



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **76686** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)
A61K 36/00

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 08170	(72) Винахідник(и): Гудзенко Андрій Вікторович (UA), Цуркан Олександр Олександрович (UA), Ковальчук Тетяна Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 03.07.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.01.2013	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГІЇ ТА ТОКСИКОЛОГІЇ НАМН УКРАЇНИ", вул. Е. Потьє, 14, м. Київ, 03680 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.01.2013, Бюл.№ 1	

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ КВІТОК ЦМИНУ ПІСКОВОГО (HELICHRYSUM ARENARIUM L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

(57) Реферат:

Спосіб стандартизації квіток цмину піскового (*Helichrysum arenarium* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах здійснюють з використанням методу ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії). Наявність та вміст квіток цмину піскового в рослинних сумішах, що містять в своєму складі квітки цмину піскового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, траву кропиви собачої, листя та квітки глоду, траву звіробою та насіння льону, визначають шляхом приготування рослинної суміші, її очищення. Далі здійснюють хроматографування в градієнтному режимі з використанням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та оберненофазної колонки за наявністю та вмістом апігеніну, вміст якого повинен бути не менше ніж 0,12 % у перерахунку на висушену сировину.

UA 76686 U

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

Відомо, що препарати на основі біологічно активних речовин квіток цмину пісового 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 жовчогінні, протизапальні, протибактеріальні, спазмолітичні та антиоксидантні властивості тощо [2, 3].

Виходячи з того, що за літературними даними саме флавоноїдна фракція обумовлює антиоксидантні властивості в рослині [3], вважалось за доцільне дослідити можливість використання саме флавоноїдів як маркерних сполук для визначення цмину пісового в рослинних сумішах. Зокрема, флавоноїду апігеніну, який є мажоритарним представником даного класу сполук в цміні пісовому та, за даними літератури, має широкий спектр біологічної дії [3, 4, 5].

За прототип нами вибрано методику кількісного визначення в фармакопейній статті Державної фармакопеї Радянського Союзу 11 видання "Квітки цмину пісового". В даній статті стандартизація сировини цмину пісового проводиться за кількісним вмістом суми флавоноїдів, в перерахунку на ізосаліпурпозид, що проводиться за допомогою методу УФ-спектрофотометрії. В прототипі адсорбція досліджуваних розчинів після комплексоутворення вимірюється за довжини хвилі 315 нм [6].

Недоліком існуючого способу стандартизації сировини є те, що найближчий аналог передбачає стандартизацію моносировини квіток цмину пісового.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині квіток цмину пісового в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять квітки цмину пісового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, трава кропиви собачої, листя та квітки глоду, трава звіробою та насіння льону. Зазначена лікарська сировина широко використовується для виготовлення полікомпонентних фітозасобів, до складу яких входять квітки цмину пісового, що представлені на фармацевтичному ринку України [1].

Як зазначалося, в сировині квіток цмину пісового міститься біологічно активна речовина апігенін [3]. Виходячи з цього, з застосуванням методу вискоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну методику визначення апігеніну в сировині цмину пісового. За розробленою методикою були проаналізовані препарати цмину пісового різних вітчизняних виробників. Зокрема, було проаналізовано: квітки цмину пісового в упаковці по 50 г (виробник: ЗАТ "Ліктрави" (серії: 101111, 111211, 30212, 40212) та квітки цмину пісового в упаковці по 20 г (виробник: ЗАТ ФФ "Віола" (серія 231110)).

Вміст апігеніну в різних серіях квіток цмину пісового представлено в таблиці 1.

Згідно з даними, представленими в таблиці 1, в усіх пробах було ідентифіковано та кількісно визначено флавоноїд апігенін, вміст якого в досліджуваній сировині лежить в межах від 0,1453±0,0068 % до 0,1657±0,0085 % в перерахунку на висушену сировину.

Таблиця 1

Вміст апігеніну в досліджуваних препаратах коренів цмину пісового

№ п/п	Препарат цмину пісового	Виробник, № серії	Вміст апігеніну у перерахунку на висушену сировину, %
1	Квітки цмину пісового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 111211	0,1575±0,0073
2	Квітки цмину пісового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 101111	0,1570±0,081
3	Квітки цмину пісового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 30212	0,1657±0,0085
4	Квітки цмину пісового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 40212	0,1453±0,0068
5	Квітки цмину пісового в пачці по 20 г	ЗАТ ФФ "Віола", серія 081011	0,1608±0,0083

Процес ідентифікації та кількісного визначення флавоноїду апігеніну, як компонента сировини цмину пісового в багатокомпонентних рослинних сумішах, полягає в знаходженні

умов для хроматографічного розділення апігеніну як компонента квіток цмину піскового та біологічно активних речовин інших рослин.

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

Поставлена задача вирішується тим, що нами запропонована ідентифікація та кількісне визначення апігеніну як компонента квіток цмину піскового 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 з додаванням трифтороцтової кислоти, застосування якої дозволяє добитися розділення піків апігеніну квіток цмину піскового та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1.

Приготування досліджуваного розчину: 5 г рослинної суміші наступного складу: квіток цмину піскового - 1 г, плодів глоду колючого - 1 г, коренів алтею лікарського - 1 г, коренів солодки голої - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, коренів кульбаби лікарської - 1 г, шишок хмелю - 1 г, трави кропиви собачої - 1 г, листя та квіток глоду - 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 обігрівачі 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 витяжок 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 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 достовірного зразка апігеніну поперемінно хроматографують на рідинному хроматографі, обладнаному УФ-детектором, в наступних умовах: колонка Synergy 4U Fusion RP, розміром 250 мм × 4,6 мм, розмір частинок 5 мкм; температура колонки - 35 °С; довжина хвилі детектування - 330 нм; швидкість потоку рухомої фази - 1мл/хв;

рухома фаза:

Час хроматографування (хв)	Елюент А, %	Елюент Б, %
0-5	95	5
5-30	95 → 60	5 → 40
30-40	60 → 50	40 → 50
40-45	50	50
45-60	95	5

Елюент А: 0,05 % розчин трифтороцтової кислоти в воді;

Елюент Б: 0,05 % розчин трифтороцтової кислоти в ацетонітрилі.

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

$$X = \frac{A_{np} * C_{ст} * 100 * 100 * 100}{A_{np} * m_{np} * (100 - W)}$$

де A_{np} - площа піка апігеніну на хроматограмі досліджуваного розчину;

$A_{ст}$ - площа піка апігеніну на хроматограмі розчину порівняння апігеніну;

$C_{ст}$ - концентрація апігеніну в розчині порівняння апігеніну, г/мл;

m_{np} - наважка досліджуваної суміші, г;

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування розчину порівняння апігеніну: 0,010 г достовірного стандарту апігеніну вміщують в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 50 мл 96 % етилового спирту, доводять

тим же розчинником до мітки та перемішують. 1 мл отриманого розчину вміщують в мірну колбу об'ємом 25 мл, доводять до мітки 96 % етиловим спиртом та перемішують.

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

5 На підставі експериментальних даних для сировини квіток цмину пісового нами рекомендовано наступний граничний вміст апігеніну - не менше 0,12 % в перерахунку на висушену сировину.

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

10 Модельна суміш без вмісту квіток цмину пісового.

5 г рослинної суміші наступного складу: плодів глоду колючого - 1 г, коренів алтею лікарського - 1 г, коренів солодки голої - 1 г, коренів цикорію дикого - 1 г, коренів кульбаби лікарської - 1 г, шишок хмелю - 1 г, трави кропиви собачої - 1 г, листя та квіток глоду - 1 г, трави звіробою - 1г, насіння льону - 1 г, вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному обігрівачі 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 витяжок 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 твердофазної екстракції "Superclean Ic-18 SPE Tubes 2 ml" виробництва фірми Supelco (США). Патрон промивають 10 мл 15 % 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.

25 Екстракт квіток цмину пісового.

1 г квіток цмину пісового вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному обігрівачі 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 витяжок 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 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.

Хроматограми розчину порівняння апігеніну, екстракту квіток цмину пісового, досліджуваного розчину та модельної суміші без вмісту квіток цмину пісового представлені на Фіг. 1, Фіг. 2, Фіг. 3 та Фіг. 4 відповідно.

40 За даних умов аналізу пік апігеніну має час виходу близько 33,3 хвилин (Фіг. 1).

На хроматограмах екстракту квіток цмину пісового та досліджуваного розчину присутній пік апігеніну (Фіг. 2 та Фіг. 3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту квіток цмину пісового (Фіг. 4) - даний пік відсутній.

На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять квітки цмину пісового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, трава кропиви собачої, листя та квітки глоду, трава звіробою та насіння льону, присутність та вміст квіток цмину пісового можна визначати за наявністю та кількісним вмістом флавоноїду апігеніну.

Корисна модель обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини квіток цмину пісового в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять квітки цмину пісового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, трава кропиви собачої, листя та квітки глоду, трава звіробою та насіння льону, за наявністю та вмістом флавоноїду апігеніну як фізіологічно активного компонента, що присутній в квітках цмину пісового. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та корисній моделі наведено в таблиці 2.

Таблиця 2

Характеристика способів стандартизації квіток цмину пісового

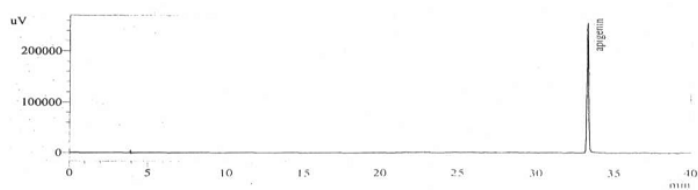
№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкт дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	Сума флавоноїдів в перерахунку на ізосаліпурпозид	Моносировина квіток цмину пісового	Метод УФ-спектрофотометрії. Можливість кількісної стандартизації моносировини квіток цмину пісового; неспецифічне визначення.
2	Корисна модель	Апігенін	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: квітки цмину пісового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, трава кропиви собачої, листя та квітки глоду, трава звіробою та насіння льону	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей квіток цмину пісового; специфічне визначення

Перелік посилань:

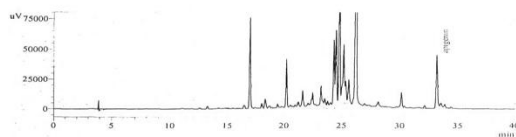
1. Справочник "Компендиум-2011 - лекарственные препараты"/ Под ред. В.Н. Коваленко, А.П. Викторова. - К.: Морион, 2011. - 2270 С.
2. Лікарські рослини: Енциклопедичний довідник/ Відп. ред. Гродзінський А. М. - К.: Головна ред. УРЕ, 1989. - С. 544.
3. Sroka Z., Kuta I., Cisowski W., Drys A. Antiradical activity of hydrolyzed and non-hydrolyzed extracts from *Helichrysi inflorescentia* and its phenolic contents// Z. Naturforsch. C - 2004. - Vol. 59, N 5-6. - P. 363-367.
4. Carneiro C, Amorim J., Cadena S., Noletto 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.
5. Sandhar H., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P. A Review of Phytochemistry and Pharmacology of Flavonoids// Internationale Pharmaceutica Scientia. - 2011. - Vol.1, Iss. 1. - P. 25-41.
6. Государственная фармакопея СССР: Вып. 2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье/ МЗ СССР. - 11-е изд., доп. - М.: Медицина, 1989. - С. 400.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

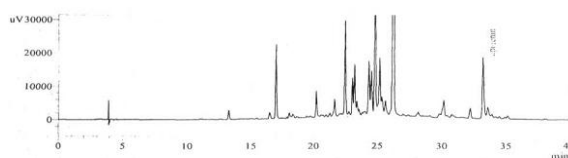
Спосіб стандартизації квіток цмину пісового (*Helichrysum arenarium* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах з використанням методу ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії), який **відрізняється** тим, що наявність та вміст квіток цмину пісового в рослинних сумішах, що містять в своєму складі квітки цмину пісового, плоди глоду колючого, корені алтею лікарського, корені солодки голої, корені цикорію дикого, корені кульбаби лікарської, шишки хмелю, траву кропиви собачої, листя та квітки глоду, траву звіробою та насіння льону, визначають шляхом приготування рослинної суміші, її очищенням та хроматографуванням в градієнтному режимі з використанням водно-ацетонітрильних рухомих фаз та оберненофазної колонки за наявністю та вмістом апігеніну, вміст якого повинен бути не менше ніж 0,12 % у перерахунку на висушену сировину.



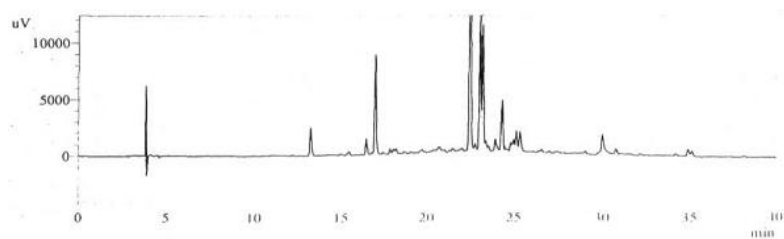
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

5

10

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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