



УКРАЇНА

(19) UA (11) 38595 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 36/00
G01N 21/75

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ

1

(21) u200809428

(22) 18.07.2008

(24) 12.01.2009

(46) 12.01.2009, Бюл.№ 1, 2009 р.

(72) БЕЛІТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, UA,
БІЧКОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА, UA

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

2

(57) Спосіб тест-визначення кверцетину, що вклю-
чає відбір проби, взаємодію кверцетину з хімічним
реагентом і вимірювання аналітичного сигналу,
який **відрізняється** тим, що кверцетин піддають
взаємодії з іонами ітрію (III), модифікованими на
поверхні фосфату алюмінію у присутності уротро-
піну при pH=4-5.

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

Відомий спосіб кількісного визначення кверце-
тину 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 0,1M H₂SO₄. Однак даний спосіб
характеризується недостатньо високою чутливістю
визначення. Межа виявлення становить у цьому
випадку 3,6·10⁻⁵M.

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

Визначення кверцетину проводили таким спо-
собом. З наважки аналізованої речовини екстрагу-
вали флавоноїди метанолом з додаванням води.
Розчин нагрівали протягом 30хв. при 70°C на во-
дяній 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 випаро-
ували й висушували в струмі азоту. Екстракцію
проводили тричі. До сухого залишку додавали 1
мл метанолу й перемішували на мішалці протягом

5хв. Отриманий розчин відфільтровували на мем-
бранних фільтрах. Потім методом звернено-
фазової рідинної хроматографії з використанням
рухливої фази (метанол і фосфорна кислота) і
колонки Phenomenex C₁₈ проводили виділення
кверцетину протягом однієї години. За допомогою
фотодіодного детектора проводили реєстрацію
піка кверцетину на хроматограмі при λ=300nm.
Загальний час проведення аналізу становить 3,5
години. Межа виявлення кверцетину становить
6·10⁻⁸M.

Це рішення обране найближчим аналогом. За-
гальне між найближчим аналогом і корисною мо-
деллю, що заявляється, є:

1. відбір проби;
2. взаємодія проби з реагентом;
3. реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб, пропонується по прототипі, ви-
магає попередньої пробопідготовки, що передба-
чає виділення флавоноїдів шляхом розчинення їх
в органічних розчинниках (метанол, гексан, ефір,
етилацетат, хлороформ, дихлорметан), багато з
яких є токсичними, а також нагрівання метаноль-
них розчинів зразків при 70°C. Все це ускладнює
підготовку проби до аналізу. Крім того, крім висо-
коефективного рідинного хроматографа, що до-
зволяє виділити кверцетин із суми флавоноїдів,
для реєстрації аналітичного сигналу застосовуєть-
ся 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 власти-
востей кверцетину забезпечити спрощене прове-
дення аналізу та скоротити час його проведення.

(13) U

(11) 38595

(19) UA

Поставлена задача вирішена в способі визначення кверцетину, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику, взаємодію кверцетину з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу, згідно корисної моделі, кверцетин піддають взаємодії з іонами іттрію (III), модифікованими на поверхні фосфату алюмінію, у присутності уротропіну при $pH=4-5$.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, 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 використанні етанольного розчину. Застосування такого прийому дозволило виключити багатостадійну пробопідготовку з використанням різних токсичних органічних розчинників.

2. Використанню в якості посилюючого реагенту іонів іттрію (III), адсорбованих на поверхні фосфату алюмінію, що утворюють комплексну сполуку із кверцетином і збільшуючих інтенсивність власної люмінесценції кверцетину.

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

Експериментально були обрані сорбенти, на яких І люм. кверцетину найбільша. Для цього досліджена сорбція комплексу на різних сорбентах: пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA), фосфаті алюмінію, силікагелі, Sephadex. Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається на фосфаті алюмінію, іммобілізованим іонами іттрію (III).

Час сорбції кверцетину становить 10-15 хвилин (Фіг.1). Інтенсивність люмінесценції кверцетину залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить $pH=4,5$ (Фіг.2). Як буфер використовували розчин уротропіну 0,4%-ний.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції кверцетину від кількості іттрію (III) на фосфаті алюмінію показало, що найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається в інтервалі концентрацій $(0,5-1) \cdot 10^{-2}\text{моль/л}$ (Фіг.3). Нами обрана концентрація іттрію (III) - $5 \cdot 10^{-3}\text{моль/л}$. Лінійна область залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації кверцетину спостерігається у діапазоні концентрацій кверцетину $(1,5-30) \cdot 10^{-3}\text{мг/мл}$.

Тест-визначення кверцетину проводили у фармпрепаратах і в лікарських рослинах.

Приклад 1. Визначення кверцетину в лікарських рослинах (у плодах розторопші плямистої).

Наважку 1г здрібнених на млині плодів розторопші 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 50 мл 50%-ним етанолом.

Як сорбент використовували медичний препарат «Фосфалюгель», що попередньо відмивають дистильованою водою, фільтрують і висушують. Осад обробляють спиртовим розчином хлориду іттрію (III) $(1 \cdot 10^{-2}\text{моль/л})$, перемішують на магнітній мішалці протягом 15 хвилин, фільтрують і висушують сорбент протягом 30 хвилин при температурі 60°C . 100мг модифікованого сорбенту поміщають у тигель, додають 1мл екстракту розторопші, потім обробляють 0,1мл 0,4%-ного уротропіну і перемішують на магнітній мішалці протягом 15 хвилин. Осад фільтрують і реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на фосфаті алюмінію при $\lambda_{\text{изл.}}=515\text{нм}$, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи з світлофільтром УФС-2 с ($\lambda_{\text{возб.}}=365\text{нм}$).

Інтенсивність люмінесценції проби порівнюють із інтенсивністю люмінесценції стандартних зразків, що містять різні кількості кверцетину $(3-15) \cdot 10^{-3}\text{мг/мл}$ і підготовлених у такий же спосіб, як описано вище. На підставі порівняльної оцінки роблять висновок про вміст кверцетину в зразку.

У плодах розторопші знайдено 1,4мг кверцетину на 1г сухої речовини. Результати визначення кверцетину перевірені методом «введено-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.1)

Приклад 2. Визначення кверцетину у фармацевтичному препараті «Дарсил».

Таблетки (2шт.) препарату «Дарсил» попередньо розтирають у ступці до порошкоподібного 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.

Далі визначення проводять таким чином, як у прикладі 1. 100мг модифікованого сорбенту поміщають у тигель, додають 1мл розчину, що аналізується, потім обробляють 0,1мл 0,4%-ного уротропіну й перемішують на магнітній мішалці протягом 15 хвилин. Осад фільтрують і реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на фосфаті алюмінію. Інтенсивність люмінесценції проби порівнюють із інтенсивністю люмінесценції стандартних зразків, що містять різні кількості кверцетину $(3-15) \cdot 10^{-3}\text{мг/мл}$ і підготовлених таким способом, як описано вище. На підставі порівняльної оцінки роблять висновок про вміст кверцетину в зразку.

У препараті «Дарсил» знайдено $0,033 \pm 0,002\text{г}$ кверцетину на 1 таблетку препарату. Результати визначення кверцетину перевірені методом «введено-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.2).

Таблиця 1

Результати визначення кверцетину в плодах розторопші методом «введено-знайдено»

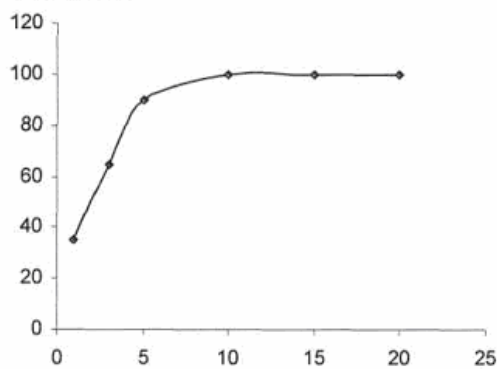
Добавка, мг	Знайдено в пробі з добавкою, мг	Знайдено в пробі, мг	Sr
0,010	0,0239	0,0139±0,0024	0,041
0,020	0,0342	0,0142±0,0019	0,039

Таблиця 2

Результати визначення кверцетину в препараті «Дарсил» методом «введено-знайдено»

Добавка, мг	Знайдено в пробі з добавкою, мг	Знайдено в пробі, мг	Sr
0,010	0,046	0,036±0,0023	0,051
0,020	0,052	0,032±0,0010	0,048

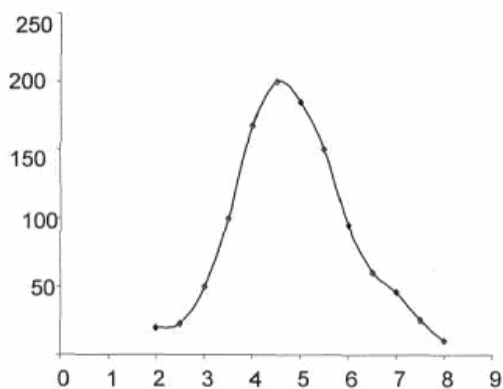
І люм., відн.од.



Час сорбції, хв.

Фіг.1

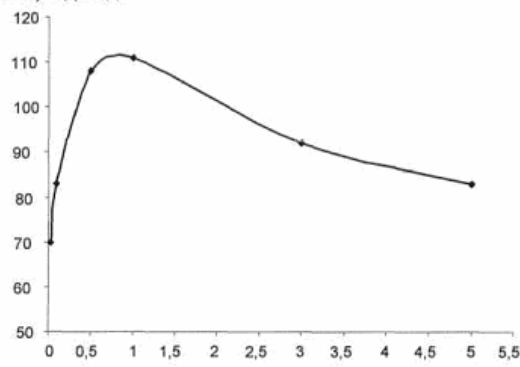
І люм., відн.од.



pH

Фіг.2

І люм., відн.од.

С іттрію (III)·10⁻², моль/л

Фіг.3