



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **88494** (13) **U**
(51) МПК (2014.01)
G01J 3/30 (2006.01)
G01N 21/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2013 06849	(72) Винахідник(и): Глуценко Алла Володимирівна (UA), Георгіянц Вікторія Акопівна (UA), Бевз Наталья Юрьевна (UA)
(22) Дата подання заявки: 31.05.2013	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.03.2014	(73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, вул. Пушкінська, 53, м. Харків, 61002 (UA)
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.03.2014, Бюл.№ 6	

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У НАДЗЕМНІЙ ЧАСТИНІ ЛАСКАВЦЯ ЗОЛОТИСТОГО

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого шляхом спектрофотометрії водно-спиртового екстракту сировини в ультрафіолетовому спектрі при додаванні алюмінію хлориду та кислоти оцтової та визначенні оптичної густини досліджуваної проби за довжини хвилі 411 нм, у порівнянні зі стандартним розчином рутину, причому як рослинної сировини використовують надземну частину ласкавця золотистого, водно-спиртовий екстракт якого одержують при кип'ятінні на водяній бані зі спиртом етиловим 30 % протягом 60 хвилин при співвідношенні сировина:екстрагент 1:20, розчин алюмінію хлориду 5 % у розчині кислоти оцтової 50 г/л в етанолі додають у двократній кількості. Розчин кислоти оцтової 50 г/л у 96 % етанолі додають у кількості 15 мл.

UA 88494 U

Корисна модель належить до фармації, зокрема до способів хімічного аналізу, а саме до контролю якості рослинної сировини за вмістом флавоноїдів.

Чисельні та різноманітні за своєю структурою природні флавоноїди все більш привертають увагу вчених. Інтерес до цієї групи можна пояснити широким розповсюдженням у природі та великим спектром біологічної дії, серед якого визначаються сечогінна, протівірусна, кардіотонічна, гіпотензивна, капіляророзміцнююча, протипухлинна та інші дії [1,2]. Особливої уваги набуває позитивний вплив флавоноїдів на функцію печії: посилюють її жовчогінну, антитоксичну дію, покращують киснево-відновлюванні процеси [3,4].

Багатий вміст флавоноїдів має рослина - Ласкавець золотистий (*Bupleurum aureum* Fisch.; рос. - володушка золотистая, заячья капуста, боярская сныть) - багаторічна трав'яниста гола сизувата рослина родини селерових (зонтичних).

Препарати ласкавця золотистого активізують виділення жовчі, посилюють секрецію шлункового і панкреатичного соку. У виділеній жовчі збільшується вміст пігментних речовин, кислот і холестерину. У народній медицині рослина користується репутацією ефективного засобу при захворюваннях печінки і жовчного міхура, шлунково-кишкового тракту і підшлункової залози. Основними ж показаннями до призначення є холецистит, ангіохоліт і гепатит. Місцеве застосування ласкавця показано при ураженні шкіри гнояками і при сверблячці. Ласкавець золотистий з давніх часів використовується у народній та традиційній медицині для лікування патології гепатобіліарної системи [5,6].

Аналіз джерел інформації показав, що у надземній частині ласкавця золотистого міститься більш 2 % флавоноїдів, які представлені головним чином рутином, кверцетином, ізокверцетином, ізорамнетином та ізорамнетин-3-рутинозидом, кверцетрином, кемпферолом [7,8]. Оскільки фармакологічна дія лікарської рослинної сировини є комплексною та залежить від усіх біологічно активних речовин, що входять до її складу, тому доцільним є розробка способу ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого.

Серед методів ідентифікації та кількісного визначення флавоноїдів найбільшого значення набув метод диференціальної спектрофотометрії [9-11]. У літературі описані способи спектрофотометричного визначення флавоноїдів у рослинній сировині, які ґрунтуються на реакції флавоноїдів з алюмінієм хлоридом. Основною перевагою цього методу є можливість вибіркового визначення флавоноїдів у складних сумішах поліфенольних сполук без попереднього їх розділення. При цьому відбувається багатохромний зсув першої смуги поглинання флавоноїдів, який дозволяє виключити вплив інших біологічно активних речовин фенольної структури [12,13].

За найближчий аналог вибрано спосіб визначення флавоноїдів у траві рутки лікарської [14]. Відомий спосіб здійснюють наступним чином: висушену надземну частину рутки лікарської подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з діаметром отвору 0,350 мм. 5,0000 (точна наважка) подрібненої сировини вміщують у мірну колбу, додають 50 мл 50 % етанолу та кип'ятять на водяній бані протягом 30 хвилин. Отриманий розчин охолоджують, фільтрують. 1 мл отриманого екстракту вміщують у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 20 мл 50 % етанолу та 4 мл 3 % розчину алюмінію хлориду. Через 10 хвилин додають 2 мл розчину кислоти оцтової 50 г/л та доводять 50 % етанолом до позначки. Через 1 годину вимірюють оптичну густину досліджуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 411 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, приготований наступним чином: аліквоту 1 мл фільтрату вміщують у мірну колбу місткістю 50 мл, додають 20 мл 50 % етанолу та 2 мл кислоти оцтової 50 г/л, доводять 50 % етанолом до позначки. Паралельно вимірюють оптичну густину розчину стандартного зразку рутину, приготованого наступним чином: 0,0400 (точна наважка) рутину вміщують у мірну колбу місткістю 100 мл, додають 20 мл 50% етанолу, перемішують та доводять 50 % етанолом до позначки. Аліквоту 1 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 25 мл, доводять до позначки 50 % етанолом та перемішують. Як розчин порівняння використовують 50 % етанол. УФ-спектр флавоноїдів рутки характеризується наявністю максимуму поглинання за довжини хвилі 411 нм.

Вміст суми флавоноїдів у траві рутки лікарської у перерахунку на рутин розраховують за емпіричною формулою:

$$D_0 - \text{оптична густина розчину стандартної речовини рутину за довжини хвилі 408 нм; } D_1 - \text{оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 411 нм; } m_0 - \text{маса наважки рутину, г; } m_1 - \text{маса наважки трави рутки лікарської для приготування водно-спиртового екстракту, г } V_1 - \text{об'єм мірної колби (100 мл) для приготування розчину рутину, мл; } V_2 - \text{об'єм аліквоти (1 мл)}$$

де: D_0 - оптична густина розчину стандартної речовини рутину за довжини хвилі 408 нм; D_1 - оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 411 нм; m_0 - маса наважки рутину, г; m_1 - маса наважки трави рутки лікарської для приготування водно-спиртового екстракту, г V_1 - об'єм мірної колби (100 мл) для приготування розчину рутину, мл; V_2 - об'єм аліквоти (1 мл)

отриманого розчину рутину, мл; V_3 - об'єм мірної колби (25 мл) для розведення розчину рутину, мл; V_4 - об'єм 50 % етанолу (50 мл) для приготування екстракту з трави рутки лікарської, мл; V_5 - об'єм аліквоти (1 мл) екстракту з трави рутки лікарської для приготування досліджуваного розчину, мл; V_6 - об'єм мірної колби (50 мл) для приготування досліджуваного розчину, мл; d - показник вологості лікарської рослинної сировини трави рутки лікарської, %.

Задача корисної моделі полягає у створенні нового способу визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого, придатного для стандартизації за показником - вмістом флавоноїдів.

Поставлена задача вирішується таким чином, що спосіб кількісного визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого шляхом спектрофотометрії водно-спиртового екстракту сировини в ультрафіолетовому спектрі при додаванні алюмінію хлориду та кислоти оцтової, та визначенні оптичної густини досліджуваної проби за довжини хвилі 411 нм, у порівнянні зі стандартним розчином рутину, у відповідності з корисною моделлю, передбачає, як рослинну сировину використовують надземну частину ласкавця золотистого, водно-спиртовий екстракт якого одержують при кип'ятінні на водяній бані зі спиртом етиловим 30 % протягом 60 хвилин при співвідношенні сировина-екстрагент 1:20, розчин алюмінію хлориду 5 % у розчині кислоти оцтової 50 г/л в етанолі додають у двократній кількості. Розчин кислоти оцтової 50 г/л у 96% етанолі додають у кількості 15 мл.

Ознаки заявленого способу визначені експериментальним шляхом.

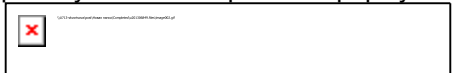
Спиртовий екстракт ласкавця золотистого, одержаний описаним вище методом, є оптимальним для подальшого спектрофотометричного дослідження. Використання даного екстракту у поєднанні з визначеними концентраціями та кількістю розчинів алюмінію хлориду та кислоти оцтової при довжині хвилі 411 нм дають найбільш виражений максимум поглинання, що забезпечує точність визначення, збіжність та відтворюваність результатів.

Заявлений спосіб здійснюють наступним чином: висушену надземну частину ласкавця золотистого подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з діаметром отвору 0,350 мм. 5,0000 (точна наважка) подрібненої сировини вміщують у мірну колбу, додають 100 мл 30 % етанолу та кип'ятять на водяній бані протягом 60 хвилин. Отриманий розчин охолоджують, фільтрують. 1 мл отриманого екстракту вміщують у мірну колбу ємкістю 25 мл, додають 10 мл 96 % спирту етилового, 2 мл 5 % розчину алюмінію хлориду у розчині кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому. Через 10 хвилин доводять об'єм розчином кислоти оцтової 50 г/л у 96 % етанолі до мітки та перемішують. Через 30 хвилин вимірюють оптичну густину досліджуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 411 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

Як розчин порівняння використовують розчин, приготований наступним чином: аліквоту 1 мл фільтрату вміщують у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10 мл 96 % спирту етилового. Через 10 хвилин доводять об'єм розчином кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому до мітки та перемішують.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину стандартного зразка рутину, приготованого наступним чином: 0,0200 (точна наважка) рутину вміщують у мірну колбу місткістю 50 мл, розчиняють у 30 мл 96% етанолу, перемішують та доводять 96 % етанолом до мітки. Аліквоту 1 мл отриманого розчину вміщують у мірну колбу місткістю 25 мл, додають 10 мл 96% спирту етилового, 2 мл 5 % розчину алюмінію хлориду у розчині кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому. Через 10 хвилин доводять об'єм розчином кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому до мітки та перемішують. УФ-спектр флавоноїдів ласкавця характеризується наявністю максимуму поглинання за довжини хвилі 411 нм.

Вміст суми флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого у перерахунку на рутин розраховують за емпіричною формулою:



де: A_0 - оптична густина розчину стандартної речовини рутину за довжини хвилі 411 нм;

A_1 - оптична густина досліджуваного розчину за довжини хвилі 411 нм;

m_0 - маса наважки рутину, г;

m_1 - маса наважки надземної частини ласкавця золотистого для приготування спиртового екстракту, г;

V_1 - об'єм мірної колби (50 мл) для приготування розчину рутину, мл;

V_2 - об'єм аліквоти (1 мл) отриманого розчину рутину, мл;

V_3 - об'єм мірної колби (25 мл) для розведення розчину рутину, мл;

V_4 - об'єм мірної колби (100 мл) для приготування екстракту з надземної частини ласкавця золотистого, мл;

V_5 - об'єм аліквоти (1 мл) екстракту з надземної частини ласкавця золотистого для приготування досліджуваного розчину, мл;

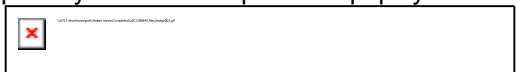
V_6 - об'єм мірної колби (25 мл) для приготування досліджуваного розчину, мл;

d - показник вологості лікарською рослинною сировиною надземної частини ласкавця золотистого, %. Корисна модель ілюструється прикладом. Приклад 1.

У відповідності із заявленим способом висушену надземну частину ласкавця золотистого подрібнили до розміру часток 0,350 мм. 5,0124 г (точна наважка) подрібненої сировини помістили у мірну колбу, додали 100 мл 30% етанолу та кип'ятили на водяній бані протягом 60 хвилин. Отриманий розчин охолодили, відфільтрували. 1 мл отриманого екстракту помістили у мірну колбу ємністю 25 мл, додали 10 мл 96 % спирту етилового, 2 мл 5 % розчину алюмінію хлориду у розчині кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому. Через 10 хвилин довели об'єм розчином кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому до мітки та перемішали. Через 30 хвилин вимірювали оптичну густину досліджуваного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 411 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм. Як компенсаційний розчин використовували розчин, приготований наступним чином: аліквоту 1 мл фільтрату помістили у мірну колбу місткістю 25 мл, додали 10 мл 96 % етанолу. Через 10 хвилин доводили об'єм розчином кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому до мітки та перемішали.

Паралельно вимірювали оптичну густину розчину стандартного зразка рутину, приготованого наступним чином: 0,0214 г (точна наважка) рутину помістили у мірну колбу місткістю 50 мл, розчинили у 30 мл 96 % етанолу, перемішали та довели 96 % етанолом до мітки. Аліквоту 1 мл отриманого розчину помістили у мірну колбу ємністю 25 мл, додали 10 мл 96 % етанолу, 2 мл 5 % розчину алюмінію хлориду у розчині кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому. Через 10 хвилин довели об'єм розчином кислоти оцтової концентрованої 50 г/л у спирті етиловому до мітки та перемішали.

Вміст суми флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого у перерахунку на рутин розраховували за емпіричною формулою:



$$x = 2,14\%$$

Отримані результати відповідають даним, відомим з джерел інформації, і свідчать про достовірність результатів, одержаних заявленим способом.

Таким чином, заявлено спосіб визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого, який дозволяє ідентифікувати та визначити вміст суми флавоноїдів у лікарській рослинній сировині надземної частині ласкавця золотистого та відзначається точністю, доступністю, збіжністю, відтворюваністю в умовах різних лабораторій та є ефективним для використання як в умовах виробництва, так і в умовах аптек при визначенні якості лікарської рослинної сировини.

Джерела інформації

1. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols / L. Wang, Yi-Chen Tu, Tzi-Wei Lian [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. -2006. - Vol. 54, № 26. - P. 9798 - 9804.

2. Flavonoids: Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs / Giulia Di Carlo, Nicola Mascolo, Angelo A. Izzo [et al.] // Life Sciences. - 1999. - V. 65, Issue 4.-P. 337-353.

3. Active oxygens generation by flavonoids / Y.H. Miura, I. Tomita, T.Watanabe [et al.] // Biol. Pharm. Bull. - 1998. - Vol. 21, № 2. - P. 93 - 96.

4. Effects of quercetin on liver damage in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis / A. Pavanato M, J. Tunon, S. Sanchez-Campos [et al.] // Dig. Dis. Sei. 2003. - Vol. 48(4). - P. 824 - 829.

5. Баширова Р.М. Применение растений рода володушка *Vipuleurum* в гепатологии / Р.М. Баширова, А.М. Мингажева, Р.С. Мингазов // Практическая фитотерапия. - 2003. - №3. - С. 4 - 6.

6. Hepatoprotective effects of Taiwan folk medicine: *wedelia chinensis* on three hepatotoxin-induced hepatotoxicity / S.C. Lin, CC. Lin, YH Lin [et al.] //Am. J. Chin. Med. - 1994. -V. 22(2).-P. 155-168.

7. Исследование содержания состава флавоноидов и фенолкарбоновых кислот растений рода *Vipuleurum* L., культивируемых в Белоруси / Н.М. Бирюкова А.М. Островская В.Г. Соколов и др. // Вестник фармации. - 2011. -№4(54). - С. 23-30.

8. Киселева А.В. Географическая изменчивость флавоноидного состава володушки / А.В. Киселева // Растит, ресурсы. - 1980. - Т. 16(4). - С. 553-559.

9. Середа П.І. Фармакогнозія. Лікарська рослинна сировина та фітозасоби / П.І. Середа, Максютіна Н.П., Давтян Л.Л. - Вінниця, вид. «Нова книга», 2006. - 346 с

10. Visible Spectrophotometric Determination of Total Flavonoids in Capparis spinosa L. Buds / Jiang Xiu-Juan, Tang Jin-Cheng, Bay Hong-Jin // Food Science. - 2010. - V. 31(18). - P. 252-254.

11. Determination of total flavonoids in three Sedum crude drugs by UV-Vis spectrophotometry / Yujie Chen, Jing Wang, Dingrong Wan // Pharmacogn. Mag. - 2010 - V. 6(24). - P. 259-263.

5 12. Использование физико-химических методов в анализе лекарственных средств растительного происхождения / О.М. Маркова, В.А. Карпенко, А.С. Саушкина и др. // Вестник ВГУ. Серия химия, биология, фармация. - 2003. - №1. - С. 99-100.

13. Криворучко О.В. Кількісне визначення флавоноїдів і полісахаридів у лікарських засобах з листя смородини чорної / О.В. Криворучко, О.Ю. Ткаченко, В.С. Кисличенко // Фармацевтичний журнал. - 2003. - №4. - С. 76-78.

10 14. Україна Пат. № 62370 UA, МПК G01J 3/30 (2006.01) G01N 21/00 A61K 36/50 (2006.01). / НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ. - З. № и201101354; Заявл. 07.02.2011; Опубл. 25.08.2011. СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ У ТРАВІ РУТКИ ЛІКАРСЬКОЇ.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб кількісного визначення флавоноїдів у надземній частині ласкавця золотистого шляхом спектрофотометрії водно-спиртового екстракту сировини в ультрафіолетовому спектрі при додаванні алюмінію хлориду та кислоти оцтової та визначенні оптичної густини досліджуваної проби за довжини хвилі 411 нм, у порівнянні зі стандартним розчином рутину, який **відрізняється** тим, що як рослинну сировину використовують надземну частину ласкавця золотистого, водно-спиртовий екстракт якого одержують при кип'ятінні на водяній бані зі спиртом етиловим 30 % протягом 60 хвилин при співвідношенні сировина:екстрагент 1:20, розчин алюмінію хлориду 5 % у розчині кислоти оцтової 50 г/л в етанолі додають у двократній кількості. Розчин кислоти оцтової 50 г/л у 96 % етанолі додають у кількості 15 мл.

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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