавоноїдів в квітках бузини чорної є моноглікозид кверцетину - астрагалін [7], вважалось за доцільне дослідити можливість використання цієї сполуки як маркера для визначення бузини в рослинних сумішах.

За прототип нами взято методику кількісного визначення в фармакопейній статті Державної Фармакопеї України "Квітки бузини чорної". В даній статті стандартизація сировини бузини проводиться за кількісним вмістом суми флавоноїдів, в перерахунку на ізокверцитрозид, що проводиться за допомогою методу УФ-спектрофотометрії. В прототипі адсорбція досліджуваних розчинів після комплексоутворення з алюмінію хлоридом вимірюється за довжини хвилі 425 нм [8].

Недоліком існуючого способу стандартизації сировини є те, що найближчий аналог передбачає стандартизацію моносировини бузини чорної.

Спосіб, який підлягає удосконаленню - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині квіток бузини чорної в багатокомпонентних рослинних сумішах. Зокрема, до складу яких входять квітки бузини чорної, корені солодки голої, корені з кореневищами валеріани лікарської, трава звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону. Зазначена лікарська сировина широко використовується для виготовлення полікомпонентних фітозасобів квіток бузини чорної, що представлені на фармацевтичному ринку України [1].

Як зазначалося, в сировині квіток бузини чорної міститься біологічно активна речовина флавоноїд астрагалін [7]. Виходячи з цього, з застосуванням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну методику визначення астрагаліну в сировині квіток бузини чорної. За розробленою методикою було проаналізовано квітки бузини чорної вітчизняного виробництва. Зокрема, було проаналізовано квітки бузини в пачках по 50 г [Виробник: ЗАТ "Ліктрави", серії: 10211, 20211, 61209]; квітки бузини в фільтр-пакетах по 1,5 г [Виробники: ЗАТ "Ліктрави", серія 10411 та ТОВ "ЛікФарм "Адоніс", серія п.10, виготовлення 102010].

Згідно з отриманими даними, в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено флавоноїд астрагалін. Його вміст в досліджуваній сировині знаходився в межах від 0,1613±0,0087 % до 0,2311±0,0115 % у перерахунку на висушену сировину.

Процес ідентифікації та кількісного визначення флавоноїду астрагаліну, як компонента сировини бузини чорної в багатокомпонентних рослинних сумішах, полягає в знаходженні умов

Таблиця 1

Вміст астрагаліну в досліджуваних препаратах квіток бузини чорної

№ п/п	Препарат	Виробник, № серії	Вміст астрагаліну у перерахунку на висушену сировину, %
1	Бузини чорної квітки в упаковці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 10211	0,1613±0,0087
2	Бузини чорної квітки в упаковці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 20211	0,2007±0,0111
3	Бузини чорної квітки в упаковці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 61209	0,1630±0,0076
4	Бузини чорної квітки в фільтр-пакетах по 1,5 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 10411	0,1949±0,0108
5	Бузини чорної квітки в фільтр-пакетах по 1,5 г	ТОВ "ЛікФарм "Адоніс", серія п10, виготовлення 102010	0,2311±0,0115

для хроматографічного розділення астрагаліну як компонента бузини чорної та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини квіток бузини чорної в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності флавоноїду астрагаліну та визначення його вмісту, і таким чином забезпечити можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина квіток бузини чорної.

Поставлена задача вирішується тим, що нами запропонована ідентифікація та кількісне визначення астрагаліну як компонента бузини чорної 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 астрагаліну бузини чорної та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: 1 г рослинної суміші наступного складу: квіток бузини чорної - 1 г, коренів валеріани лікарської - 1 г, трави звіробою звичайного - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, насіння льну - 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 15 %, 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 15 % 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 астрагаліну поперемінно хроматографують на рідинному хроматографі, обладнаному УФ-детектором в наступних умовах: колонка Phenomenex Luna C18(2), розміром 150 мм × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм; температура колонки - 35 °С; довжина хвилі детектування - 350 нм; швидкість потоку рухомої фази - 1 мл/хв; об'єм проби, що вводився - 5мкл; рухома фаза:

Час хроматографування (хв.)	Елюент А, %	Елюент Б, %
0-1	100	0
1-26	100→80	0→20
26-33	80	20
33-48	80→50	20→50
48-50	50→20	50→80
50-55	20	80
55-70	100	0

Елюент А: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти в 5 % розчині ацетонітрилу в воді;

Елюент Б: 0.1 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

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

$$x = \frac{A_{\text{пр}} \cdot C_{\text{СТ}} \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_{\text{СТ}} \cdot m_{\text{np}} \cdot (100 - W)},$$

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

$A_{\text{СТ}}$  - площа піку астрагаліну на хроматограмі розчину порівняння астрагаліну;

$C_{\text{СТ}}$  - концентрація астрагаліну в розчині порівняння астрагаліну, г/мл;

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

w - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування розчину порівняння астрагаліну: 0,005 г (точна наважка) достовірного зразку астрагаліну вміщують в мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють в 15 мл 50 % етилового спирту, доводять до мітки тим же розчинником та перемішують.

5 На хроматограмі досліджуваного розчину повинен бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку астрагаліну на хроматограмі розчину порівняння астрагаліну.

На підставі експериментальних даних для сировини квіток бузини чорної нами рекомендований наступний граничний вміст астрагаліну: не менше 0,14 % в перерахунку на висушену сировину.

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

Модельна суміш без вмісту квіток бузини чорної.

15 1 г рослинної суміші наступного складу: коренів валеріани лікарської - 1 г, трави звіробою звичайного - 1 г, коренів цикорію дикого - 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 15 %, 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 15 % 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 квіток бузини чорної.

0,5 г квіток бузини чорної вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному огрівнику протягом 45 хвилин.

30 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 15 %, 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 15 % 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.

40 Хроматограми розчину порівняння астрагаліну, екстракту квіток бузини чорної, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту квіток бузини чорної представлені на фіг.1, фіг. 2, фіг. 3 та фіг.4 відповідно.

За даних умов аналізу пік астрагаліну має час виходу близько 25 хвилин (фіг. 1).

45 На хроматограмах екстракту квіток бузини чорної та досліджуваного розчину присутній пік астрагаліну (фіг. 2 та фіг. 3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту квіток бузини (фіг. 4) - даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять квітки бузини чорної, корені валеріани лікарської, трава звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону, присутність та вміст квіток бузини чорної можна визначати за наявністю та кількісним вмістом флавоноїду астрагаліну.

50 Корисна модель обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини квіток бузини чорної в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять квітки бузини чорної, корені валеріани лікарської, трава звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону за наявністю та вмістом флавоноїду астрагаліну як фізіологічно активного компонента, що присутній в квітках бузини чорної. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та корисній моделі наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

## Характеристика способів стандартизації квіток бузини чорної

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкт дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	сума флавоноїдів, в перерахунку на ізокверцитрозид	Моносировина квіток бузини чорної	Метод УФ-спектрофотометрії. Можливість кількісної стандартизації моносировини квіток бузини чорної; неспецифічне визначення
2	Корисна модель	астрагалін	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: квітки бузини чорної, корені валеріани лікарської, трава звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей квіток бузини чорної; специфічне визначення

## Перелік посилань:

- 1) Компендиум 2009 - Лекарственные препараты / под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Вікторова. - К.: Морион, 2009. - 2224 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) Ciocoiu M, Miron A, Mares L, Tutunaru D, Pohaci C, Groza M, Badescu M. The effects of Sambucus nigra polyphenols on oxidative stress and metabolic disorders in experimental diabetes mellitus // J. Physiol. Biochem. - 2009. -Vol. 65. - P. 297-304.
- 6) Wright C, Van-Buren L, Kroner C, Koning M. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence // J. Ethnopharmacol. - 2007. - Vol. 114(1). P. 1-31.
- 7) Scopel M., Mentz L, Henriques A. Comparative analysis of Sambucus nigra and Sambucus australis flowers: development and validation of an HPLC method for raw material quantification and preliminary stability study // Planta Med.-2010. - Vol. 76, N.10. - 1026-1031.
- 8) Державна Фармакопея України / ДП "Науково-експертний фармакопейний центр".-1-е вид. - Доповнення 2. - Х.: ДП "Науково-експертний фармакопейний центр", 2008. - 620 с

## ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- Спосіб стандартизації квіток бузини чорної (*Sambucus nigra* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах з використанням методу ВЕРХ, який **відрізняється** тим, що квітки бузини чорної в рослинних сумішах, що містять в своєму складі квітки бузини чорної, корені валеріани лікарської, траву звіробою звичайного, корені цикорію дикого та насіння льону, визначають хроматографуванням в градієнтному режимі з використанням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та оберненофазної колонки, з попередньою очисткою проби, з застосуванням твердофазної екстракції за наявності та вмістом астрагаліну, вміст якого повинен бути не менше ніж 0,14 % у перерахунку на висушену сировину.

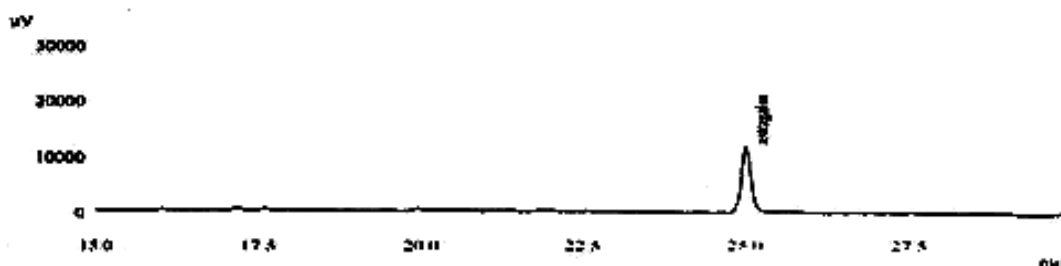


Fig. 1

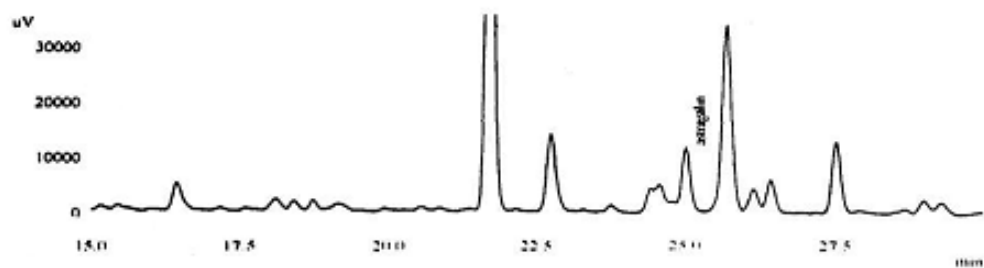


Fig. 2

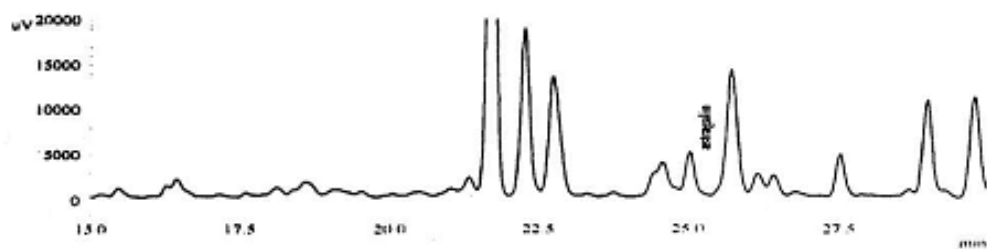


Fig. 3

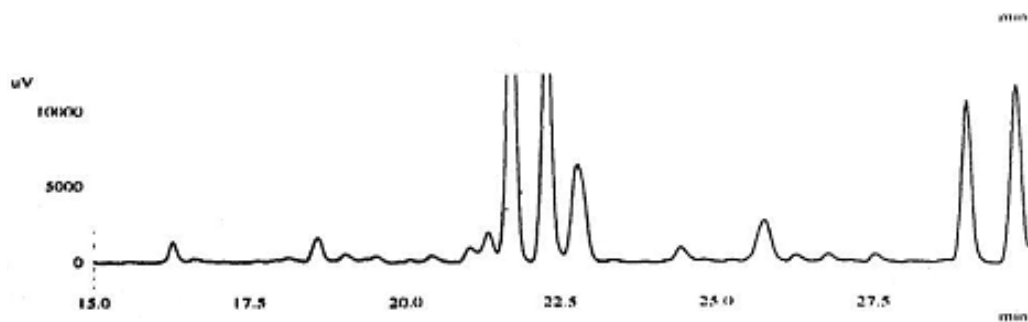


Fig. 4

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601