

УКРАЇНА



ПАТЕНТ

НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

№ 158091

СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ
АЛОЕ ЛІКАРСЬКОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

Видано відповідно до Закону України "Про охорону прав на винаходи і корисні моделі".

Зареєстровано в Державному реєстрі України корисних моделей
01.01.2025.

Директор
Державної організації «Український
національний офіс інтелектуальної
власності та інновацій»

О.П. Орлюк



(19) **UA**

(51) МПК (2024.01)
A61K 36/00
A61K 36/886 (2006.01)

(21) Номер заявки: **u 2024 00526**

(22) Дата подання заявки: **31.01.2024**

(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: **02.01.2025**

(46) Дата публікації відомостей про державну реєстрацію та номер Бюлетеня: **01.01.2025, Бюл. № 1**

(72) Винахідники:
Кісіль Сергій Миколайович, UA,
Фесюнова Галина Степанівна, UA,
Абрамова Ганна Борисівна, UA

(73) Володілець:
ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",
Французький бул., 49/51, м. Одеса, 65061, UA

(54) Назва корисної моделі:

СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ АЛОЕ ЛІКАРСЬКОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

(57) Формула корисної моделі:

Спосіб контролю якості рослинної сировини алое лікарського призначення, за яким досліджувану пробу препарату піддають попередній пробопідготовці шляхом осадження полісахаридної фракції додаванням охолодженого до +4 °С спирту етилового у співвідношенні 1:3,3, пробу витримують охолодженою протягом 16 годин і центрифугують при 8000 об./хв, баластні речовини видаляють з надосадовою рідиною, полісахаридний осад ресуспендують в 0,9 % розчині натрію хлориду, далі, методом адсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 492 нм, визначають кількісний вміст полісахариду, використовуючи коефіцієнт молярного перерахунку K_m фактичного співвідношення молекулярних мас мономерів із складу субодиниці високоацетильованого полісахариду та моносахаридів стандартної речовини, при цьому значення K_m дорівнює 1,1736.



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **158091** (13) **U**
(51) МПК (2024.01)
A61K 36/00
A61K 36/886 (2006.01)

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ
ДЕРЖАВНА ОРГАНІЗАЦІЯ
"УКРАЇНСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
ОФІС ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ ТА ІННОВАЦІЙ"

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2024 00526</p> <p>(22) Дата подання заявки: 31.01.2024</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права інтелектуальної власності: 02.01.2025</p> <p>(46) Публікація відомостей про державну реєстрацію: 01.01.2025, Бюл.№ 1</p>	<p>(72) Винахідник(и): Кісіль Сергій Миколайович (UA), Фесюнова Галина Степанівна (UA), Абрамова Ганна Борисівна (UA)</p> <p>(73) Володілець (володільці): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТОВА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", Французький бул., 49/51, м. Одеса, 65061 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ АЛОЕ ЛІКАРСЬКОГО ПРИЗНАЧЕННЯ

(57) Реферат:

Спосіб контролю якості рослинної сировини алое лікарського призначення, за яким досліджувану пробу препарату піддають попередній пробопідготовці шляхом осадження полісахаридної фракції додаванням охолодженого до +4 °С спирту етилового у співвідношенні 1:3,3. Пробу витримують охолодженою протягом 16 годин і центрифугують при 8000 об./хв, баластні речовини видаляють з надосадовою рідиною, полісахаридний осад ресуспендують в 0,9 % розчині натрію хлориду, далі, методом адсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 492 нм. Визначають кількісний вміст полісахариду, використовуючи коефіцієнт молярного перерахунку K_m фактичного співвідношення молекулярних мас мономерів із складу субодиноці високоацетильованого полісахариду та моносахаридів стандартної речовини. Значення K_m дорівнює 1,1736.

UA 158091 U

Корисна модель належить до фармацевтичної галузі, а саме до стандартизації та контролю якості лікарських засобів під час виробництва та використання в умовах медичних закладів, і може бути використана для точного визначення маси діючої речовини, яка забезпечує фармакотерапевтичну активність препарату і введенні до дозування препарату норми стандартизації за мінімально прийнятним відхиленням.

Процедура кількісного визначення ацеманану проводять методом адсорбційної спектрофотометрії в ультрафіолетовій і видимій областях, передбачених Державною Фармакопесю України (ДФУ). Методика призначена для встановлення кількісного вмісту суми полісахаридів за присутності допоміжних речовин у складі активного фармацевтичного інгредієнта або готової лікарської форми.

Вміст біоактивного полісахариду (ацеманану) в препаратах алое найчастіше визначають колориметричним, спектрофотометричним методами або методом титрування солей полісахаридів алое (за діючими стандартами і нормативними документами виробників, АНД). Метод титрування ґрунтують на визначенні вмісту суми солей кальцію і магнію полісахаридів титруванням з розчином динатрію едетату і передбачений для контролю якості традиційного лікарського засобу - екстракту алое рідкого. Колориметричний і спектрофотометричний методи базують на залежності рівня поглинання світла речовиною, що визначають від інтенсивності світлового потоку, що проходить крізь аналітичну пробу за певної довжини хвилі світлового опромінення.

Колориметричний метод визначення кількісного вмісту полісахаридів алое ґрунтують на кислотному зневодненні вуглеводних компонентів (моно-та полісахаридів), досліджувані речовини, складені з пентоз, дегідратують до фурфуролу, а з гексоз - до гідроксиметилфурфуролу. Виміри проводять в діапазоні довжин хвиль від 480 до 490 нм, як стандартну речовину використовують моносахарид глюкозу [Dubois M., et al "Colourimetric method for determination of sugars and related substances"(1956)]. Метод вимірювання використовують для компендіальних випробувань, в окремих нормативних документах, статтях, специфікаціях, у фармакопєях та інших офіційних виданнях.

Спектрофотометричне кількісне визначення біоактивних полісахаридів алое (ацеманану) виконують в комплексній реакції з Конго червоним (Динатрію(біфеніл-4,4'-дііл-біс-2,2'-азо)біс(1-амінонафталін-4-сульфонатом) в розчині з концентрацією 0,2 мг/мл при довжині хвилі 540 нм [Eberendu A. R., et al Quantitative Colorimetric Analysis of Aloe Polysaccharides as a Measure of Aloe Vera Quality in Commercial Products // J. AOAC Int. - 2005. - 88. - P. 684-691., U.S. Patent 5512488, Colorimetric assay of bioactive polysaccharide (1996)]. Методика з Конго червоним використовують для стандартизації ЛРС і субстанцій з високим рівнем вмісту вимірюваних компонентів.

Приведені вище методи аналізу характеризують певними ознаками, що можуть ускладнювати визначення ацеманану та впливати на точність і об'єктивність результатів вимірювання. Так метод титрування солей полісахаридів може розглядатися як достатньо застарілий, з невизначеним ступенем відтворюваності і специфічності вимірюваного показнику. При цьому сама процедура переходу індикатора еріохрому чорного в стійке блакитне забарвлення, при титруванні, контролюють неапаратним способом.

Колориметричний метод кількісного визначення полісахаридів алое (ацеманану) фенол-сульфатним кислотним методом зневоднює полігексози до гідроксиметилфурфуролу з подальшим спектрофотометричним вимірюванням за довжені хвилі 490 нм як стандартну речовину використовують моносахарид глюкозу безводну або глюкози моногідрат є застосування коефіцієнта перерахунку ($K=0,9$) на абсолютно суху речовину. Метод має найкращу відтворюваність коли достатня і необхідна концентрація глюкози/полігексози у вимірюваному розчині сягає діапазону від 40 до 80 мкг/мл. Треба зазначити що глюкоза не є специфічним для ацеманану моносахаридом, її вміст характеризують високою варіабельністю і може сягати не більше 3% від загальної кількості гексоз у складі макромолекули. При розрахунку результатів вимірювання методом не враховують наявну різницю відносних молекулярних мас стандартного моносахариду і високоацетильованого полісахариду, до складу якого він входить як субодиниця (мономерів), що може відхилити результат вимірювання на величину значно перевищуючу межу прийнятності метода (>10-20%).

Спектрофотометричний метод визначення полісахариду ацеманану з Конго червоним є сучасним, апаратним методом якому властива висока специфічність і автоматизована фіксація результатів вимірювання. Найбільші недоліки методу висока ціна і відсутність комерційних зразків стандартної речовини (ацеманану) чистоти прийнятної для кількісного визначення.

Використання більш доступних стандартизованих полісахаридів неможливе з причини високої селективності методу. Наприклад поглинання β -глюкану в однаковій з полісахаридами

алоє концентрації демонструвало в 3 рази менший рівень поглинання світла за довжини хвилі 540 нм. Чутливість методу в рекомендованому діапазоні вимірювання поглинання (від 0,3 до 0,8 одиниць абсорбції світла) становить від 2 до 4 мг/мл фактичного вмісту речовини в розчині і не може вважатися достатньою для контролю дозування більшості готових форм препаратів алоє.

5 Методика з Конго червоним в системі контролю якості більш придатна для контролю сировинних матеріалів та запобіганню фальсифікації біоактивних полісахаридів специфічної хімічної побудови.

Метод спектрофотометричного вимірювання кількісного вмісту полісахаридів алоє в реакції утворення комплексу глюкоманани алоє/індикатор Конго червоний, яка зумовлює зсув спектра поглинання світла індикатором від 488 до 540 нм [U.S. Patent 5512488, Colorimetric assay of bioactive polysaccharide (1996)]. Це сучасний апаратний метод, високоспецифічний для визначення саме ацетильованих глюкомананів алоє.

10

Метод критично потребує використання стандарту полісахаридів алоє для проведення кількісного аналізу. Авторами застосовувався стандарт глюкомананів алоє, отриманий шляхом ліофільного висушування, власного приготування, який позиціонувався як нутрієнтний інгредієнт. Доступність фармакопейних стандартів або комерційних зразків речовини ацеманану високого ступеня чистоти залишають проблему до теперішнього часу.

15

Найбільш близького аналога на момент написання не виявлено.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробки способу контролю якості рослинної сировини алоє лікарського призначення методом адсорбційної спектрофотометрії шляхом визначення спектрів поглинання зневоднених до гідроксиметилфурфуролу манози та спектру поглинання досліджуваної проби, що містить ацеманан як біоактивний полісахарид і співставлення отриманих результатів, за рахунок чого стає можливим використання доступної стандартної речовини високого ступеня чистоти, прийнятної для фармацевтичного аналізу, що дозволить точно визначати масу діючої речовини, яка забезпечує фармакотерапевтичну активність препарату і ввести до дозування препарату норму стандартизації за мінімально прийнятним відхиленням.

20

25

Поставлена задача вирішується в способі контролю якості рослинної сировини алоє лікарського призначення, за яким досліджувану пробу препарату піддають попередній пробопідготовці шляхом осадження полісахаридної фракції додаванням охолодженого до +4 °C спирту етилового у співвідношенні (1:3,3), пробу витримують охолодженою протягом 16 годин і центрифугують при 8000 об/хв, баластні речовини видаляють з надосадовою рідиною, полісахаридний осад ресуспендують в 0,9 % розчині натрію хлориду, далі, методом адсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 492 нм, визначають кількісний вміст полісахариду, використовуючи коефіцієнт молярного перерахунку K_m фактичного співвідношення молекулярних мас мономерів із складу субодиниці високоацетильованого полісахариду та моносахаридів стандартної речовини, при цьому значення K_m дорівнює 1,1736.

30

35

Причинно-наслідковий зв'язок між запропонованими ознаками і очікуваним технічним результатом буде в наступному:

40 Вибір методу для стандартизації лікарської форми, що включає як діючу речовину ацеманан (полісахариди алоє), має поєднувати прийнятну межу і специфічність вимірювання основного показнику, віддаючи перевагу точності вимірювання вмісту дози активної речовини новогаленового препарату.

Доведена обов'язковість включення до метрологічних характеристик методу апаратну і програмну складові фіксації і розрахунку результатів.

45

Принцип вимірювання має порівняльний характер, передбачає пряме визначення досліджуваної речовини проти стандартної по залежності оптичної густини від вмісту і тому не потребує попередньої побудови калібрувальної кривої. Ця залежність має лінійний характер та описують коефіцієнтом кореляції кореляції оптичної густини в залежності від концентрації стандартного зразку манози коефіцієнтом кореляції встановленим експериментально (рис.) який дорівнює $K_r=0,9988$.

50

Запропонований нами спосіб дозволяє здійснювати контроль якості рослинної сировини алоє, лікарського призначення, напівпродуктів, що отримують на виробництві активних фармацевтичних інгредієнтів, лікарських субстанцій та готових форм препаратів на основі алоє, а також ізольованих біоактивних полісахаридів цієї рослини.

55

Досліди проводили з застосуванням UV-VIS спектрофотометрів СФ-46 ЛОМО та Cary 50 Varian при автоматичному режимі реєстрації спектра поглинання. Результати проведених досліджень кількісного визначення шляхом зневоднення полісахаридів алоє до гідроксиметилфурфуролу (табл.)

60

Показники поглинання в залежності від концентрації
отримані для досліджуваних зразків і стандартного зразка манози

Концентрація в пробі (С), мкг/мл	Показник поглинання λ 492 нм (Abs)		
	стандарт манози	полісахариди алое (I)	полісахариди алое (II)
20	0,213	0,231	0,217
40	0,448	0,517	0,405
60	0,620	0,718	0,646
80	0,831	0,964	0,901
100	1,064	1,121	1,077

Експериментально встановлено, що метод має:

найкращу чутливість вимірювання суми полісахаридів в діапазоні концентрації досліджуваних зразків від 20 до 80 мкг/мл, в перерахунку на манозу, що відповідає від 3 до 12 мкг/мл фактичного вмісту манози в розчині, який піддають вимірюванню за довжини хвилі 492 нм.

Сукупність всіх ознак методу, що запропонований, дозволяє: вирішувати проведення контролю якості за основним показником стандартизації - кількісним вмістом діючої речовини, що обумовлює фармакотерапевтичну активність препарату на основі алое.

Замінити в специфікації препарату показник вмісту з нелімітованою верхньою межею, що прийнято для традиційних галенових препаратів алое, на норму з мінімально прийнятним відхиленням ($\pm 5,0\%$; $\pm 7,5\%$) активного фармацевтичного інгредієнта від встановленої ефективної фармакотерапевтичної дози.

Дозволяє включення до методу апаратної та програмної складових фіксації і розрахунку результатів вимірювання.

На етапі наукової розробки і впровадження препарату дозволяє уніфікувати приготування та прогнозувати потенційну фармакотерапевтичну активність дослідних зразків.

Спосіб, що пропонують, полягає в наступному:

Аналітичний зразок з вмістом полісахаридів від 2 мг до 4 мг поміщають в мірну колбу розводять водою або ресуспендують 0,2 М розчину натрію хлориду змішують з спиртом етиловим 96 % в співвідношенні 1:3,3 і залишають при температурі 4 °С протягом 16 годин. Центрифугують при 6-8 тисяч об/хв 30 хвилин, надосадову рідину декантують і відкидають. Осад ресуспендують 0,2 М розчином натрію хлориду, переносять кількісно. По 2,0 мл отриманого розчину поміщають у пробірки, додають по 0,05 мл фенолу та 5,0 мл кислоти сірчаної перемішують і витримують в умовах кімнатної температури 30 хв.

Вимірюють оптичну густину розчину за довжини хвилі 492 нм, використовуючи як компенсаційний розчин, що складають з 2,0 мл води, 0,05 мл фенолу та 5,0 мл кислоти сірчаної.

Паралельно вимірюють 2,0 мл стандартного розчину манози, обробленого аналогічно.

Масову частку (X) суми полісахаридів, в перерахунку на манозу, обчислюють за формулою:

Масову частку (X) суми полісахаридів, в перерахунку на манозу, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A_1 \times a \times K_M}{A_0 \times m / v} \times 100$$

A_1 - оптична густина розчину полісахаридів;

A_0 - оптична густина розчину стандарту манози;

m/v - маса зразка, в грамах, або об'єм, в мілілітрах;

a - наважка манози в грамах;

K_M - коефіцієнт молярного перерахунку моносахариду манози в полісахарид ацеманан ($K_M=1,1736$).

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб контролю якості рослинної сировини алое лікарського призначення, за яким досліджувану пробу препарату піддають попередній пробопідготовці шляхом осадження полісахаридної фракції додаванням охолодженого до +4 °С спирту етилового у співвідношенні 1:3,3, пробу витримують охолодженою протягом 16 годин і центрифугують при 8000 об./хв,

- 5 баластні речовини видаляють з надосадовою рідиною, полісахаридний осад ресуспендують в 0,9 % розчині натрію хлориду, далі, методом адсорбційної спектрофотометрії за довжини хвилі 492 нм, визначають кількісний вміст полісахариду, використовуючи коефіцієнт молярного перерахунку K_m фактичного співвідношення молекулярних мас мономерів із складу субодиниці високоацетильованого полісахариду та моносахаридів стандартної речовини, при цьому значення K_m дорівнює 1,1736.

