



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38597 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 35/66
G01N 21/77

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ

1

2

(21) u200809417

(22) 18.07.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) БЕЛТЬЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, UA,
БИЧКОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА, UA

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, UA

(57) Спосіб кількісного визначення кверцетину, що включає відбір проби, розчинення в органічному розчиннику, взаємодію виділеного кверцетину з хімічним реагентом і вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що кверцетин з проби відокремлюють етанолом і піддають взаємодії з хлоридом ітрію (III) у присутності уротропіну при pH=4-5.

Корисна модель відноситься до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення біологічно активної речовини поліфенольного типу - кверцетину в лікарських рослинах й фармацевтичних препаратах.

Відомий спосіб кількісного визначення кверцетину у фармпрепаратах [див. Зіятдінова Г.К., Будніков Г.К. Визначення флавонолів у фармпрепаратах методом вольтамперометрії. Хіміко-фармацевтичний журнал, 2005, т.39, №10, С.54-56], заснований на реєстрації висоти хвилі окислювання кверцетину на платиновому електроді на фоні 0,1М Н₂SO₄. Однак даний спосіб характеризується недостатньо високою чутливістю визначення. Межа виявлення становить у цьому випадку 3,6·10⁻⁵М.

Найбільш близьким є спосіб визначення флавоноїдів, у тому числі кверцетину в рослинній сировині методом високоефективної рідинної хроматографії [L.-H. Wang and W.-H. Li. General method for determination flavonoids in medical plants and raw cosmetic using HPLS with a photodiode array detector. Хіміко-фармацевтичний журнал, 2007, т.41, №4, С.46-51].

Визначення кверцетину проводили таким способом. З наважки аналізованої речовини екстрагували флавоноїди метанолом з додаванням води. Розчин нагрівали протягом 30хв. при 70°C на водяній бані. Екстракт центрифугували протягом 30хв. Флавоноїди екстрагували з розчину 15-ю мл гексану або ефіру, етилацетату, хлороформу й суміші дихлорметан-хлороформ (при співвідно-

шенні компонентів 20:80), потім екстракт випарувували й висушували в струмі азоту. Екстракцію проводили тричі. До сухого залишку додавали 1мл метанолу й перемішували на мішалці протягом 5хв. Отриманий розчин відфільтрували на мембранних фільтрах. Потім методом звернено-фазової рідинної хроматографії з використанням рухливої фази (метанол і фосфорна кислота) і колонки Phenomenex C₁₈ проводили виділення кверцетина протягом однієї години. За допомогою фотодіодного детектора проводили реєстрацію піка кверцетина на хроматограмі при λ=300нм. Загальний час проведення аналізу становить 3,5 години. Межа виявлення кверцетину становить 6·10⁻⁸М.

Це рішення обране прототипом. Загальне між прототипом і корисною моделлю, що заявляється, є:

1. відбір проби;
2. розчинення в органічному розчиннику;
3. взаємодія проби з реагентом;
4. реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб, пропонований по прототипу, вимагає попередньої пробопідготовки, що передбачає виділення флавоноїдів шляхом розчинення їх в органічних розчинниках (метанол, гексан, ефір, етилацетат, хлороформ, дихлорметан), багато з яких є токсичними, а також нагрівання метанольних розчинів зразків при 70°C. Все це ускладнює підготовку проби до аналізу. Крім того, крім високоефективного рідинного хроматографа, що дозволяє виділити кверцетин із суми флавоноїдів,

UA (19) 38597 (13) U

для реєстрації аналітичного сигналу застосовується дорогий фотодіодний матричний детектор, що значно ускладнює виконання аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення кверцетину, в якому за рахунок використання спектроскопічних властивостей кверцетину забезпечити спрощене проведення аналізу та скоротити час його проведення.

Поставлене завдання вирішене в способі визначення кверцетину, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику, взаємодію кверцетину з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу тим, що кверцетин виділяють з проби в етанол і піддають взаємодії з хлоридом ітрію в присутності уротропіну при рН=4-5.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляється, і досягненням технічного результату полягає в наступному.

Спрощення й скорочення часу виконання аналізу стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Виділенню кверцетину з рослинної сировини в етанол і подальшому використанню етанольного розчину. Застосування такого прийому дозволило виключити багатостадійну пробопідготовку з використанням різних токсичних органічних розчинників.

2. Використанню як посилюючий розчин хлориду ітрію (III), що утворює комплексну сполуку із кверцетином і збільшуючого інтенсивність власної люмінесценції кверцетину.

Етанольний розчин кверцетину при опроміненні Уф-світлом ртутної лампи з $\lambda_{\text{макс}}=365\text{нм}$ проявляє люмінесцентні властивості ($\lambda_{\text{визл}}=500\text{нм}$), але інтенсивність його люмінесценції невелика. При комплексуванні з іонами ітрію (III) інтенсивність люмінесценції кверцетину зростає в 90 разів за рахунок того, що зростає твердість молекули й зменшуються внутрішньомолекулярні втрати енергії порушення.

Режими проведення аналізу обрані експериментально.

Інтенсивність люмінесценції кверцетину залежить від рН розчину. Найбільша інтенсивність люмінесценції виявляється при значеннях рН=4-5 (Фіг.1). Як буфер використовували розчин уротропіну 0,4%-ний.

Інтенсивність люмінесценції кверцетину залежить від розчинника, який використовували (Табл.1). Як видно з таблиці найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається в етанолі, ацетонітрилі й пропанолі. Для подальшої роботи нами обрані етанол, як найпоширеніший і нетоксичний розчинник.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції кверцетину від кількості ітрію (III) у розчині показало, що найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається в широкому інтервалі концентрацій $(0,1-1)\cdot 10^{-3}$ моль/л (Фіг.2). Нами обрана концентрація ітрію (III) – $1\cdot 10^{-3}$ моль/л.

Визначення кверцетину проводили у фармацевтичних препаратах «Кверцетин», «Дарсил», «Гінкго білоба», у лікарських рослинах і в настойках лікарських рослин.

Приклад 1. Визначення кверцетину у фармацевтичному препараті «Кверцетин».

Гранули препарату «Кверцетин» попередньо розтирають у ступці до порошокподібного стану. Наважку 0,5г препарату переносять у колбу, додають 50мл етанолу, перемішують на магнітній мішалці протягом 30хв., потім фільтрують і доводять об'єм до 50мл.

У три пробірки поміщають по 0,5мл аналізованого розчину, у дві з них додають по 0,25мл стандартного розчину кверцетину з вмістом $1,5\cdot 10^{-5}$ г/мл, потім у всі три пробірки додають по 0,5мл розчину хлориду ітрію (III) з вмістом $1\cdot 10^{-3}$ моль/л й по 0,2мл уротропіну 0,4%-ного. Розчини доводять до 3мл етанолом, перемішують і реєструють інтенсивність люмінесценції при $\lambda_{\text{збудж.}}=500\text{нм}$. Люмінесценцію збуджували світлом ртутної лампи з $\lambda_{\text{збудж.}}=365\text{нм}$.

Аналогічно готують пробі з другою добавкою з вмістом вдвічі більшою за першу.

Зміст кверцетину в пробі розраховують по методу добавок по формулі:

$$C_x = C_{\text{доб.1}} \cdot I_x / I_{x+\text{доб.}} - I_x, \text{ де}$$

C_x - вміст кверцетину в пробі,

$C_{\text{доб.}}$ - концентрація добавки,

I_x - інтенсивність люмінесценції проби без добавки,

$I_{x+\text{доб.}}$ - інтенсивність люмінесценції проби з добавкою.

У препараті «Кверцетин» знайдено $0,038\pm 0,0015$ г на 1г препарату. Результати визначення кверцетину перевірені методом «введення-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.2).

Приклад 2. Визначення кверцетину в лікарських рослинах (у шишках хмелю).

Наважку 1г здрібнених на млині шишок хмелю переносять у колбу, додають 50мл 50%-ного етанолу (етанол:вода 1:1) і перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хвилин при 70°C. Отриманий екстракт фільтрують на фільтрі «синя стрічка» у мірну колбу. Доводять об'єм екстракту до 50мл 50%-ним етанолом. Якщо інтенсивність люмінесценції отриманого екстракту велика, то розчин необхідно розбавити так, щоб не спостерігалось гасіння люмінесценції.

Далі визначення проводять таким чином, як і в прикладі 1. У три пробірки поміщають по 0,5мл аналізованого розчину, у дві з них додають по 0,25мл стандартного розчину кверцетину з вмістом $1,5\cdot 10^{-5}$ г/мл, потім у всі три пробірки додають по 0,5мл розчину хлориду ітрію (III) з вмістом $1\cdot 10^{-3}$ моль/л и по 0,2мл уротропіну 0,4%-ного. Розчини доводять до 3мл етанолом, перемішують і реєструють інтенсивність люмінесценції. Аналогічно готують пробі з другою добавкою з вмістом вдвічі більшою за першу.

Вміст кверцетину розраховують по методу добавок (див. приклад 1).

У шишках хмелю знайдено 1мг кверцетину на 1г сухого продукту. Результати визначення кверцетину перевірені методом «введення-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.3).

Таблиця 1

Вплив розчинників на інтенсивність люмінесценції комплексу

Розчинник							
І люм., %	Етанол	Ацето- нітрил	Метанол	Пропанол	Ацетон	ДМСО	ДМФО
	100	94	74	92	70	41	4

Таблиця 2

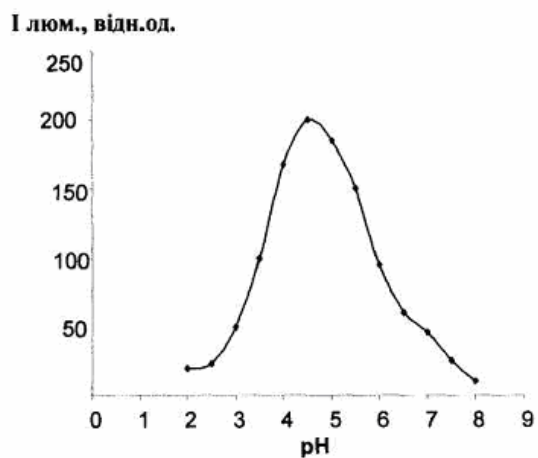
Результати визначення кверцетину в препараті «Кверцетин» методом «введене-знайдено»

Добавка мг	Знайдено в пробі з добавкою, мг	Знайдено в пробі, мг	Sr
0,010	0,051	0,041±0,0027	0,051
0,020	0,059	0,039±0,0017	0,048

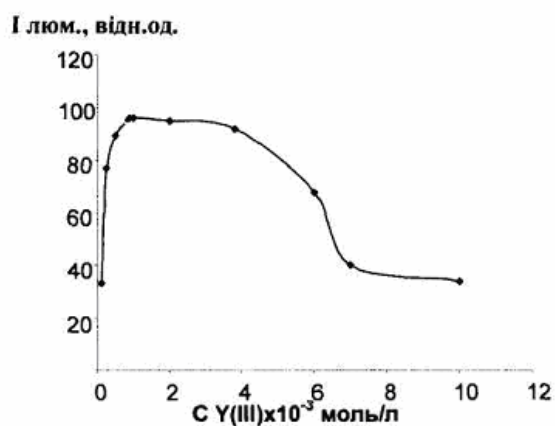
Таблиця 3

Результати визначення кверцетину в шишках хмелю методом «введене-знайдено»

Добавка, мг/мл	Знайдено в пробі з добавкою, мг/мл	Знайдено в пробі, мг/мл	Sr
0,010	0,048	0,038±0,0024	0,041
0,020	0,060	0,040±0,0018	0,039



Фіг.1



Фіг.2