



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **111355** (13) **U**
(51) МПК
G01N 33/15 (2006.01)

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2016 04215**
(22) Дата подання заявки: **18.04.2016**
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **10.11.2016**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.11.2016, Бюл.№ 21**

(72) Винахідник(и):
**Федосов Андрій Ігорович (UA),
Добровольний Олександр
Олександрович (UA),
Кисличенко Вікторія Сергіївна (UA),
Шаламай Анатолій Севастьянович (UA),
Новосел Олена Миколаївна (UA)**
(73) Власник(и):
**НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ,
вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA),
Федосов Андрій Ігорович,
вул. Дерев'янка, 16-б, кв. 70, м. Харків,
61103 (UA)**
(74) Представник:
**Лерантович Еліна Томашівна, реєстр.
№285**

(54) СПОСІБ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН У ФІТОЗАСОБАХ З АРТИШОКУ

(57) Реферат:

Спосіб якісного та кількісного визначення біологічно активних речовин у фітозасобах з артишоку включає обробку аналізованої проби екстракту артишоку, хроматографування і подальше УФ-детектування. Екстракт розчиняють у 10 мл 60 %-спирту, витримують на ультразвуковій бані при кімнатній температурі протягом 5 хв. Фільтрують крізь фільтр щільності K4. Хроматографування ведуть методом тонкошарової хроматографії у системі розчинників кислота мурашина безводна Р - кислота оцтова льодяна Р - вода Р - етилацетат Р (11:11:27:100), як реактив проявлення беруть розчин 50 г/л макрогелю 400 Р у метанолі Р. Оптичну густину випробовуваного розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 325 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин 20 % метанол Р.

UA 111355 U

Корисна модель належить до хіміко-фармацевтичної промисловості, а саме до дослідження та аналізу медичних препаратів, і може бути використана при стандартизації лікарської рослинної сировини та отриманих з неї субстанцій.

Відомий спосіб кількісного визначення стероїдів та флавоноїдів біологічно активних речовин рослинного походження (пат. UA№ 41309, G01N 33/15, 12.05.2009, бюл. № 9) включає екстракцію аналізованого зразка, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини забарвленого розчину. Аналізований зразок екстрагують в етанолі, проводять фільтрування екстракту, проводять розрахунок вмісту стероїдів та флавоноїдів.

Відомий спосіб спільного визначення гідроксикоричних кислот і флавоноїдів у листках кропиви вузьколистої (Матющенко Н.В. Вплив умов сушіння на вміст флавоноїдів та гідроксикоричних кислот у листках кропиви вузьколистої. Збірник наукових праць: "Розробка, дослідження і маркетинг нової фармацевтичної продукції". - П'ятигорськ. - Вип.67. - 2012. - С. 78-79), що включає подрібнення сировини і обробку його 70 % етиловим спиртом з наступним прямим спектрометричним визначенням гідроксикоричних кислот у перерахунку на кофейну кислоту при довжині хвилі 328 нм. Визначення флавоноїдів проводиться окремо методом диференційної спектрофотометрії по реакції з алюмінію хлоридом.

Відомі способи кількісного визначення сирінгіну у рослинних об'єктах (Куркин В.А. ТСХ и ВЭЖХ-анализ сирингина в *Syringa vulgaris* / В.А. Куркин, Н.А. Гриненко, Г.Г. Запесочная // Химия природных соединений. - 1992. - №1. - С. 45-49.). В запропонованій методиці аналіз екстрактів кори бузку звичайного проведено методом вискоєфективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням за допомогою зворотно-фазової хроматографії на колонці (0,39 x 30 см), яка була заповнена зворотно-фазовим сорбентом Силасорб С18. Для кількісного визначення сирінгіну (елеутерозиду В) в екстрактах з кори бузку звичайного як елюент використовували 12 % етанол, та суміш - етанол - 0,2 % оцтова кислота (12:88). Детектування проводилося УФ-детектором при довжині хвилі 266 і 278 нм. Ці методи не є уніфікованими.

Недоліком приведеної методики є тривалість аналізу, а також висока вартість приладів, що істотно обмежують його використання в хіміко-фармацевтичній промисловості.

Відомий спосіб кількісного і якісного визначення розділених речовин шляхом обробки хроматографічної пластини хімічним реагентом і порівняння інтенсивностей забарвлення зон аналізованих і еталонних речовин або визначення площі зон аналізованих речовин.

Найбільш близьким по технічній суті і досягнутому результату є "Способ определения биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии (М.В. Кочетова, Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов, А.А. Ревина Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина Российской академии наук, 2005 г.). Аналіз проведено методом вискоєфективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням при визначенні антиоксидантів

Недоліки вказаного способу є використання великої кількості розчинників і матеріалів, спосіб вимагає великих затрат часу, також спосіб лише для визначення біологічно активних фенолів і поліфенолів.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити універсальну методику якісного та кількісного визначення біологічно активних речовин у засобах рослинного походження, а саме у фітозасабах з артишоку.

Поставлена задача вирішується тим, що визначення проводять методом тонкошарової хроматографії.

У пропонованому способі для фракціонування використовується вискоєфективний хроматограф і з УФ-детектором для контролю виходу фракцій. Якісний і кількісний аналіз виділених фракцій здійснюється на спектрофотометрі.

Визначення якісного складу біологічно активних речовин проводять наступним чином, близько 0,2 г екстракту артишоку поміщають у стакан місткістю 50 мл (см³), додають 10 мл (см³) спирту (60 об/об) Р, витримують на ультразвуковій бані при кімнатній температурі протягом 5 хв, після чого фільтрують крізь фільтр щільності К4.

Розчин порівняння (а). 1,0 мг кислоти хлорогенової Р та 1,0 мг цинарину Р поміщають у флакон місткістю 10 мл (см³), розчиняють у 2 мл (см³) метанолу Р при перемішуванні.

Розчин порівняння (б). 0,5 мг лютеолін-7-О-глюкозиду Р поміщають у флакон місткістю 10 мл (см³), розчиняють у 2 мл (см³) метанолу Р при перемішуванні.

На лінію старту хроматографічної пластинки наносять, у вигляді смужок шириною 10-12 мм 10 мкл випробовуваного розчину, в одну точку по 10 мкл розчину порівняння (а) та розчину порівняння (б). Пластинку сушать у струмені теплого повітря протягом 10 хв, потім поміщають у

камеру із сумішшю розчинників кислота мурашина безводна Р - кислота оцтова льодяна Р - вода Р - етилацетат Р (11:11:27:100) і хроматографують висхідним способом. Коли фронт розчинників пройде близько 13 см від лінії старту, пластинку виймають із камери, сушать у струмені теплого повітря до повного видалення запаху розчинників. Потім пластинку витримують у сушильній шафі за температури 100 °С протягом 5 хв і теплу пластинку обприскують розчином 10 г/л дифенілборної кислоти аміноетиловим ефіром Р у метанолі Р. Потім мокру пластинку обприскують розчином 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р і переглядають в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм.

Приклад 1.

Нижче наведено послідовність зон, що флуоресціюють, на хроматографії випробовуваного розчину порівняння. На хроматографі випробовуваного розчину можуть виявлятися також інші зони, що флуоресціюють.

Таблиця

верхня частина пластинки	
	слабка блакитна флуоресцююча зона
лютеолін-7-О-глюкозид: жовта або оранжева флуоресцююча зона	жовта або оранжева флуоресцююча зона (лютеолін-7-О-глюкозид)
цимарин (1,4-ди-О-кофеїл-О-хінна кислота): блакитна флуоресцююча зона	блакитна флуоресцююча зона (цимарин (1,4-ди-О-кофеїл-Д-хінна кислота))
кислота хлорогенова: слабка блакитна флуоресцююча зона	слабка блакитна флуоресцююча зона (кислота хлорогенова)
розчин порівняння (а) розчин порівняння (b)	випробовуваний розчин

Запропонований спосіб дозволяє проводити стандартизацію екстракційних препаратів рослинного походження і лікарської сировини одночасно за вмістом біологічно активних речовин і може використовуватися при розробці нормативно-технічної документації.

В результаті експериментальних досліджень за кількісним визначенням біологічно активних речовин в рослинній сировині і лікарських препаратах рослинного походження встановлені оптимальні умови проведення дослідів.

Приклад 2. Кількісне визначення гідроксикоричних кислот у перерахунку на цимарин у екстракті артишоку.

Кількісне визначення гідроксикоричних кислот у перерахунку на цимарин у екстракті артишоку проводять методом абсорбційної спектрофотометрії.

Вихідний розчин. Близько 1,0 г (точна наважка) екстракту артишоку поміщають в колбу, додають 25,0 мл (см³) води Р, струшують до повного розчинення екстракту та фільтрують.

Випробовуваний розчин. В мірну колбу місткістю 50 мл вносять 5 мл вихідного розчину, доводять об'єм розчину до позначки 20 % метанолом Р і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 325 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин 20 % метанол Р.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (Х) у перерахунку на цимарин, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50}{616 \cdot 1 \cdot 5},$$

де А - оптична густина випробовуваного розчину;

616 - питомий показник поглинання цимарину у метанолі Р за довжини хвилі 325 нм.

Приклад 3. Кількісне визначення гідроксикоричних кислот у перерахунку на цимарин у фітозасобах з артишоку.

Кількісне визначення гідроксикоричних кислот у перерахунку на цимарин у фітозасобах з артишоку проводять методом абсорбційної спектрофотометрії.

Вихідний розчин. 5 таблеток (або вмісту капсул) поміщають у колбу, додають 25,0 мл (см³) води Р, струшують протягом 15 хв та фільтрують.

Випробовуваний розчин. В мірну колбу місткістю 50 мл вносять 5 мл вихідного розчину, доводять об'єм розчину до позначки 20 % метанолом Р і перемішують.

Вимірюють оптичну густину випробовуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 325 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин 20 % метанол Р.

Вміст суми гідроксикоричних кислот (X) в 1 таблетці (1 капсулі) у перерахунку на цинарин, у міліграмах, обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot 1}{616 \cdot 5 \cdot 5}$$

де А - оптична густина випробовуваного розчину;

5 616 - питомий показник поглинання цинарину у метанолі Р за довжини хвилі 325 нм.

Розроблений спосіб якісного та кількісного визначення біологічно активних речовин у засобах рослинного походження, а саме у фітозасобах з артишоку, може бути використаний у фармацевтичній і медичній промисловості для стандартизації рослинної сировини і лікарських препаратів рослинного походження за змістом біологічно активних речовин при проведенні

10 технологічного контролю за виробництвом.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб якісного та кількісного визначення біологічно активних речовин у фітозасобах з артишоку, який включає обробку аналізованої проби екстракту артишоку, хроматографування і подальше УФ-детектування, який **відрізняється** тим, що екстракт розчиняють у 10 мл 60 %-спирту, витримують на ультразвуковій бані при кімнатній температурі протягом 5 хв, після чого фільтрують крізь фільтр щільності К4, хроматографування ведуть методом тонкошарової хроматографії у системі розчинників кислота мурашина безводна Р - кислота оцтова льодяна Р

20 - вода Р - етилацетат Р (11:11:27:100), як реактив проявлення беруть розчин 50 г/л макрогону 400 Р у метанолі Р, оптичну густина випробовуваного розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 325 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як компенсаційний розчин 20 % метанол Р.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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

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