



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **78128** (13) **U**
(51) МПК (2013.01)

A61K 31/00

A61K 36/00

G01N 30/00

G01N 25/14 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2012 10281	(72) Винахідник(и): Гудзенко Андрій Вікторович (UA), Цуркан Олександр Олександрович (UA), Ковальчук Тетяна Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 30.08.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 11.03.2013	(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: 11.03.2013, Бюл.№ 5	

(54) СПОСІБ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ТРАВИ ХВОЩУ ПОЛЬОВОГО (EQUISETUM ARVENSE L.) В БАГАТОКОМПОНЕНТНИХ РОСЛИННИХ СУМІШАХ

(57) Реферат:

Спосіб стандартизації трави хвощу польового (*Equisetum arvense* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах з використанням методу ВЕРХ, де траву хвощу польового в рослинних сумішах 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 ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

UA 78128 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 трави хвощу польового 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, кровоспинні, протизапальні, ремінералізуючі властивості тощо [2, 3].

Виходячи з того, що за літературними даними до складу трави хвоща польового входить ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота - сполука яка є мажоритарним представником гідроксикоричних кислот в рослині [3], має широкий спектр біологічної дії [4] та міститься в дуже обмеженій кількості лікарських рослин, тому ми вирішили розглянути можливість використання в якості маркера хвоща польового при стандартизації рослинних сумішей саме зазначену БАР.

За прототип нами взято методику кількісного визначення в фармакопейній статті Європейської фармакопеї "Трава хвощу польового", в якій стандартизація сировини хвощу проводиться за кількісним вмістом суми флавоноїдів, в перерахунку на ізокеверцитрозид методом УФ-спектрофотометрії. В прототипі адсорбція досліджуваних розчинів після комплексоутворення вимірюється за довжини хвилі 425 нм [5].

Недоліком існуючого способу стандартизації сировини є те, що найближчий аналог передбачає стандартизацію моносировини трави хвощу польового.

Об'єкт, який підлягає удосконаленню - спосіб ідентифікації та визначення вмісту біологічно активних речовин, що містяться в сировині трави хвощу польового в багатокомпонентних рослинних сумішах. Зокрема, до складу яких входять трава хвоща польового, трава омели білої, трава звіробою звичайного, квітки, листя і плоди глоду, трава м'яти перцевої, трава меліси лікарської та квітки ромашки аптечної. Зазначена лікарська сировина широко використовується для виготовлення полікомпонентних фітозасобів трави хвоща польового, що представлені на фармацевтичному ринку України [1].

Як зазначалося, в сировині трави хвощу польового міститься біологічно активна речовина ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота [3]. Виходячи з цього, з застосуванням методу високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ), нами було розроблено хроматографічну методику визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в сировині хвощу польового.

За розробленою методикою було проаналізовано препарати трави хвощу польового вітчизняного виробництва. Зокрема, було проаналізовано: траву хвощу польового в пачках по 50 г (виробник: ЗАТ "Ліктрави" (серії: 40210, 81211, 10312, 20312).

Вміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в різних серіях трави хвощу польового представлено в таблиці 1.

Згідно даних, представлених в таблиці 1, в усіх пробах була ідентифікована та кількісно визначена ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота, вміст якої в досліджуваній сировині лежить в межах від $0,1841 \pm 0,0091$ % до $0,3301 \pm 0,0173$ % в перерахунку на висушену сировину.

Таблиця 1

Вміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в досліджуваних препаратах трави хвощу польового

№ п/п	Лікарський засіб	Виробник, № серії	Вміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти у (в %) в перерахунку на висушену сировину
1	Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 40210	$0,3301 \pm 0,0173$
2	Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 81211	$0,1841 \pm 0,0091$
3	Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 10312	$0,2027 \pm 0,0105$
4	Трава хвоща польового в пачці по 50 г	ЗАТ "Ліктрави", серія 20312	$0,1869 \pm 0,0101$

Процес ідентифікації та кількісного визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, як компонента сировини хвощу польового в багатокомпонентних рослинних сумішах, полягає в знаходженні умов для хроматографічного розділення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти як компонента трави хвощу польового та біологічно активних речовин інших рослин.

В основу корисної моделі поставлено задачу - удосконалити ідентифікацію сировини трави хвощу польового в багатокомпонентних рослинних сумішах шляхом підтвердження наявності ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти та визначення її вмісту і, таким чином, забезпечити можливість стандартизації багатокомпонентних рослинних сумішей, до складу яких входить сировина трави хвощу польового.

Поставлена задача вирішується тим, що ідентифікація та кількісне визначення ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти як компонента трави хвощу польового проводиться 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 досягнути розділення піків ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти трави хвощу польового та біологічно активних речовин інших рослин.

Приклади конкретного виконання.

Приклад 1: Приготування досліджуваного розчину: 5 г рослинної суміші наступного складу: трави хвоща польового - 0,75 г, трави омели білої - 4 г, трави звіробою звичайного - 2 г, квіток та листя глоду - 1,65 г, плодів глоду - 1 г, трави м'яти перцевої - 0,2 г, трави меліси лікарської - 0,2 г, квіток ромашки аптечної - 0,2 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником об'ємом 100 мл, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному нагрівнику 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 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 - 1 мл/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 ди-Е-кофеїл-мезовинної 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 ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти на хроматограмі досліджуваного розчину;

$A_{\text{ст}}$ - площа піку ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти на хроматограмі розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти;

$C_{\text{ст}}$ - концентрація ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти в розчині порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, г/мл;

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

W - втрата в масі при висушуванні досліджуваної рослинної суміші.

Приготування розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти: 0,010 г достовірного зразку ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти вміщують в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняють в 50 мл 50 % етилового спирту, доводять тим же розчинником до мітки та перемішують.

На хроматограмі досліджуваного розчину повинен бути присутній пік, час виходу якого відповідає часу виходу піку ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти на хроматограмі розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

На підставі експериментальних даних для сировини трави хвощу польового нами
5 рекомендовано наступний граничний вміст ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти: не менше 0,15 % в перерахунку на висушену сировину.

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

Модельна суміш без вмісту трави хвощу польового.

10 5 г рослинної суміші наступного складу: трави омели білої - 4 г, трави звіробою звичайного - 2 г, квіток та листя глоду - 1,65 г, плодів глоду - 1 г, трави м'яти перцевої - 0,2 г, трави меліси лікарської - 0,2 г, квіток ромашки аптечної - 0,2 г вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником об'ємом 100 мл, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на
15 киплячому водяному нагрівнику 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"
20 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 трави хвощу польового.

25 1 г трави хвощу польового вносять в конічну колбу, обладнану зворотним холодильником, додають 50 мл 50 % етилового спирту та витримують на киплячому водяному нагрівнику 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
30 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.

35 Хроматограми розчину порівняння ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, екстракту трави хвощу польового, досліджуваного розчину та розчину модельної суміші без вмісту трави хвощу польового представлені на фіг. 1, фіг. 2, фіг. 3 та фіг. 4 відповідно.

За даних умов аналізу пік ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти має час виходу близько 26,3 хвилини (фіг. 1).

40 На хроматограмах екстракту трави хвощу польового та досліджуваного розчину присутній пік ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти (фіг. 2 та фіг. 3 відповідно), на хроматограмі модельної суміші без вмісту трави хвощу польового (фіг. 4) даний пік відсутній.

45 На підставі отриманих даних зроблено висновок, що у рослинній суміші, до складу якої входять трава хвоща польового, трава омели білої, трава звіробою звичайного, квітки, листя і плоди глоду, трава м'яти перцевої, трава меліси лікарської та квітки ромашки аптечної, присутність та вміст трави хвощу польового можна визначати за наявністю та кількісним вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти.

Винахід обумовлює можливість ідентифікації та визначення кількісного вмісту сировини трави хвощу польового в багатокомпонентних рослинних сумішах, до складу яких входять трава хвоща польового, трава омели білої, трава звіробою звичайного, квітки, листя і плоди глоду, трава м'яти перцевої, трава меліси лікарської та квітки ромашки аптечної за наявністю та вмістом ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти як фізіологічно активного компонента, що присутній в траві хвощу польового. Порівняння способів ідентифікації у прототипі та винаході наведено в таблиці 2.

55

60

Характеристика способів стандартизації трави хвощу польового

№ п/п	Об'єкт	Компонент	Об'єкт дослідження	Метод визначення
1	Найближчий аналог	сума флавоноїдів в перерахунку на ізокверцитрозид	Моносировина трави хвощу польового.	Метод УФ-спектрофотометрії. Можливість кількісної стандартизації моносировини трави хвощу польового; неспецифічне визначення.
2	Корисна модель	ди-Е-кофеїл-мезовинна кислота	Багатокомпонентні рослинні суміші, до складу яких входять: трава хвоща польового, трава омели білої, трава звіробою звичайного, квітки, листя і плоди глоду, трава м'яти перцевої, трава меліси лікарської та квітки ромашки аптечної.	Метод ВЕРХ. Можливість кількісної стандартизації сировини та багатокомпонентних рослинних сумішей трави хвощу польового; специфічне визначення.

Джерела інформації:

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.-544 с.
3. Бузук, Г.Н. Фармакогностическая характеристика хвоща полевого *Equisetum arvense* L // Вестник фармации - 2010. - № 2. - С. 65-73.
4. Mimica-Dukic N., Natasa Simin N., Cvejic J., Emilija Jovin E., Orcic D., Bozin B. Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) as Natural Antioxidants // Molecules.-2008. - Vol. 13. - P. 1455-1464.
5. European Pharmacopoeia.-6-th ed. - Strasbourg: European Department for the Quality of Medicines, 2007.-3308.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб стандартизації трави хвощу польового (*Equisetum arvense* L.) в багатокомпонентних рослинних сумішах з використанням методу ВЕРХ, який **відрізняється** тим, що трава хвощу польового в рослинних сумішах, що містять в своєму складі траву хвощу польового, траву омели білої, траву звіробою звичайного, квітки, листя і плоди глоду, траву м'яти перцевої, траву меліси лікарської та квітки ромашки аптечної, 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 ди-Е-кофеїл-мезовинної кислоти, вміст якої повинен бути не менше ніж 0,15 % у перерахунку на висушену сировину.



Фіг. 1

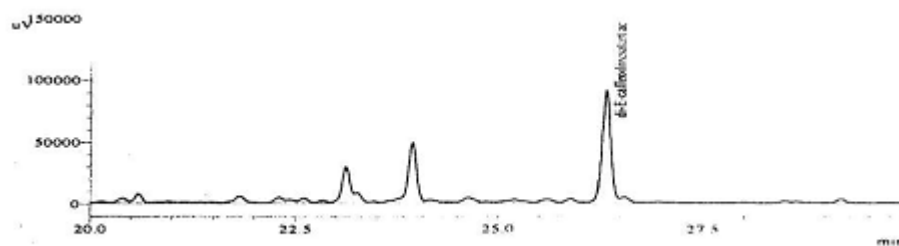


Fig. 2

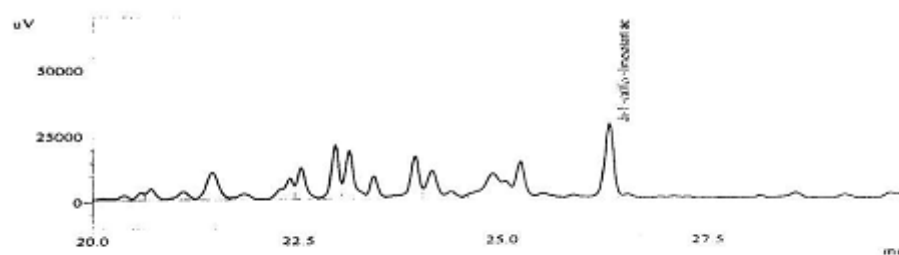


Fig. 3

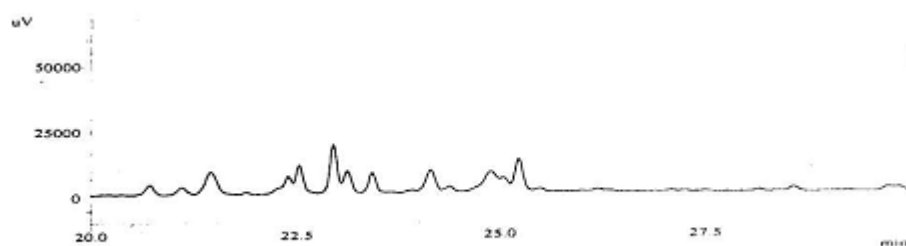


Fig. 4

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