



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41373 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 35/00
G01N 21/78 (2009.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ РУТИНУ

1

(21) u200810404
(22) 15.08.2008
(24) 25.05.2009
(46) 25.05.2009, Бюл.№ 10, 2009 р.
(72) БЕЛЬТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, UA,
БИЧКОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА, UA
(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, UA

2

(57) Спосіб тест-визначення рутину, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику, взаємодію рутину з хімічним реагентом і вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що рутин піддають взаємодії з іонами ітрію (III), модифікованими на поверхні сорбенту Sephadex G-75, в присутності альбуміну, лаурилсульфату натрію та гексаметилентетраміну 10 %-вого при pH=6,4.

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

Відомий спосіб кількісного визначення рутину 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 рутину на платиновому електроді на фоні 0,1М H₂SO₄. 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 рутину 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 рутину проводили у такий спосіб. 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 співвідношенні компонентів 20:80), потім екстракт випарювали й висушували в струмі азоту. Екстракцію проводили тричі. До сухого залишку додавали 1мл метанолу

й перемішувала на мішалці протягом 5 хв. Отриманий розчин відфільтровували на мембранних фільтрах. Потім методом звернено-фазової рідинної хроматографії з використанням рухливої фази (метанол і фосфорна кислота) і колонки Phenomenex C₁₈ проводили виділення рутину протягом однієї години. За допомогою фотодіодного детектора проводили реєстрацію піка рутину на хроматограмі при λ=255nm. Загальний час проведення аналізу становить 3,5 години. Межа виявлення рутину становить 5·10⁻⁸ М.

Це рішення обране прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється мають такі спільні операції:

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

Однак, спосіб за прототипом 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 рутин із суми флавоноїдів, для реєстрації аналітичного сигналу застосовується дорогий фотодіодний матричний детектор, що значно ускладнює виконання аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб тест-визначення рутину, в якому за рахунок використання спектроскопічних власти-

(13) U

(11) 41373

(19) UA

ностей рутину забезпечити спрощене проведення аналізу та скоротити час його проведення.

Поставлена задача вирішена в способі тест-визначення рутину, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику, взаємодію рутину з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу тим, що рутин піддають взаємодії з іонами іттрію (III), модифікованими на поверхні сорбенту Sephadex G-75, в присутності альбуміну, лаурилсульфату натрію і буферного розчину гексаметилентетраміну 10%-ного, підкисленого соляною кислотою до pH=6,4.

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 рутину 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 сорбенту Sephadex G-75, що утворюють комплексну сполуку із рутинном і збільшуючих інтенсивність власної люмінесценції рутину.

Етанольний розчин рутину при опроміненні Уф-світлом ртутної лампи з $\lambda_{\text{макс}}=365\text{нм}$ проявляє люмінесцентні властивості ($\lambda_{\text{изл}}=530\text{нм}$), але інтенсивність його люмінесценції невелика. При комплексуванні з іонами іттрію (III) інтенсивність люмінесценції (I люм.) рутину зростає за рахунок того, що зростає твердість молекули й зменшуються внутрімолекулярні втрати енергії збудження. Інтенсивність люмінесценції комплексу значно посилюється на сорбентах.

Вплив різних чинників на інтенсивність люмінесценції комплексу рутину з іонами іттрію (III) наведено на графіках, де:

Фіг.1 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу рутину з іттрієм (III) від типу сорбенту;

Фіг.2 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу рутину з іттрієм (III) від температури висушування сорбенту;

Фіг.3 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу рутину з іттрієм (III) від часу висушування сорбенту.

Експериментально були обрані сорбенти, на яких I люм. рутину найбільша. Досліджена сорбція комплексу на різних сорбентах: 1. на силікагелі 100/160, 2. на силікагелі 100/400, 3. на фосфаті алюмінію, 4. на Sephadex G-50, 5. на Sephadex G-75, 6. на Sephadex G-150, а також на пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA). Залежність інтенсивності люмінесценції комплексу рутину з іттрієм (III) від відповідного сорбенту зазначена на Фіг.1. Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається на Sephadex G-75, Sephadex G-150, іммобілізованими іонами іттрію (III). Для подальшого аналізу нами був обраний сорбент Sephadex G-75.

Час сорбції рутину становить 10-15 хвилин. Інтенсивність люмінесценції рутину залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить pH=6,4. Як буфер використовували розчин гексаметилентетраміну 10%-ного, підкисленого соляною кислотою до pH=6,4. Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від температури (Фіг.2) і часу висушування сорбенту (Фіг.3). Як видно з рисунка максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається при висушуванні сорбату при 100°C на протязі 60 хвилин.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції рутину від кількості іттрію (III) на Sephadex G-75 показало, що інтенсивність люмінесценції збільшується зі збільшенням концентрації іттрію (III). Нами обрана концентрація іттрію (III) - $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Лінійна область залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації рутину спостерігається у діапазоні концентрацій рутину $(3-60) \cdot 10^{-3}$ мг/мл. I люм. сорбату комплексу рутину з іттрієм (III) значно збільшується в присутності альбуміну (використовували альбумін яєчного білка), а також у присутності аніонної поверхнево-активної речовини - лаурилсульфату натрію.

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

Приклад 1. Визначення рутину в лікарських рослинах (квіток софори).

Наважку 1г сухого екстракту квіток софори переносять у колбу, додають 50мл 70%-ного етанолу й перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хвилин при 70°C. Отриманий екстракт відфільтровують на фільтрі «синя стрічка» у мірну колбу. Доводять об'єм екстракту до 50 мл 70%-ним етанолом.

Як сорбент використовували Sephadex G-75. Наважку 100мг Sephadex G-75 поміщають у стаканчик, попередньо обробляють 1мл водного розчину хлориду іттрію (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану. Потім додають 1мл 70%-ного екстракту квіток софори й 0,2мл розчину лаурилсульфату натрію ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), 0,2мл 1%-ного розчину альбуміну, 0,1мл буферного розчину гексаметилентетраміну 10%-ного з pH=6,4 і перемішують на протязі 15 хвилин. Осад відфільтровують й висушують протягом 60 хвилин при 100°C. Потім розтирають в ступці до порошкоподібного стану й реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на сорбенті при $\lambda_{\text{изл}} \sim 530\text{нм}$, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб.}}=365\text{нм}$).

Інтенсивність люмінесценції проби порівнюють з інтенсивністю люмінесценції стандартних зразків, що містять різні кількості рутину $(6-60) \cdot 10^{-3}$ мг/мл і підготовлених таким же способом, як описано вище. На підставі порівняльної оцінки роблять висновки про вміст рутину в зразку.

В 70%-ному екстракті квіток софори знайдено $3,3 \cdot 10^{-2}$ мг/мл рутину. Результати визначення рутину перевірені методом «введене-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.1).

Приклад 2. Визначення рутину у фармацевтичному препараті «Рутин».

Таблетки (2шт.) препарату «Рутин» попередньо розтирають у ступці до порошкоподібного стану. Наважку 0,5г препарату кількісно переносять у колбу, додають 50мл етанолу, перемішують на магнітній мішалці протягом 30хв., потім відфільтровують і доводять об'єм до 50мл.

Спиртовий розчин препарату розчиняють таким чином, щоб не спостерігалася гасіння люмінесценції. Наважку 100мг Sephadex G-75 поміщають у стаканчик, попередньо обробляють 1мл водного розчину хлориду іттрію (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану. Потім додають 1мл спиртового розчину препарату й обробляють 0,2мл розчину лаурилсульфату натрію ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), 0,2мл 1%-ного розчину альбуміну, 0,1мл буферного розчину гексаметилентетраміну 10%-ного з pH=6,4 і перемішують протягом

15 хвилин. Осад відфільтровують і висушують протягом 60 хвилин при 100°C. Потім розтирають в ступці до порошкоподібного стану і реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, імобілізованого на сорбенті. Інтенсивність люмінесценції проби порівнюють з інтенсивністю люмінесценції стандартних зразків, які містять різні кількості рутину ($6-60 \cdot 10^{-3}$ мг/мл) й підготовлених таким же способом, як описано вище. На підставі порівняльної оцінки роблять висновок про вміст рутину у зразку.

У препараті «Рутин» знайдено $0,0196 \pm 0,0004$ мг рутину в перерахунку на 1 таблетку препарату. Результати визначення рутину перевірені методом «введено-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.2).

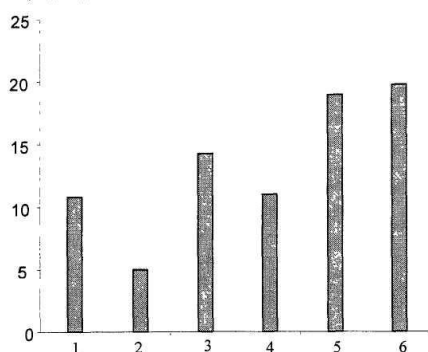
Таблиця 1
Результати визначення рутину в квітках софори методом «введено-знайдено»

Добавка, мг/мл	Знайденно в пробі з добавкою, мг/мл	Знайденно в пробі, мг/мл	Sr
0,010	0,044	$0,034 \pm 0,0023$	0,038
0,020	0,051	$0,031 \pm 0,0019$	0,040

Таблиця 2
Результати визначення рутину в препараті «Рутин» методом «введено-знайдено»

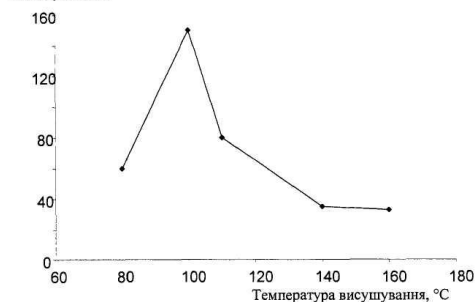
Добавка, мг	Знайденно в пробі з добавкою, мг	Знайденно в пробі, мг	Sr
0,010	0,0299	$0,0199 \pm 0,00010$	0,0051
0,020	0,0396	$0,0196 \pm 0,00023$	0,0048

I люм., відн.од.



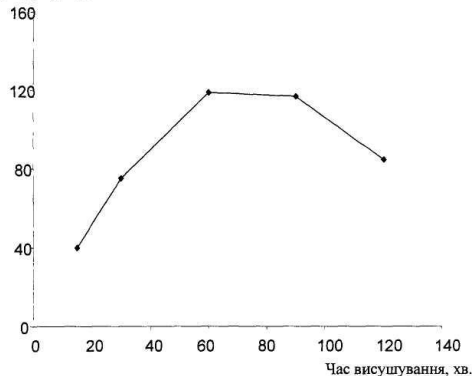
Фиг.1.

I люм., відн.од.



Фиг.2.

I люм., відн.од.



Фиг.3.

