

УДК 615.451.16: 615.074: 615.322: 616.65-002

## РОЗРОБКА МЕТОДИК ВИЗНАЧЕННЯ ЯКОСТІ НАСТОЙКИ СКЛАДНОЇ “ПРОСТАТОФІТ”

Л.І.Вишневська

Національний фармацевтичний університет,  
61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53. E-mail: lilya-vishn@rambler.ru

*Ключові слова: рослинні препарати; простатит; алкалоїди; кумарин; ефірна олія; поліфенольні сполуки; настойка складна*

**На підставі наукових досліджень розроблено методики якісного (алкалоїди, кумарини, поліфенольні сполуки) та кількісного визначення похідних кумарину у перерахунку на кумарин і ефірної олії у настійці “Простатофіт” спектрофотометричним методом та методом тонкошарової хроматографії, що дозволяє контролювати її якість.**

### **METHODS DEVELOPMENT OF QUALITY DETERMINATION OF “PROSTATOPHYTE” COMPOUND TINCTURE**

**L.I.Vishnevskaya**

**On the ground of scientific research we have developed the methods of qualitative (alkaloids, coumarines, polyphenol compounds) and quantitative determination of coumarin derivatives converting to coumarin and volatile oil in “Prostatophyte” tincture by spectrophotometric method and thin-layer chromatography method, allowing to control its quality.**

### **РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАЧЕСТВА НАСТОЙКИ СЛОЖНОЙ “ПРОСТАТОФИТ”**

**Л.И.Вишневская**

**На основе научных исследований разработаны методики качественного (алкалоиды, кумарини, полифенольные соединения) и количественного определения производных кумарина в пересчете на кумарин и эфирного масла в настоеке “Простатофит” спектрофотометрическим методом, а также методом тонкослойной хроматографии, что позволяет контролировать ее качество.**

Ми розробили настійку складну “Простатофіт” — лікарський засіб рослинного походження, призначений для лікування захворювань передміхурової залози, зокрема хронічних простатитів та доброякісної гіперплазії передміхурової залози початкової стадії, який може бути використаний у комплексній терапії неспецифічних запальних захворювань сечовивідних шляхів. До складу настійки входить сировина: кропиви (дані численних клінічних спостережень свідчать про позитивний ефект лікування екстрактом кореня кропиви початкових стадій гіперплазії простати — у високих концентраціях його екстракт інгібує 5-альфаредуктазу і ароматазу, знижуючи тим самим концентрацію дигідротестостерону у простаті [2, 3, 9]), айру (настій рекомендують як сечогінний, протизапальний, дезінфікуючий засіб [2, 3, 5]), ромашки (екстракт володіє гемостатичними, седативними, болетамувальними, протисудомними, потогінними та антисептичними властивостями [3, 5, 9]), буркуну (має протисудомну, деяку наркотичну, пом’якшуючу, болетамувальну дію [2, 9, 11]), чистотілу (його препарати володіють протизапальною, протизудною, антимікробною, ранозагоюючою, анагетичною, протигістамінною, сечогінною, жовчогінною та протисудомною дією

[3, 9]. Вони знижують чи попереджують розвиток деяких грибкових захворювань, проявляють антивірусну активність), собачої кропиви (виявляє виражену дію на серцево-судинну систему; чинить кровоспинну, сечогінну, протисудомну дію; регулює функціональну діяльність шлунково-кишкового тракту. Позитивно впливає на перебіг доклімактеричного і клімактеричного періодів у чоловіків та жінок [2, 11]), берези (володіє протизапальною, сечогінною, спазмолітичною, жовчогінною, потогінною, репаративною, дезінфікуючою дією, позитивно впливає на обмін речовин, діє як кровоочисний і кровотворний засіб [2, 3, 5]), софори японської (препарати володіють бактерицидними властивостями у відношенні золотистого стафілокока та кишкової палички, виявляють судинорозширюючу, кровоспинну, седативну, болетамувальну дію [2-6, 9, 10, 11]), шавлії (препарати виявляють протизапальну, капілярозміцнюючу, кровоспинну, антимікробну та спазмолітичну активність).

Компоненти настійки містять алкалоїди, кумарини, ефірні олії, фенолкарбонові кислоти, вітаміни, флавоноїди, органічні кислоти та інші сполуки (рис. 1). З огляду на хімічний склад рослин, які застосовуються у даному засобі і мо-

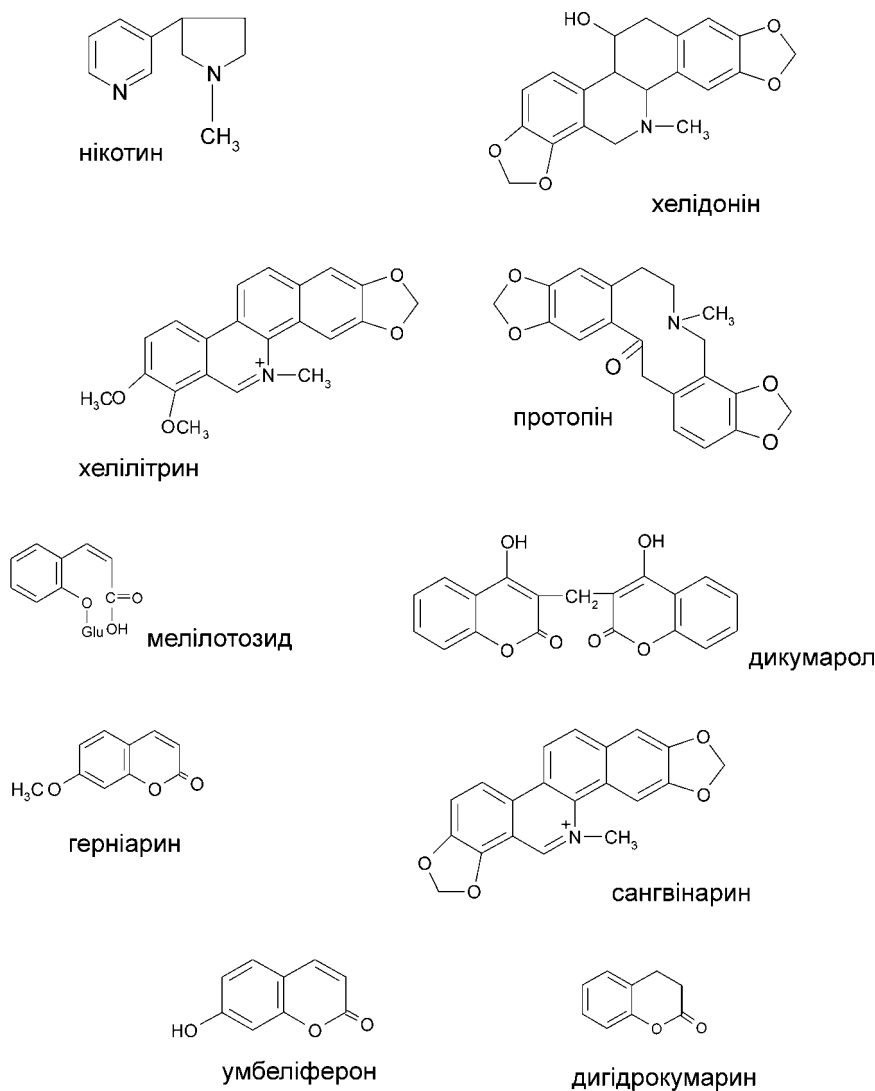


Рис. 1. Біологічно активні речовини настойки складної "Простатофіт".

жуть впливати на фармакологічну дію препарату (за попередніми клінічними дослідженнями впливають на обмін речовин у передміхуровій залозі та корегують уродинаміку), для стандартизації були обрані наступні групи сполук:

- ідентифікація — кумарини, алкалоїди та поліфенольні сполуки;
- кількісне визначення — сума похідних кумарину у перерахунку на кумарин та ефірна олія [4, 6-8, 10].

Метою нашого дослідження стала розробка методик ідентифікації (алкалоїди, кумарини, поліфенольні сполуки) та кількісного визначення суми похідних кумарину у перерахунку на кумарин і ефірної олії у складній настійці методом диференційної спектрофотометрії з використанням алюмінію хлориду як комплексоутворювача.

Ми використовували лабораторні зразки настійки складної "Простатофіт", отриманої методом перколяції. У ході розробки методики визначали спектральні характеристики та умови, час утворення комплексу і його стійкість.

Для ідентифікації алкалоїдів використовують ряд специфічних реактивів. До загальних алка-

лоїдних реактивів належать: реактив Бушарда або Вагнера  $KI_3$ , реактив Майєра  $K_2HgI_4$ , реактив Марме  $K_2CdI_4$ , реактив Драгендорфа  $KVI_4$ , реактив Зонненштейна або де Вріза  $H_3PO_4 \cdot 12MoO_3 \cdot 2H_2O$ , реактив Шейблера  $H_3PO_4 \cdot 12WO_3 \cdot 2H_2O$ , реактив Годфруа або Бертрана  $12WO_3 \cdot SiO_2 \cdot 4H_2O$ , танін, пікринова кислота, сулема та ін. Проте не всі алкалоїди і не в однаковій мірі осаджуються зазначеними реактивами, тому при дослідженні препаратів на наявність алкалоїдів треба провести 5-6 реакцій. Нами проведено дослідження зразків з цілим рядом кольорових осадкових та спеціальних загальних алкалоїдних реактивів. Результати досліджень наведені у табл. 1.

Як видно з даних табл. 1, усі реактиви можуть служити для ідентифікації алкалоїдів у настійці, оскільки дають специфічні осадки чи забарвлення. Але для розробки АНД ми вибрали реактив калію йодовісмутат розчин Р, який увійшов до ДФУ як реакція на алкалоїди [1].

Для визначення наявності класу поліфенольних сполук ми використовували загальну якісну реакцію на поліфеноли із розчином заліза (III) хло-

Таблиця 1

Результати взаємодії алкалоїдів у настойці "Простатофіт" з загальноалкалоїдними реактивами

Назва реактиву	Забарвлення зразків настойки "Простатофіт"
Калію йодовісмутат розчин Р	Яскраво-жовте
Пікринова кислота	Світло-коричнєве
Розчин таніну	Осад, розчин жовто-зеленого кольору
Амонію ванадат у концентрованій сірчаній кислоті	Осад, розчин помаранчевого кольору
Розчин калію йодиду йодований	Жовтий
Реактив Фреде	Осад, розчин зеленого кольору
Розчин ваніліну у концентрованій сірчаній кислоті	Коричнєве
Молібдено-ванадієвий реактив	Жовтувате
Розчин формальдегіду у концентрованій сірчаній кислоті	Осад, розчин червоно-коричневого кольору

риду Р, у результаті якої має з'явитися зеленкувато-буре забарвлення. Для максимального візуального ефекту реакцію проводили на папері.

Ідентифікацію кумаринів проводили методом тонкошарової хроматографії. На стадії пробопідготовки проводили екстракцію ефіром. На етапі розробки методики як маркери також використо-

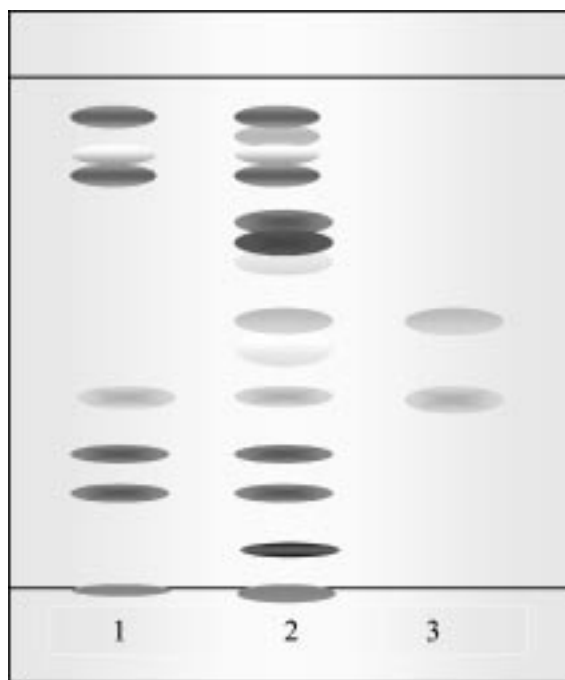


Рис. 2. Схема тонкошарової хроматограми, одержаної при ідентифікації кумаринів у настойці "Простатофіт", після обробки хроматограми спиртовим розчином калію гідроксиду в УФ-світлі за довжини хвилі 365 нм. Система розчинників: бензол Р - етилацетат Р (3:2).

1 - витяжка з коренів кропиви;  
2 - розчин препарату;  
3 - розчин скополетину (зона розташована нижче), умбеліферону.

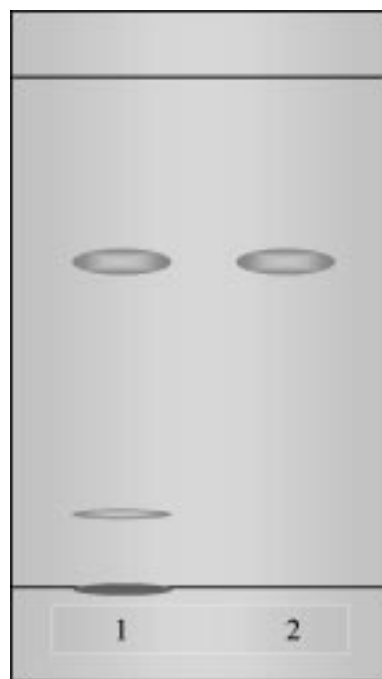


Рис. 3. Схема тонкошарової хроматограми, одержаної при ідентифікації ситостерину у коренях кропиви, після обробки хроматограми сірчанокислим розчином ваніліну. Система розчинників: бензол Р - етилацетат Р (3:2).

1 - витяжка з коренів кропиви;

2 - розчин холестерину.

ували стандартні зразки скополетину і умбеліферону. У подальшому використання фармакопейних стандартних зразків на виробництві може бути замінено речовинами-свідками. Як відомо, скополетин міститься в коренях кропиви і використовується як речовина-свідок для їх ідентифікації. Тому нами було здійснено спробу використати як речовину-свідок витяжку з коренів кропиви. Схема хроматограми, одержаної при ідентифікації скополетину у коренях кропиви та ситостерину, зона якого розташовується на рівні зони холестерину, наведена на рис. 2. Однак на хроматограмі препарату ця зона виявляється дуже слабо, збільшення кількості розчину препарату, який наноситься на тонкий шар, не дає чіткого розподілу зон, тому в АНД на препарат вимоги до наявності ситостерину не включені.

Схема хроматограми препарату у порівнянні з речовиною-свідком та стандартним зразком наведена на рис. 2.

Відвідно до даних літератури найбільший вплив на заявлену фармакологічну дію можуть чинити ефірні олії та кумарини. Тому кількісний вміст саме цих речовин ми вирішили включити до АНД.

Диференційний спектр поглинання суми похідних кумаринів настойки "Простатофіт" і рутину з алюмінію хлоридом наведений на рис. 3.

#### Експериментальна частина

Усі реактиви, які використовувались у даній роботі, відповідають вимогам Державної фармакопеї України [1].

**Ідентифікація алкалоїдів.** Препарат (25 мл) поміщали до круглодонної колби місткістю 100 мл і упарювали на киплячій водяній бані під вакуумом до злегка вологого залишку. Вміст колби охолоджували до кімнатної температури, додавали 15 мл оцтової кислоти розведеної Р, приєднували зворотний холодильник і нагрівали на водяній бані протягом 30 хв. Охолоджували до кімнатної температури і відстоювали при температурі 10-12°C протягом 30 хв. Фільтрували крізь лійку зі складчастим фільтром у ділильну лійку місткістю 100 мл, додавали близько 10 мл аміаку розчину концентрованого Р до рН 10 (рН контролювали за допомогою універсального індикатора паперу). Додавали 20 мл хлороформу Р, струшували протягом 1 хв, давали відстоятися до повного розподілу шарів і хлороформну витяжку фільтрували до круглодонної колби місткістю 100 мл крізь лійку зі складчастим фільтром з 20 г натрію сульфату безводного Р. Процедури екстрагування та фільтрування повторювали ще двічі порціями по 15 мл хлороформу Р. Об'єднані хлороформні витяжки упарювали на киплячій водяній бані під вакуумом до злегка вологого залишку, додавали 1 мл ацетону Р і перемішували (розчин А).

**Ідентифікація кумаринів.** На фільтрувальний папір наносили в одну точку 0,02 мл випробовуваного розчину А, обприскували калію йодовісмутату розчином Р, пікриновою кислотою, розчином таніну, амонію ванадатом у концентрованій сірчаній кислоті, розчином калію йодиду йодованого, реактивом Фреде, розчином ваніліну у концентрованій сірчаній кислоті, молібдено-ванадієвим реактивом, розчином формальдегіду у концентрованій сірчаній кислоті, концентрованою сірчаною кислотою та концентрованою азотною кислотою.

**Поліфенольні сполуки.** На фільтрувальний папір наносили в одну точку 0,05 мл препарату, сушили на повітрі протягом 3 хв, обприскували заліза (III) хлориду розчином Р3; повинно з'явитися зеленкувато-буре забарвлення.

Розчин препарату хроматографували у системі розчинників: бензол Р — етилацетат Р (3:2). Для детектування використовували розчин калію гідроксиду спиртовий Р1 і УФ-світло за довжини хвилі 365 нм. На хроматограмі досліджуваного розчину Б мають виявлятися не менше двох флуоресціюючих зон блакитного кольору, одна з яких розташована на рівні зони на хроматограмі розчину порівняння кропиви (похідні  $\alpha$ -пірону, кумарини).

**Примітки.** 1. Приготування розчину порівняння буркуну: 1,0 г трави буркуну (АНД 64-22716897-006-03), здрібненої до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 0,2 мм, поміщали до круглодонної колби місткістю 50 мл, додавали 10 мл 70% спирту Р і нагрівали зі зворотним холодильником на водяній бані при температурі (70±5)°С протягом 15 хв. Вміст колби охолоджували і фільтрували крізь паперовий фільтр.

Термін придатності розчину — 7 діб при зберіганні у захищеному від світла місці.

2. Приготування розчину порівняння кропиви: 1,0 г коренів кропиви (АНД 64-22716897-019-05), здрібнених до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 0,2 мм, поміщали до круглодонної колби місткістю 50 мл, додавали 10 мл 70% спирту Р і нагрівали зі зворотним холодильником на водяній бані при температурі (70±5)°С протягом 15 хв. Вміст колби охолоджували і фільтрували крізь паперовий фільтр.

Термін придатності розчину 7 — діб при зберіганні в захищеному від світла місці.

**Кількісне визначення. Похідні кумарину.** Препарат (10 мл) поміщали до колби місткістю 50 мл і випарювали на киплячій водяній бані під вакуумом до об'єму близько 2 мл. Вміст колби охолоджували до кімнатної температури і кількісно переносили за допомогою 10 мл води Р, потім 15 мл хлороформу Р — до ділильної лійки місткістю 50 мл. Вміст ділильної лійки струшували протягом 1 хв і давали відстоюватися до повного розділу шарів. Хлороформну витяжку збирали до круглодонної форми місткістю 100 мл. Екстракцію хлороформом Р повторювали ще двічі порціями по 15 мл. Хлороформні витяжки об'єднували, упарювали до злегка вологого залишку і кількісно переносили до мірної колби місткістю 50 мл за допомогою 25 мл 96% спирту Р, доводили об'єм розчину тим самим розчинником до позначки і перемішували (розчин А). Розчин А (1 мл) поміщали до мірної колби місткістю 25 мл, доводили об'єм розчину 96% спиртом Р до позначки і перемішували.

Вимірювали світлопоглинання одержаного розчину на спектрофотометрі за довжини хвилі 272 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм, використовуючи як розчин порівняння 96% спирт Р.

Вміст суми похідних кумарину ( $X_1$ ) у препараті (у відсотках) в перерахунку на кумарин обчислювали за формулою:

$$X_1 = \frac{A \times 50 \times 25 \times 100}{734 \times 100 \times 10} = A \times 0,1703,$$

де: А — світлопоглинання досліджуваного розчину; 734 — питомий показник поглинання кумарину за довжини хвилі 272 нм; 10 — об'єм препарату, мл.

Вміст суми похідних кумарину у препараті в перерахунку на кумарин повинен бути не меншим за 0,035%.

Метрологічна характеристика методики наведена у табл. 2.

**Ефірна олія.** Препарат (50 мл) поміщали до круглодонної колби місткістю 500 мл, додавали 150 мл води очищеної Р і перемішували. Вміст колби переганяли до об'єму близько 50 мл до ділильної лійки місткістю 350 мл, додавали 20 мл хлороформу Р та екстрагували протягом 3 хв. Хлороформний (нижній) шар фільтрували до попередньо

Таблиця 2

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення кумарину у "Простатофіт"

X, %	f	X, %	S <sup>2</sup>	S	P, %	t (P, f)	ΔX	ε, %
0,0832	4	0,0835	3,12·10 <sup>-7</sup>	0,000559	95	2,78	0,0015	1,86
0,0839								
0,0827								
0,0841								
0,0835								

Таблиця 3

Метрологічні характеристики методики кількісного визначення ефірної олії у "Простатофіт"

X, %	f	X, %	S <sup>2</sup>	S	P, %	t (P, f)	ΔX	ε, %
0,132	4	0,130	3,3·10 <sup>-6</sup>	0,001817	95	2,78	0,005	3,87
0,129								
0,130								
0,129								
0,133								

доведеної до постійної маси круглодонної колби зі шліфом місткістю 100 мл крізь лійку зі складчастим фільтром з 10,0 г натрію сульфату безводного Р. Витягнення хлороформом повторювали ще двічі порціями по 20 мл, витяжки об'єднували. Хлороформ відганяли на водяній бані при температурі (65±5)°С під вакуумом при залишковому тиску 12-16 кПа. Колбу із залишком поміщали до ексикатора з фосфору (V) оксидом Р, витримували під вакуумом при залишковому тиску 12-16 кПа протягом 2 год і зважували.

Вміст ефірної олії (X<sub>2</sub>) у препараті (у відсотках) обчислювали за формулою:

$$X_2 = \frac{(m_2 - m_1) \times 100}{50},$$

де: m<sub>1</sub> — маса порожньої колби, г;  
m<sub>2</sub> — маса колби із залишком, г;

50 — об'єм препарату, мл.

Вміст ефірної олії у препараті повинен бути не меншим за 0,08%.

Метрологічна характеристика методики наведена у табл. 3.

#### Висновки

1. Розроблена методика якісного визначення вмісту алкалоїдів, поліфенольних сполук та суми похідних кумарину у настійці "Простатофіт".

2. Розроблена методика кількісного визначення спектрофотометричним методом вмісту суми похідних кумарину в перерахунку на кумарин у настійці "Простатофіт". Відносна помилка досліду складає 1,86%.

3. Розроблена методика кількісного визначення ефірної олії у настійці складній. Відносна помилка досліду складає 3,87%.

#### Література

1. Державна фармакопея України / Державне підприємство "Науково-експертний фармакопейний центр". — 1-е вид. — X: PIPEP, 2001. — 556 с.
2. Кьосев Л.А. Полный справочник лекарственных растений. — М.: "Эксмо", 2002. — С. 354-356
3. Преображенський В. Сучасна енциклопедія лікарських рослин. — Донецьк: ТОВ ВКФ "БАО", 2005. — 544 с.
4. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В. и др. Спутник хроматографиста. — Воронеж, 2004. — 527 с.
5. Руженкова И.В. Основы фитотерапии. — Ростов-на-Дону: "Феникс", 2005. — 188 с.
6. Сур С.В., Тулюпа Ф.М., Толок А.Я., Пересыпкина Т.Н. // Фармац. журн. — 2000. — №1. — С. 69-71.
7. British Pharmacopoeia. — Vol. 1. — London: HMSO, 2005. — 1389 p.
8. European Pharmacopoeia. — 4<sup>th</sup> ed. — Strasbourg: Council of Europe, 2002.
9. Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. Ibid. — Geneva, 1996. — An. 11.
10. Poole C.F., Poole S.R. Chromatography today. — Ed. 5. — Amsterdam, the Netherlands: Elsevier, 1991. — 1026 p.
11. Schmidtke S. Die Hamorroiden // Pharmaz. Rundschau. — 1997. — Vol. 2. — P. 28-30.

Надійшла до редакції 11.10.2007 р.