



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **41309** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 33/15МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ**ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**видається під
відповідальність
власника
патенту**(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ СТЕРОЇДІВ ТА ФЛАВОНОЇДІВ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН РОСЛИННОГО ПОХОДЖЕННЯ**

1

2

(21) u200900463

(22) 22.01.2009

(24) 12.05.2009

(46) 12.05.2009, Бюл.№ 9, 2009 р.

(72) КИСЛИЧЕНКО ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА, UA,
ЖУРАВЕЛЬ ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, UA, ЯРО-
ШЕНКО ІЛЛАРІОН ВІКТОРОВИЧ, UA, ТЕРНІНКО
ІННА ІВАНІВНА, UA, БУРДА НАДІЯ ЄВГЕНІЇВНА,
UA, КИСЛИЧЕНКО ОЛЕКСАНДРА АНАТОЛІЇВНА,
UA, ГРУБНИК ІГОР МИХАЙЛОВИЧ, UA, НЕЩЕРЕТ
ОЛЕНА ІВАНІВНА, UA

(73) КИСЛИЧЕНКО ВІКТОРІЯ СЕРГІЇВНА, UA

(57) 1. Спосіб кількісного визначення стероїдів та флавоноїдів біологічно активних речовин рослинного походження, який включає екстракцію аналізованого зразка, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини забарвленого розчину, який **відрізняється** тим, що аналізований зразок екстрагують в етанолі,

проводять фільтрування екстракту, розрахунок вмісту стероїдів та флавоноїдів.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для кількісного визначення стероїдів сухого екстракту та таблеток худії, зразок екстрагують 96% етанолом, для сухого екстракту при нагріванні протягом 1 години з моменту кипіння розчинника, потім екстракт охолоджують до кімнатної температури, а для таблеток проводять холодне настоювання до повного розчинення.3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що для кількісного визначення флавоноїдів в зборі рослинного походження, зразок екстрагують 50% етанолом, кип'ятять зі зворотним холодильником на водяній бані протягом 1 години, охолоджують, а в настійці рослинного походження зразок екстрагують 70% етанолом; далі додають 2мл 2% розчину алюмінію хлориду, через 10хв 2мл 5% розчину кислоти оцтової.

Корисна модель відноситься до способів кількісного визначення стероїдів та флавоноїдів, присутніх в різних лікарських засобах, одержуваних з лікарської рослинної сировини, і може бути використаний у хіміко-фармацевтичній промисловості для контролю за виробленням продуктів.

До стероїдів відносять велику групу складних сполук, які мають виражену фармакологічну дію. Фітохіміки виділяють стероїди (похідні циклопентанпергідрофенантрена) і тритерпени - результат циклізації шести ізопренових залишків у тетра- або пентациклічних структурах. Всі вони мають загальний біохімічний генез, структурну подібність і формують важливі фармакологічні групи біологічно активних речовин різних лікарських рослин.

Стероїди, які входять до складу рослини є антиоксидантами й мають антивірусну активність.

Флавоноїдами називається група природних сполук – похідних 2-фенилбензо - пірона. У рослинах зустрічаються у виді глікозидів і вільних агліконів. Свою назву вони одержали від латинського слова «flavus» (жовтий), тому що перші виділені з рослин флавоноїди мали жовте забарвлення. Ве-

ликий клас природних сполук – флавоноїдів – використовується недостатньо широко; в основному вони входять до складу сумарних препаратів. Вміст флавоноїдів у рослинах різний: у середньому 0,5-5%, а іноді досягає 20% (у квітках софори японської). Нагромадження цих сполук у значних кількостях відзначається в надземних частинах (квітки, плоди, листя). Рідше й у менших кількостях флавоноїди накопичуються в підземних частинах рослини. Флавоноїди в основному накопичуються у формі глікозидів, рідше у виді агліконів. Здатність флавоноїдів спричиняти антиоксидантний ефект, зв'язувати вільні радикали та формувати більш стабільні може використовуватись в профілактиці та лікуванні наслідків радіоактивного опромінення, різноманітних отруєннях, для попередження та сповільнення процесів старіння.

Флавоноїди мають Р-вітамінну активність, зменшують крихкість кровоносних капілярів (рутин), підсилюють дію аскорбінової кислоти, дають седативний ефект. Флавоноїди кореня солодки мають протизапальну, противиразову дію; деякі з них

(13) **U**(11) **41309**(19) **UA**

мають кровоспинну, спазмолітичну, сечогінну і жовчогінну дію.

Препарати рослинних флавоноїдів є природними регуляторами резистентності слизової оболонки шлунка, імунологічних процесів, вільнорадикальних реакцій тощо. Для них властива гепатопротекторна і антиоксидантна активність. Вважають, що використання препаратів рослинних флавоноїдів, як і орієнтація на високий вміст цих сполук у дієті, є чинником профілактики захворювань шлунка, печінки, серцево-судинної системи тощо. У травному каналі рослинні флавоноїди абсорбуються добре. Після одноразового прийому максимальна концентрація визначається протягом 30-60хв, а при повторному введенні сталий рівень у крові настає вже через добу.

На мікросомну систему окиснення рослинні флавоноїди не впливають, тому в разі застосування флавоноїдів з іншими засобами це не відбивається на їх фармакокінетиці та фармакодинаміці. Виводяться з організму переважно з жовчю, меншою мірою – з сечею.

Відомі способи кількісного визначення флавоноїдів у рослинних об'єктах не є уніфікованими й розроблені тільки для сировини одного виду рослин [Ярцева І.Б., Куркин В.А. Количественное определение суммы флавоноидов в траве одуванчика лекарственного // Фармация, 1996, №4, С.24-26; Самылина И.А., Евдокимова О.В., Кашникова М.В. Использование хлорида алюминия для определения суммы флавоноидов в цветках боярышника // Фармация, 1994, №6, С.42-45; Смирнова Л.П., Первых Л.Н. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного // Химико-фармацевтический журнал, 1998, №6, С.35-36].

Фізико-хімічні властивості флавоноїдів – безбарвні або забарвленні (жовті або жовтогарячі) кристалічні речовини. Антоціани в залежності від рН середовища клітинного соку додають рослинам різне забарвлення: червоне (у кислому середовищі), синє (у лужному середовищі), фіолетове (у нейтральному середовищі) різної інтенсивності і відтінків. Глікозиди флавоноїдів розчинні у воді, аглікони – в органічних розчинниках. Під впливом ферментів і кислот глікозиди флавоноїдів гідролізуються, під впливом світла, луку легко окислюються, ізомеризуються, руйнуються.

Відомі 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 (330-370нм) [Смирнова Л.П., Первых Л.Н., Количественное определение суммы флавоноидов в желчегонном сборе. // Химико-фармацевтический журнал 3 - 1999, с.37-39. Сироткина Е.Е., Выделение и анализ биологически активных веществ, Томск, 1987].

Найбільш чутливим є боргідридний метод. Метод не знайшов широкого застосування через малий час стійкості пофарбованого комплексу й поганої відтворюваності результатів, однак дозволяє визначати сумарний зміст флавоноїдів у розчині,

але не дозволяє ідентифікувати окремі компоненти в суміші.

Широке поширення одержали при визначенні флавоноїдів різні варіанти хроматографії. Методи тонкошарової хроматографії зв'язані зі значними труднощами при кількісній оцінці хроматограм. 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 (5-10-5мг/мол), тривалість аналізу, а також висока вартість приладів істотно обмежують його використання в біохімічних дослідженнях. [Георгиевский В.П.- 1976, Никитина Т.Н., и др. Разработка методов стандартизации многокомпонентных сборов // Теоретические и практические аспекты изучения лекарственных растений. Томск, 1996, с.117-119., Хеншен А. Высокоэффективная жидкостная хроматография в биохимии. М: Мир, 1988, с.645-650].

Одиничні роботи присвячені електрохімічному дослідженню флавоноїдів. Для визначення флавоноїдів використовували полярографічні методи із ртутним краплинним індикаторним електродом.

Для виявлення флавоноїдів у сировині проводять реакцію відновлення до ціанідину (ціанідина проба). Флавоноїди з магнієм або цинком у присутності хлористоводневої кислоти (концентрованої) утворюють ціанідини, забарвленні в червоний колір. Флавіон є у вигляді безбарвних кристалів, а його оксипохідне з одною гідроксильною групою – флавонол має блідо-жовте забарвлення. У залежності від положення гідроксилів і їхньої кількості збільшується густина забарвлення; досить часто в рослинах зустрічаються сполуки з 4-5 і навіть 7 гідроксилами. При метилюванні гідроксилів зростає різноманітність відтінків. Усі флавоноїди в залежності від ступеня окиснення діляться на групи: похідні флавона, флавонона, флавонола, флавононола, ізофлавонона, халкона, антоціаніди, катехіни й ін.

Таким чином розробка експресних і високочутливих методів визначення стероїдів і флавоноїдів продовжує представляти інтерес.

В основу корисної моделі покладено завдання удосконалити методику кількісного визначення стероїдів та флавоноїдів біологічно активних речовин (БАР) рослинного походження.

Поставлена задача вирішується наступним чином, спочатку проводять екстракцію БАР, тобто аналізуемого зразку в етанолі, фільтрування екстракту, взаємодію його з хімічними реагентами у розчині та вимірювання оптичної густини забарвленого розчину, проводять розрахунок вмісту стероїдних сполук та флавоноїдів.

Запропонований спосіб дозволяє проводити стандартизацію екстракційних препаратів й лікарської сировини по змісту діючих речовин і може використовуватися при розробці нормативно-технічної документації.

В результаті експериментальних досліджень по кількісному визначенню діючих речовин у сухих екстрактах, таблетці з екстракту та настоянці рос-

линного походження встановлені оптимальні умови проведення дослідів.

Приклад 1

Кількісне визначення стероїдів в екстракті худі.

Близько 1г (точна наважка) екстракту поміщають в плоскодонну колбу місткістю 100мл, додають піпеткою 50мл 96% спирту етилового, колбу з сировиною зважують та нагрівають протягом 1 години з моменту початку кипіння розчинника. Потім екстракт охолоджують до кімнатної температури, перемішують та фільтрують крізь паперовий фільтр 30-40мл (розчин А). 5мл розчину А піпеткою переносять до скляної пробірки зі шліфом та сюди ж додають піпеткою 5мл 1% розчину парадиметиламінобензальдегіду в 4н спиртовому розчині хлористоводневої кислоти. Пробірку закривають скляною кришкою, встряхують для перемішування рідин та нагрівають протягом 2 годин у термостаті при температурі $58 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Розчин охолоджують до кімнатної температури та визначають його оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 518нм в кюветах з товщиною шару 1см. В якості розчину порівняння використовують 5мл розчину А та 5мл 4н спиртового розчину хлористоводневої кислоти, який також витримують в термостаті аналогічно випробовуваному розчину. Вміст суми стероїдних сполук в переліку на абсолютно суху речовину знаходять за формулою:

$$X = \frac{a * 0,0101 * 50 * F * 100 * 100}{m * (100 - W)}$$

де: а - кількісний вміст кобальту хлориду, шляхом залежності оптичної густини розчинів кобальту хлориду від концентрації;

0,0101 - коефіцієнт перерахунку концентрації кобальту хлориду;

50 - початковий об'єм витягу;

F - коефіцієнт розведення;

m - наважка сировини, г;

W - втрата маси при висушуванні сировини, %.

Приклад 2

Кількісне визначення стероїдів в таблетках з екстрактом худі.

Беруть 3 розтерті таблетки, поміщають в плоскодонну колбу місткістю 100мл, додають піпеткою 50мл 96% спирту та проводять холодне настоювання до повного розчинення. Потім розчин перемішують та фільтрують крізь паперовий фільтр. Далі поступають аналогічно методиці для екстракту в прикладі 1.

Вміст стероїдів розраховують за формулою

$$X = \frac{a * 0,0101 * 50 * F * m_{\text{сер}}}{m}$$

де: а - кількісний вміст кобальту хлориду, шляхом залежності оптичної густини розчинів кобальту хлориду від концентрації;

0,0101 - коефіцієнт перерахунку концентрації кобальту хлориду;

50 - початковий об'єм витягу;

F - коефіцієнт розведення;

m - наважка сировини, г;

$m_{\text{сер}}$ - середня маса таблетки.

Приклад 3

Кількісне визначення флавоноїдів у зборах №1, 2 та зборі №3 «Гепатіт-1».

Для аналізу використані наступні збори:

Збір №1

Трава споришу	2,8-3,2
Листя сени	1,8-2,1
Листя кропиви	2,0-3,2
Трава деревію	0,8-1,

збір №2

Кора крушини	38,0-42,0
плоди шипшини	18,0-22,0
листя м'яти перцевої	18,0-22,0
корені вовчуга	8,0-12,0
Плоди фенхелю	9,0-13,0

збір №3 «Гепатіт-1»:

Квітки цмину піщаного	8,0-12,0
Кукурудзяні стовпчики з прийомками	12,0-16,0
Трава полину гіркого	5,0-8,0
Трава материнки	8,0-12,0
Трава кропиви дводомної	7,0-13,0
Корені цикорію	23,0-26,0
Трава звіробою	3,0-6,0
Квітки календули	8,0-12,0
Корені кульбаби	8,0-12,0

Близько 1г (точна наважка) одного із зборів поміщають в колбу зі шліфом місткістю 200мл, додають 50мл 50% спирту етилового і зважують з точністю до 0,01. Колбу приєднують до зворотного холодильника, нагрівають на киплячій водяній бані протягом 1 години з моменту кипіння, періодично струшуючи частинки зі стінок. Потім колбу охолоджують, зважують і, при необхідності, доводять до початкової маси 50% спиртом. Витяжку фільтрують крізь паперовий фільтр, відкидаючи перші 20мл фільтрату. 3мл фільтрату поміщають в мірну колбу місткістю 25мл, додають 10мл 50% спирту, 2мл 2% розчину алюмінію хлориду, через 10хв 2мл 5% розчину кислоти оцтової і об'єм розчину доводять 50% спиртом до мітки. Через 30хв вимірюють оптичну густину на спектрофотометрі при довжині хвилі 407нм в кюветах з товщиною шару 10мм. В якості розчину порівняння використовують розчин, який складається з 3мл витяжки, 1 краплі розведеної хлористоводневої кислоти і доведений 50% спиртом до мітки в мірній колбі місткістю 25мл.

Паралельно в тих же умовах вимірюють оптичну густину розчину, який містить 1мл 0,05% розчину фармакопейного стандартного зразку (ФСЗ) рутину, обробленого аналогічного досліджуваному розчину.

Вміст суми флавоноїдів (X) в процентах в перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A * m_0 * 50 * 1 * 25 * 100 * 100}{A_0 * m * 100 * 3 * 25 * 25 * (100 - W)} = \frac{A * m_0 * 10000}{A_0 * m * 6 * (100 - W)}$$

де: А - оптична густина досліджуваного розчину;

A_0 - оптична густина стандартного розчину (рутину);

F - коефіцієнт розведення;

m - маса наважки сировини, г;

m_0 - маса наважки стандартного розчину, г;

W - втрата маси сировини при висушуванні, %.

Примітка

1. Приготування розчину ФСЗ рутину. Біля 0,05г (точна наважка) ФСЗ рутину (ФС 42-2508-87) розчиняють в 85мл 96% спирту в мірній колбі місткістю 100мл при нагріванні на водяній бані, охолоджують, доводять об'єм розчину тим же спиртом до мітки і перемішують.

2. Приготування 2% розчину алюмінію хлориду (ГОСТ 3759-75 «х.ч.» або «ч.д.а») розчиняють в 50мл 50% спирту в мірній колбі місткістю 100мл, доводять об'єм розчину тим же спиртом до мітки і перемішують.

Приклад 4

Кількісне визначення флавоноїдів в настоянці «Урофіт».

Настоянка «Урофіт» містить:

трава хвоща польового;
корінь марени красильної;
квітки ромашки аптечної;
корінь вовчуга польового;
листя берези повислої;
листя ортосифона тичинкового;
плоди кріпа запашного;
спирт етиловий 70%.

В мірну колбу місткістю 25мл поміщають 3мл настоянки, додають 10мл 70% спирту етилового, 2мл 2% розчину алюмінію хлориду, через 10хв 2мл 5% розчину кислоти оцтової і об'єм розчину доводять 70% спиртом до мітки. Через 30хв вимірюють оптичну густина на спектрофотометрі при довжині хвилі 407нм в кюветах з товщиною шару 10мм.

В якості розчину порівняння використовують розчин, який складається з 3мл настоянки, 1 краплі розведеної хлористоводневої кислоти і доведе-

ний 70% спиртом до мітки в мірній колбі місткістю 25мл.

Паралельно в тих же умовах вимірюють оптичну густина розчину, який містить 1мл 0,05% розчину фармакопейного стандартного зразку (ФСЗ) рутину, обробленого аналогічного досліджуваному розчину.

Вміст суми флавоноїдів (X) в процентах в перерахунку на рутин і абсолютно суху сировину обчислюють за формулою:

$$X = \frac{A * m_0 * 50 * 1 * 25 * 100 * 100}{A_0 * m * 100 * 3 * 25 *} = \frac{A * m_0 * 10000}{A_0 * m * 6 *}$$

де: A - оптична густина досліджуваного розчину;

A₀ - оптична густина стандартного розчину (рутину);

F - коефіцієнт розведення;

m - маса наважки сировини, г;

m₀ - маса наважки стандартного розчину, г;

W - втрата маси сировини при висушуванні, %.

Таким чином, спосіб кількісного визначення суми стероїдів і флавоноїдів є уніфікованим, тому що дозволяє проводити визначення діючих речовин у сировину різних видів, екстракційних препаратів і настоек за єдиною методикою, при цьому відмінність в аналізі полягає тільки у величині навішень і ступеня їхнього розведення до фотометрируемого розчину.

Розроблений спосіб може бути використаний у фармацевтичній і медичній промисловості для стандартизації рослинної сировини по змісту діючих речовин (флавоноїдів) і стероїдів, проведення технологічного контролю за виробництвом.