© Коллектив авторов, 2008

О. В. Вишневский[1], *В. П. Атаманюк*[2]

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В СИРОПАХ ФЛАВОЗИД И ИММУНОФЛАЗИД

[1] Институт фармакологии и токсикологии АМН Украины, Киев, Украина;
[2] НПК "Экофарм", Киев, Украина

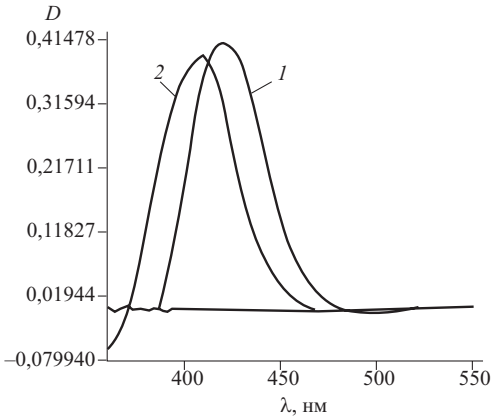
Разработанные рецептуры сиропов Флавозид и Иммунофлазид содержат 2 % Протефлазида — спиртового экстракта диких злаковых — *Deschampsia caespitosa* L. и *Calamagrostis epigeios* L. Суммарное количество флавоноидов в сиропах находится на уровне 4 – 6 мкг/мл, что усложнило разработку методики их анализа. В статье приведена разработанная авторами методика количественного определения суммы флавоноидов в вышеуказанных сиропах с помощью дифференциальной УФ-спектрометрии и использования их комплексов с хлоридом алюминия. Разработанная методика введена в раздел "Количественное определение нормативных документов на соответствующие сиропы.

Основой разработанной рецептуры сиропов Флавозид и Иммунофлазид является действующая субстанция — лекарственный препарат Протефлазид, впервые разработанный и зарегистрированный на Украине в 2001 г., — спиртовой экстракт из диких злаковых *Deschampsia caespitosa* L. и *Calamagrostis epigeios* L. Изготовленный по оригинальной технологии Протефлазид рекомендован для применения в медицинской практике как комплексный препарат прямого противовирусного и иммунокоррегирующего действия со свойствами индуктора интерферона и ингибитора протеаз ДНК в вирусмодифицированных клетках [1 – 3]. Основными биологически активными веществами Протефлазида являются флавоноиды, подобные кверцетину (рутину), основой молекул которых является флавоновый кислородсодержащий гетероцикл. Однако в составе сложной смеси флавоноидов Протефлазида не найдено таких, которые часто используются в качестве стандартных образцов. Поэтому разработка методики количественного определения флавоноидов в сиропе, где содержание Протефлазида и соответственно флавоноидов составляет 2 % (или 4 – 6 мкг/мл) от исходного экстракта, представляет определенный научный интерес.

Целью настоящей работы является разработка методики, которая позволит количественно определять сумму флавоноидов, поглощающих в УФ и видимых областях спектра с использованием в качестве комплексообразующего реагента хлорида алюминия. Для увеличения общего количества флавоноидов в анализируемых пробах гликозидную форму переводили в агликоны посредством предварительного кипячения сиропа в присутствии хлористоводородной кислоты. Кислотный гидролиз глюкозидов в сиропе проводили в избытке концентрированной хлористоводородной кислоты, взятой в количестве 1 % от объема исследуемого сиропа. Оптимальные условия проведения кислотного гидролиза во времени определяли по степени перевода гликозидной составляющей в агликоны при контроле ТСХ и данных УФ-спектрофотометрии. Агликоны из сиропа экстрагировали этилацетатом, растворитель отгоняли в вакууме до получения пастообразного остатка, который растворяли в 96 % спирте этиловом.

Исследования оптимальных условий комплексообразования при работе со свежеприготовленным 5 % раствором хлорида алюминия в 96 % этиловом спирте показало, что увеличение объема указанного раствора более 1 мл в анализируемой пробе не улучшает показатели оптической плотности комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия, а максимальная величина оптической плотности комплекса во времени сохраняется в интервале 25 – 40 мин при длине волны 422 нм. Поскольку исходный экстракт до образования комплекса с хлоридом алюминия также имел определенное оптическое поглощение при длине волн в области 420 – 424 нм, для компенсации этого поглощения применили прием дифференциальной спектрофотомерии и в качестве сравнения использовали раствор со всеми компонентами испытуемого раствора за исключением хлорида алюминия.

С учетом сложного флавоноидного состава исходной субстанции в качестве стандартного образца при количественном определении обсуждалось использование известных образцов стандартов из различных групп флавоноидов, но ни в одном из них максимум поглощения комплекса с хлоридом алюминия не совпадал с аналогичным комплексом флавоноидов Протефлазида в сиропе. Наиболее близкими к ним по положению максимума поглощения являются рутин и кверцетин. Большая доступность и стабильность рутина [4] в растворах определила выбор стандартного образца, максимум поглощения которого в комплексе с хлоридом алюминия определяется в области 410 ± 2 нм. Величину оптической плотности комплексов флавоноидов в сиропе и стандартного образца при



Дифференциальный УФ-спектр раствора суммы флавоноидов сиропа с хлоридом алюминия (*1*) в сравнении с аналогичным раствором стандарта рутина (*2*)

анализе определяли по значению соответствующих максимумов при длине волн 422 ± 2 нм и 410 ± 2 нм (рисунок).

Для определения интервала оптических плотностей, в котором алюминиевые комплексы флавоноидов Протефлазида в сиропе подчиняются закону Ламберта — Бугера — Бера, из одного и того же пастообразного остатка была приготовлена серия разведений и показано, что в области значений оптических плотностей от 0,14 до 0,90 наблюдается линейная зависимость между концентрацией используемого раствора и величиной его поглощения.

Для установления метрологических характеристик предлагаемой методики определение содержания суммы флавоноидов одной и той же серии сиропа было повторено 10 раз. Данные расчета метрологических характеристик представлены в таблице.

Метрологические характеристики методики количественного определения флавоноидов, содержание которых находится на весьма низком уровне (4 – 6 мкг/мл), свидетельствует о достаточно высоком уровне точности предложенного варианта.

С помощью разработанной методики было определено содержание суммы флавоноидов в сиропах Флавозид и Иммунофлазид в 5 сериях сиропов, и на основании полученных данных в раздел “Числовые показатели” аналитической нормативной документации (АНД) внесены соответствующие показатели, а разработанная методика вошла составной частью раздела АНД “Количественное определение” на Флавозид и Иммунофлазид.

Метрологические характеристики методики определения содержания суммы флавоноидов в сиропе

f	$\overline{X}$	S	ΔX	P, %	$t(p, f)$	E (%) отн
9	$6{,}6 \cdot 10^{-3}$	$6 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-4}$	95	2,23	7,3725

Методика количественного определения суммы флавоноидов в сиропах Флавозид и Иммунофлазид.

В коническую колбу вместимостью 500 мл помещают 200 мл сиропа, добавляют 2 мл хлористоводородной кислоты концентрированной и перемешивают. Раствор в колбе выдерживают на водяной бане при температуре 85 – 90 °С, перемешивая 3 – 4 раза в течение 30 мин. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры, переносят в делительную воронку вместимостью 500 мл и добавляют 80 мл этилацетата, предварительно насыщенного водой. Встряхивают воронку на протяжении 3 мин и отстаивают до полного разделения слоев. Нижний водный слой сливают в коническую колбу, а верхний, этилацетатный, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл. Водный слой экстрагируют этилацетатом еще дважды порциями по 50 мл. В колбу с объединенными этилацетатными извлечениями добавляют около 10 г натрия сульфата безводного, перемешивают и оставляют на 2 ч.

Раствор фильтруют под вакуумом в круглодонную колбу вместимостью 200 мл. В колбу с остатками натрия сульфата и извлечения добавляют 15 мл сухого этилацетата, перемешивают, смесь переносят на фильтр и фильтруют в вакууме. Из полученного извлечения отгоняют в вакууме этилацетат на водяной бане при температуре 50 – 60 °С.

Остаток в виде густой жидкости растворяют в 20 мл 96 % спирта и фильтруют через воронку с ватным тампоном в мерную колбу вместимостью 50 мл. Операцию повторяют еще раз, доводят объем раствора 96 % спиртом до метки и перемешивают (раствор А).

20 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют три капли ледяной уксусной кислоты и 1 мл 5 % раствора хлорида алюминия ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) в 96 % спирте, доводят объем раствора 96 % спиртом до метки и перемешивают.

Через 30 мин определяют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре в максимуме поглощения при длине волны 422 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 20 мл раствора (А) и 3 капли ледяной уксусной кислоты в мерной колбе вместимостью 25 мл, доведенный 96 % спиртом до метки. Параллельно в аналогичных условиях определяют оптическую плотность раствора комплекса ГСО рутина с хлоридом алюминия в максимуме поглощения при длине волны 410 ± 2 нм.

Содержание суммы флавоноидов (X) в пересчете на рутин в мг/мл в сиропе вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25}{D_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 200 \cdot 20} = \frac{D \cdot m_0}{D_0 \cdot 4000},$$

где D — оптическая плотность комплекса флавоноидов с хлоридом алюминия; D_0 — оптическая плотность раствора сравнения ГСО рутина с хлоридом алюминия; m_0 — масса ГСО рутина, в мг.

Приготовление раствора комплекса ГСО рутина с хлоридом алюминия. Точную навеску (около 0,02 г) ГСО рутина растворяют в 80 мл 96 % спирта в мерной колбе вместимостью 100 мл при перемешивании и нагревании на водяной бане, охлаждают до температуры

19 – 21 °С, доводят объем раствора 96 % спиртом до метки и перемешивают (раствор Б).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора Б, добавляют 1 мл 5 % раствора хлорида алюминия ($AlCl_3$ $6H_2O$) в 96 % спирте, 3 капли ледяной уксусной кислоты, доводят объем раствора 96 % спиртом до метки и перемешивают.

В качестве раствора сравнения используют раствор, содержащий 2 мл раствора Б, 3 капли ледяной уксусной кислоты, доведенный 96 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл. Измерение поглощения оптической плотности через 30 мин проводят при длине волны 410 ± 2 нм.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Нестерова, Н. С. Дяченко, В. П. Атаманюк и др., *Анали Мечниківського інституту* (Харьків), № 4 – 5, 151 – 152 (2003).
2. А. С. Прилуцький, Д. А. Лесниченко, Э. А. Майлян та ін., *Імунологія та алергологія* (Київ), **2**, 7 – 8 (2004).
3. N. Nesterova, N. Diachenko, V. Atamaniuk, et al., *Antiviral. Res.*, **A 69**, 105 – (2004).
4. *Рутин — стандартный образец*, ТУ 64-4-127-96.

Поступила 11.01.07

QUANTITATIVE DETERMINATION OF THE TOTAL CONTENT OF FLAVONOIDS IN FLAVOZID AND IMMUNOFLAZID SYRUPS

O. V. Vishnevskii[1] and V. P. Atamanyuk[2]

[1] Institute of Pharmacology and Toxicology, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine;
[2] Ecopharm Corporation, Kiev, Ukraine

New syrup compositions Flavozid and Immunoflazid have been developed, which contain 2% of proteflazid (ethanol extract of wild-growing crops *Deschampsia caespitosa* L. and *Calamagrostis epigeios* L. The total content of flavonoids in both syrups is on a level of 4 – 6 μg/ml, which is rather difficult to measure. A new method for the quantitative determination of flavonoids in syrups has been developed on the basis of differential UV spectrophotometry of their complexes with aluminum chloride. The proposed method is introduced in the Manufacturer's Pharmacopoeial Article for the syrups.