



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **53596** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/15МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС**
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СИРИНГІНУ (ЕЛЕУТЕРОЗИДУ В) І ФЛАВОНОЇДІВ В БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ СУБСТАНЦІЯХ РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

1

2

(21) u201004627

(22) 19.04.2010

(24) 11.10.2010

(46) 11.10.2010, Бюл.№ 19, 2010 р.

(72) КИСЛИЧЕНКО ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА, ПОПИК
АНДРІЙ ІВАНОВИЧ, КОРОЛЬ ВІКТОРІЯ ВІКТОРІ-
ВНА, ГРУДЬКО ВАДИМ ОЛЕКСІЙОВИЧ, КОЛІС-
НИК ЮЛІЯ СЕРГІЇВНА

(73) КИСЛИЧЕНКО ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА

(57) 1. Спосіб кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів в біологічно активних субстанціях рослинного походження, що включає екстракцію аналізованого зразка, фільтрування екстракту, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини розчину, розрахунок вмісту сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів, який **відрізняється** тим, що для визначення сирингину (елеутерозиду В) використовують як екстрагент етанол та суміш хлороформ-етанол, а для визначення флавоноїдів

як екстрагент використовують суміш етанолу з кислотою хлоридною.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) зразок екстрагують 70 %, 95 % етиловим спиртом та сумішшю хлороформ-етанол (5:1) при нагріванні не більше 50 С°, протягом 1 год., оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, застосовуючи як контрольний розчин суміш хлороформ-етанол (5:1).3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для кількісного визначення флавоноїдів зразок екстрагують сумішшю етанолу 90 % і 5 % кислоти хлоридної (за об'ємом), нагрівають протягом 60 хвилин, оптичну густину розчину вимірюють на спектрофотометрі при довжині хвилі 430 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, застосовуючи як розчин порівняння 2 мл екстракту, доведеного розчином 95 % етилового спирту до 25 мл.

Корисна модель відноситься до способів кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів, присутніх в біологічно активних субстанціях рослинного походження і може бути використаний у хіміко-фармацевтичній промисловості для контролю за виробленням лікарських препаратів.

За хімічною будовою елеутерозиди класифікують на дві групи: глікозиди ароматичної природи (В, Е) і глікозиди неароматичної природи (А, С). Найбільш поширеним в рослинному світі є елеутерозид В (сирингін). Він зустрічається в рослинах різних родин, зокрема в Oleaceae (кора, листя, квітки, корені бузку звичайного), Araliaceae (кореневища з коренями елеутерококка колючого), Fabaceae (кора акації), Loranthaceae (пагони омели білої). Елеутерозид В в якості державного стандартного зразку, використовують як маркер при проведенні стандартизації лікарських препаратів з кореневищ і коренями елеутерококка колючого. Проведені доклінічні дослідження підтверджують високий рівень адаптогенної, імуностимулюючої, антиоксидантної дії цієї біологічно активної речо-

вини. Тому актуальним є розробка експресних методів ідентифікації та кількісного визначення сирингину в препаратах та сировині рослинного походження.

Відомі способи кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) 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 високоефективної рідинної хроматографії зі спектрофотометричним детектуванням за допомогою зворотно-фазової хроматографії на колонці (0,39 × 30 см), яка була заповнена зворотно-фазовим сорбентом Силасорб С₁₈. Для кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) в екстрактах з кори бузку звичайного в якості елюента 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 й розроблені для сировини тільки одного виду рослин.

(13) **U**(11) **53596**(19) **UA**

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

Серед інших біологічно активних речовин, що найбільш поширені в рослинному світі є флавоноїди. Флавоноїдами називається група фенольних сполук - похідних 2-фенилбензо-пірона в основі будови яких знаходиться скелет флавона. У рослинах вони зустрічається у виглядів глікозидів і вільних агліконів. На сьогодні великий клас природних сполук - флавоноїдів - використовується недостатньо широко: здебільшого вони входять до складу різних сумарних препаратів. Кількісний склад флавоноїдів у рослинах різний: у середньому він знаходиться в межах від 0,5 % до 5 %, а іноді досягає 20 % (квітки софори японської).

Відомі способи кількісного визначення флавоноїдів у рослинних об'єктах не є уніфікованими й розроблені для сировини тільки одного виду рослин. (Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного // Химико-фармацевтический журнал, 1998, № 6, С.35-36. Использование хлорида алюминия для определения суммы флавоноидов в цветках боярышника // Фармация, 1994, № 6, С. 42-45).

Найбільш поширеними є оптичні методи визначення флавоноїдів, засновані на вимірі довжини хвилі в максимумах поглинання, аналізованих речовин і їхніх пофарбованих комплексів. Широке застосування одержав прямий і диференціальний спектрофотометричні методи. Робочими діапазонами довжин хвиль служать максимуми від 330 до 370 нм. (Смирнова Л. П., Первых Л. Н., Количественное определение флавоноидов в желчегонном сборе. // Химико-фармацевтический журнал № 3 - 1999. С. 37-39. Сироткина Е. Е., Выделение и анализ биологически активных веществ, Томск, 1987).

Широке поширення при визначенні флавоноїдів одержали різні варіанти хроматографії. Методи тонкошарової хроматографії зв'язані зі значними труднощами при кількісній оцінці хроматограми. Останнім часом найбільше застосування одержав метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ). Для збільшення чутливості визначення фізико-хімічних методів використовують ультрафіолетове, флуориметричне й електрохімічне детектування. Незважаючи на високу чутливість ВЕРХ (5-10-5 мг/мол), тривалість аналізу, а також висока вартість приладів істотно обмежують його використання в біохімічних дослідженнях. Виявлення флавоноїдів у рослинній сировині проводять реакцію відновлення до ціанідину (ціанідинова проба). В наслідок хімічної взаємодії флавоноїдів з магнієм або цинком у присутності кислоти хлоридної утворюються ціанідини забарвленні в червоний колір.

Найбільш близьким по технічній суті і досягнутому результату є «Спосіб кількісного визначення стероїдів та флавоноїдів біологічно активних речовин рослинного походження» (пат UA. № 41309, публ. 12.05.2009, бюл. № 9), що включає екстракцію зразку, що аналізуємо, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини забарвленого розчину, фільтрування

екстракту, розрахунок вмісту стероїдів та флавоноїдів. До недоліків відноситься те, що цей метод не є універсальним.

Таким чином розробка експресних і високочутливих методів визначення сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів продовжує представляти значний інтерес для хіміко-фармацевтичної галузі.

В основу корисної моделі покладено завдання розробити універсальну методику ідентифікації та кількісного визначення сирингину (елеутерозиду В) і флавоноїдів присутніх в біологічно активних субстанціях рослинного походження.

Поставлена задача вирішується наступним чином, спочатку проводять екстракцію біологічно активної субстанції, тобто аналізованого зразку - для визначення сирингину (елеутерозиду В) використовують як екстрагент 70 %, 95 % етанол та суміш хлороформ-етанол в співвідношенні (5:1), а для визначення флавоноїдів в якості екстрагента використовується суміш 90 % етанолу з 5 % кислотою хлоридною (дозують за об'ємом), що дозволяє проводити одночасно екстракцію і гідроліз флавоноїдних глікозидів, фільтрування екстракту, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини забарвленого розчину (забарвлення - для речовин флавоноїдної природи), потім проводять розрахунок вмісту сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів.

Запропонований спосіб дозволяє проводити стандартизацію екстракційних препаратів рослинного походження і лікарської сировини одночасно за вмістом сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів і може використовуватися при розробці нормативно-технічної документації.

В результаті експериментальних досліджень за кількісним визначенням сирингину (елеутерозиду В) та флавоноїдів в рослинній сировині і лікарських препаратах рослинного походження встановлені оптимальні умови проведення дослідів.

Приклад 1.

Метод ідентифікації сирингину (елеутерозиду В) в рослинній сировині і лікарських препаратів рослинного походження.

Досліджуваний матеріал, а саме 5 мл екстракту або 5.0 г сировини переносять в конічну колбу об'ємом 100 мл і проводять фракційне екстрагування по 20 мл 70 %, 95 % етиловим спиртом, та сумішшю хлороформ - етанол в різних співвідношеннях (6:1, 5:1, 4:1, 3:1). Екстракцію проводять при нагріванні не більше 50 °С, протягом 1 год. Витяжки об'єднують, фільтрують крізь паперовий фільтр в колбу об'ємом 100 мл, і випарюють досуха під вакуумом при 40 °С. До сухого залишку в колбі додають 10 мл води і проводять очищення водної фази трикратною екстракцією чотирьоххлористим вуглецем по 10 мл. Сирингін (елеутерозид В) виділяють з водної фази сумішшю хлороформ-етанол (5:1) 5 раз послідовно: 20, 15, 15, 10, і 10 мл. Отриманні витяжки фільтрують крізь паперовий фільтр з 1.0 г безводного сульфату натрію (розчин А).

На лінію старту пластинки "Silufol UV-254" або "Sorbfil"-ПТСХ-А-УФ наносять 0,01 мл розчину А і хроматографують висхідним методом в системі розчинників бутанол-етиловий спирт-вода (5:2:3)

для тонкошарової хроматографії або хлороформ-метанол-вода (30,5:16,5:3,5) для паперової хроматографії. Після висихання пластинки проявляють в УФ-світлі, при довжині хвилі 254 нм. На хроматограмі повинна проявлятися одна пляма синього кольору, яка за значенням R_f 0,45 (для ТШХ) і R_f 0,94 (для ПХ) відповідає сирінгіну (елеутерозиду В).

Ідентифікацію сирінгіну (елеутерозиду В) підтверджують шляхом обробки тонкошарової або паперової хроматограми 10 % розчином сірчаної кислоти або розчином хлориду сурьми розведеного в хлороформі (1:5), після чого хроматограму сушать 5 хв. при 100-105 °С. При цьому пляма з R_f 0,45 (для ТШХ) і R_f 0,94 (для ПХ) повинна набувати синього кольору при денному освітленні. Приготування розчину сірчаної кислоти: 0,01 г диазобензосульфокислоти розчиняють в 10 мл 10 % розчину натрію карбонату. Розчин використовують свіжо зготованим.

Приклад 2

Кількісне визначення сирінгіну (елеутерозиду В) в рослинній сировині і лікарських препаратів рослинного походження.

Кількісне визначення сирінгіну (елеутерозиду В) в рослинній сировині і лікарських препаратів рослинного походження проводять спектрофотометричним методом. 20 мл розчину А переносять до мірної колби об'ємом 50 мл і доводять об'єм колби до позначки сумішшю хлороформ-етанол в різних співвідношеннях (6:1, 5:1, 4:1, 3:1) (розчин Б). Вимірюють оптичну густину розчину Б, на спектрофотометрі при довжині хвилі 278 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм, застосовуючи в якості контрольного розчинну суміш хлороформ - етанол в різних співвідношеннях (6:1, 5:1, 4:1, 3:1). Кількісний вміст елеутерозиду В (х, %) розраховують за формулою:

$$X = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot 100 \cdot F}{E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot 20 \cdot m \cdot (100 - W)},$$

де А - оптична густина досліджуемого розчину;

$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ - 302, питомий показник поглинання елеутерозиду В при 278 нм;

m - маса сировини, г;

W - втрата в масі при висушуванні сировини, %;

F - коефіцієнт розведення;

Приклад 3

Кількісне визначення флавоноїдів в рослинній сировині і лікарських препаратів рослинного походження.

Близько 1 г (точна наважка) екстракту або рослинного матеріалу поміщають в колбу об'ємом 100 мл, додають 30 мл 90 % етилового спирту, який містить 5 % хлоридну кислоту (за об'ємом) колбу нагрівають протягом 60 хв. Екстракт охолоджують до кімнатної температури, перемішують та фільтрують до мірної колби об'ємом 100 мл. Доводять об'єм фільтрату до позначки сумішшю 90 % етилового спирту і 5 % хлоридною кислотою (дозують за об'ємом), (розчин А). 2 мл розчину А піпеткою поміщають в мірну колбу об'ємом 25 мл, додають 2 мл 1 % розчину хлористого алюмінію в 95 % етиловому спирті і доводять об'єм до позначки 95% етиловим спиртом (розчин Б). 25 мл розчину Б переносили до колби на 50 мл з притертим шліфом. Закривали скляною кришкою, струшували для перемішування рідин та нагрівали протягом 30 хв. у термостаті при 55 °С. Через 30 хв. вимірювали оптичну густину розчину на спектрофотометрі при довжині хвилі 430 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. В якості розчину порівняння використовують 2 мл екстракту доведеного розчином 95 % етилового спирту до 25 мл. Вміст суми флавоноїдів в перерахунку на кверцетин в абсолютно сухій сировині обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A \cdot F \cdot 100 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 2 \cdot E_{1\text{ см}}^{1\%} \cdot (100 - W)},$$

де А - оптична густина досліджуемого розчину;

F - коефіцієнт розведення;

$E_{1\text{ см}}^{1\%}$ - 764,6 питомий показник поглинання кверцетину при 430 нм;

m - маса сировини, г;

W - втрата в масі при висушуванні сировини, %;

Таким чином, способи кількісного визначення сирінгіну (елеутерозиду В) та флавоноїдів у перерахунку на кверцетин є уніфікованими, тому що дозволяють проводити визначення діючих речовин у рослинній сировині і різних видів екстракційних препаратів одночасно за єдиною методикою, при цьому відмінність в аналізі полягає тільки у величині навішень, екстрагентів і ступеня їхнього розведення до фотометрируемого розчину.

Розроблений спосіб ідентифікації і кількісного визначення сирінгіну (елеутерозиду В) і флавоноїдів, може бути використаний у фармацевтичній і медичній промисловості для стандартизації рослинної сировини і лікарських препаратів рослинного походження за змістом діючих речовин (флавоноїдів і сирінгіну) при проведенні технологічного контролю за виробництвом.