



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 108176

(13) U

(51) МПК

G01N 33/15 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**(21) Номер заявки: **u 2015 12228**(22) Дата подання заявки: **10.12.2015**(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **11.07.2016**(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.07.2016, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

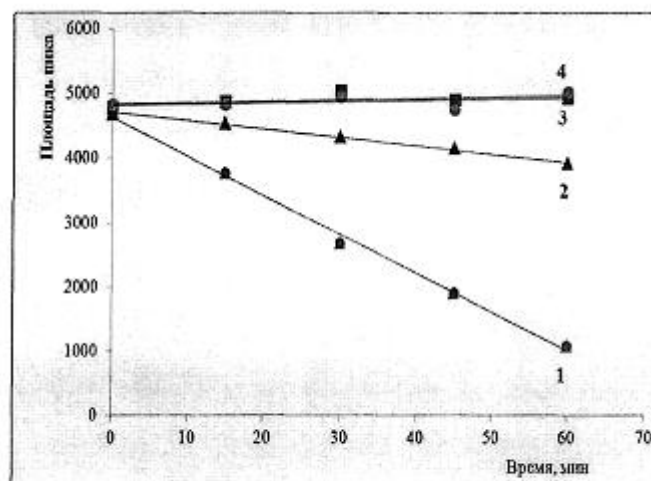
**Єгорова Алла Володимирівна (UA),
Федосенко Ганна Олександрівна (UA),
Мальцев Георгій Володимирович (UA),
Кашуцький Сергій Миколайович (UA),
Антонович Валерій Павлович (UA)**

(73) Власник(и):

**ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В.
БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080
(UA)****(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ**

(57) Реферат:

Спосіб визначення кверцетину, що включає приготування проби, її хроматографування, що включає елювання та подальше денситометричне вимірювання інтенсивності абсорбції, причому приготування проби здійснюють у присутності концентрованої фосфорної кислоти (85 %), елювання здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: толуол - етилацетат - мурашина кислота (50:40:2), а вимірювання інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 380 нм.



Фиг. 1

UA 108176 U

Корисна модель належить до аналізу матеріалів, а саме до високоефективного тонкошарового хроматографічного (ВЕТШХ) визначення, кверцетину.

Відомий спосіб визначення кверцетину в рослинній сировині за допомогою ВЕТШХ (див. Т. Mythili, R. Ravindhran. *Int. J. Adv. Pharm. Biol. Chem.* - 2013. - V. 2, № 1. - P. 113-119).

5 Спосіб передбачає обробку проби метанолом. Далі отриманий розчин фільтрують та наносять на хроматографічну пластинку з силікагелем 60 F 254. Визначення проводять за наступних умов: рухома фаза - толуол: етилацетат: мурашина кислота: метанол (5,5:3:1:0,5); детектування за довжини хвилі 386 нм. Чутливість способу визначення кверцетину - 100 нг/пляму.

10 Недоліком відомого способу є низька чутливість визначення кверцетину в рослинній сировині.

Найбільш близьким до способу, що заявляється, є визначення кверцетину в рослинній сировині за допомогою методу ВЕТШХ (див. Balbir Singh, Mohan Pal S. Ishar, Anupam Sharma. *J. Pharmacognosy and Phytochem.* - 2013. - V. 1, № 6. - P. 117-121). Спосіб базується на вилученні кверцетину з проби етанолом. Далі отриманий розчин фільтрують та наносять на хроматографічну пластинку з силікагелем 60 F 254.

Визначення проводять за наступних умов: рухома фаза - толуол: етилацетат: мурашина кислота (10:3:1); детектування за довжини хвилі 372 нм.

Даний спосіб вибрано прототипом.

20 Прототип та спосіб, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- приготування проби,
- вимірювання інтенсивності абсорбції.

Але спосіб за прототипом вимагає детектування поглинання кверцетину за довжини хвилі 372 нм та забезпечує чутливість визначення кверцетину - 60 нг/пляму.

25 У способі за прототипом не вживають у пробопідготовці концентровану фосфорну кислоту (85 %), у зв'язку з чим відсутнє ефективне запобігання взаємодії аналіту з компонентами сорбенту хроматографічної пластинки, наслідком чого є нестабільність кверцетину у малих нанесеннях.

30 В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб кількісного визначення кверцетину, в якому за рахунок інших умов здійснення приготування проби, а також інших умов хроматографування (склад рухомої фази, довжина хвилі детектування), забезпечується стабільність кверцетину на поверхні пластинки, що призводить до підвищення надійності та чутливості його визначення.

35 Поставлена задача вирішена в способі визначення кверцетину, що включає приготування проби, її хроматографування, що включає елюювання та подальше денситометричне вимірювання інтенсивності абсорбції, згідно з корисною моделлю, приготування проби здійснюють у присутності концентрованої фосфорної кислоти (85 %), елюювання здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: толуол - етилацетат - мурашина кислота (50:40:2), а вимірювання інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 380 нм.

40 Новим в заявленій корисній моделі є наявність наступних ознак:

- приготування проби з використанням концентрованої фосфорної кислоти (85 %);
- співвідношення компонентів рухомої фази: толуол - етилацетат - мурашина кислота (50:40:2);
- детектування поглинання кверцетину за довжини хвилі 380 нм;

45 Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю суттєвих ознак, що заявляються, і технічним результатом, що досягається, полягає в наступному:

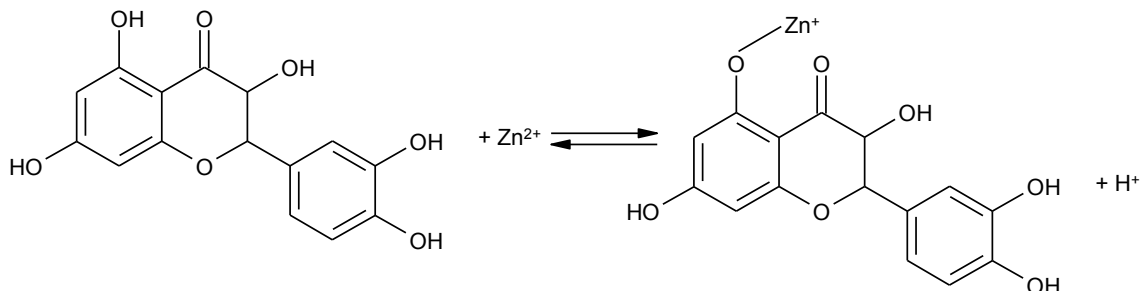
- додавання протонної кислоти дозволяє зміщувати рівновагу вліво та перешкоджає комплексоутворюванню кверцетину з компонентом індикатора - силікатом цинку (II);
- використання концентрованої фосфорної кислоти (85 %) у пробопідготовці дозволяє знизити межу кількісного визначення кверцетину в 13 разів.

50 Заявлені суттєві ознаки дозволяють досягнути наступного технічного результату - збільшити чутливість способу визначення кверцетину (4,5 нг/пляму).

При розробці методики як розчинник для приготування розчинів був використаний метанол. При побудові градувального графіка залежності площі піка від маси кверцетину на пластинці 55 було виявлено, що величина вільного члена рівняння градувальної залежності ($y = 32,094 \cdot x - 1294,3$) має дуже велике негативне значення і найменше нанесення, що детектується, відповідає масі близько 50 нг/пляму.

60 Ми припустили, що це пов'язано з взаємодією кверцетину з компонентами сорбенту. У зв'язку з цим була досліджена працездатність методики по залежності інтенсивності сигналу від часу знаходження речовини на пластинці. Для цього на пластинку наносили по 100 нг

кверцетину з інтервалом 15 хв. між кожною аплікацією, всього 5 нанесень. Була виявлена монотонна зміна сигналу в залежності від часу перебування речовини на поверхні сорбенту. Оскільки в аналізі використовуються пластини з флуоресцентним індикатором UF 254, а в якості індикатора використовуються силікат цинку (II), було припущено, що на поверхні сорбенту в місці нанесення відбувається оборотна взаємодія кверцетину з сіллю цинку (II) за наступною схемою:



Принципово важливо, що для альтернативних схем взаємодії (по ортооксикарбонільному або дифенольному угрупованню) реакція проходить з витісненням протона.

Для підтвердження цієї гіпотези був проведений експеримент з дослідження залежності інтенсивності сигналу від часу знаходження речовини на пластинці з сорбентом без флуоресцентного індикатора. Було виявлено, що в цьому випадку не спостерігається статистично значущої зміни площі піка кверцетину залежно від часу знаходження речовини на пластинці. З наведеної схеми взаємодії слідує, що додавання протонної кислоти буде зміщувати рівновагу вліво та перешкоджати комплексоутворенню. Для підтвердження цього були приготовані розчини кверцетину в метанолі з додаванням концентрованої фосфорної кислоти (85 %) у співвідношенні 2: 1, 1: 1 і 1: 2 (мкг речовини на мкл кислоти) і вивчена стабільність кверцетину на поверхні сорбенту з флуоресцентним індикатором.

Залежність площі піка кверцетину від часу знаходження речовини на пластинці та кількості фосфорної кислоти: 1 - без кислоти, 2 - кверцетин - фосфорна кислота 2: 1, 3 - кверцетин-фосфорна кислота 1: 1, 4 - кверцетин-фосфорна кислота 1: 2 наведено на фіг. 1.

Було виявлено, що стабільність досягається при співвідношенні кверцетин-концентрована фосфорна кислота (85 %) = 1: 1 (див. фіг. 1).

Приклад.

Визначення залишкових кількостей сухого екстракту листя гінкго білоба (за вмістом кверцетину) на поверхні фармацевтичного обладнання, на якому відбувалось виробництво лікарського засобу на основі даного активного фармацевтичного інгредієнта, проводили із застосуванням високоефективної тонкошарової хроматографії (ВЕТШХ).

Методика заснована на зміні площі піка кверцетину на хроматограмі залежно від концентрації сухого екстракту листя гінкго білоба (при необхідності розчин проби розбавляють до концентрації, що знаходиться в інтервалі градувального графіку). Вміст кверцетину в змивах (мкг/змив) визначають за градувальним графіком.

Градувальний графік будують наступним чином:

- у мірну колбу місткістю 50,0 мл вносять 10,0 мг кверцетину, розчиняють в 20 мл метанолу та доводять до позначки метанолом. 1,0 мл отриманого розчину поміщають в мірну колбу місткістю 20,0 мл, додають 0,2 мл концентрованої фосфорної кислоти (85 %) та доводять до позначки метанолом;

- на лінію старту хроматографічної пластинки за допомогою напівавтоматичного аплікатора Linomat 5 (CAMAG, Швейцарія) наносять 1, 2, 3, 4, 5 мкл (10, 20, 30, 40, 50 нг кверцетину, відповідно) отриманого розчину. Пластинку поміщають в камеру з сумішшю розчинників толуол - етилацетат - кислота мурашина (50: 40: 2). Коли фронт розчинників пройде 5 см від лінії старту, пластинку виймають з камери, сушать в потоці теплого повітря протягом 20 хв. і сканують на хроматодегситометрі TLC Scanner 3 (CAMAG, Швейцарія) при довжині хвилі 380 нм.

Аплікацію зразків проводять в наступних умовах:

Обсяг шприца, мкл - 100

Обсяг предозування, мкл - 2

Відстань від краю пластинки до центру першого треку, мм - 15

Відстань від нижнього краю пластинки до старту, мм - 15

Довжина смуги нанесення, мм - 6

Відстань між центрами треків, мм - не менше ніж 10

Швидкість дозування, нл/сек. - 200

Сканування хроматограми проводять за умов:

Розмір щілини, мм × мм - 4,00 × 0,30

Швидкість сканування, мм/сек. - 20

5 Розділення, мкм/крок - 100

Довжина хвилі сканування, нм - 380

Мінімальна висота піку, AU-5

Мінімальна площа піку, AU-20

Вимірюють площі отриманих плям на хроматограмі.

10 За отриманими результатами будують градувальний графік, відкладаючи на осі абсцис значення маси кверцетину (нг/пляму), а по осі ординат - значення інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 380 нм (площа піку, AU) (Градувальна залежність площі піка від маси кверцетину, нанесеного на ВЕТШХ-пластинку наведена на фіг. 2).

15 На фіг. 3 наведені 3D хроматограми: 1 - промивного розчину з чистого аплікатора; 2-6 стандартного розчину кверцетину (10, 20, 30, 40, 50 нг/пляму); 7,8 - розчинів після обробки свабів, якими робили змиви з поверхні фармацевтичного обладнання (кверцетин невиявлений).

20 Випробовуваний розчин. Сваб (бавовняний аплікатор Alpha® Sampling Swab марки TX 71) зі змивом забруднення обладнання (площа змиву - 100,0 см²) поміщають в лабораторний стакан місткістю 25 мл, додають 5,0 мл розчину для пробопідготовки (100 мл метанолу, змішаного з 0,1 мл концентрованої фосфорної кислоти (85 %)), проводять десорбцію протягом 10 хв. та наносять 40 мкл отриманого розчину на хроматографічну пластинку за допомогою напівавтоматичного аплікатора. Далі роблять як при побудові градувального графіку.

Вміст сухого екстракту листа гінкго білоба (X), в мкг/змив розраховують за формулою:

$$X = \frac{m_q \cdot 5 \cdot 10000}{40 \cdot P} = \frac{m_q \cdot 1250}{P},$$

25 де: m_q - маса кверцетину на хроматограмі випробовуваного розчину, отримана за градувальним графіком, нг/пляму;

P - вміст кверцетину в даній серії АФІ сухого екстракту листа гінкго білоба, %.

Визначення ступеня вилучення

30 У модельних дослідах в ході валідації методики робили змиви свабом, змоченим етиловим спиртом, з поверхні (100,0 см²), на яку штучно наносили по 0,5 мл розчину 200 мкг/мл АФІ сухого екстракту листа гінкго білоба (що відповідає 100 мкг екстракту або 4,25 мкг кверцетину) і висушували. Далі проводили витяг 5,0 мл розчину для пробопідготовки (0,85 мкг/мл кверцетину) і наносили 40 мкл отриманого розчину на хроматографічну пластинку з допомогою напівавтоматичного аплікатора. Далі поступають як при побудові градувального графіку.

35 Ступінь вилучення сухого екстракту листа гінкго білоба з поверхні фармацевтичного обладнання наведена у таблиці.

Встановлено, що ступінь вилучення сухого екстракту листа гінкго білоба з поверхні фармацевтичного обладнання становить 95,0 % - 96,7 % (див. таблиця). При n=5; P=0,95 відносне стандартне відхилення (s_r) складає 0,76.

40 Таким чином, спосіб дозволяє знизити нижню межу концентрацій кверцетину, що визначаються, в 13 разів у порівнянні з прототипом.

Таблиця

Номер змиву	1	2	3	4	5	Середнє	S_r , %
Ступінь вилучення сухого екстракту листа гінкго білоба, %	95,2	95,0	96,3	96,1	96,7	95,9	0,76

45

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб визначення кверцетину, що включає приготування проби, її хроматографування, що включає елювання та подальше денситометричне вимірювання інтенсивності абсорбції, який **відрізняється** тим, що приготування проби здійснюють у присутності концентрованої фосфорної кислоти (85 %), елювання здійснюють при наступному співвідношенні компонентів рухомої фази: толуол - етилацетат - мурашина кислота (50:40:2), а вимірювання інтенсивності абсорбції за довжини хвилі 380 нм.

50

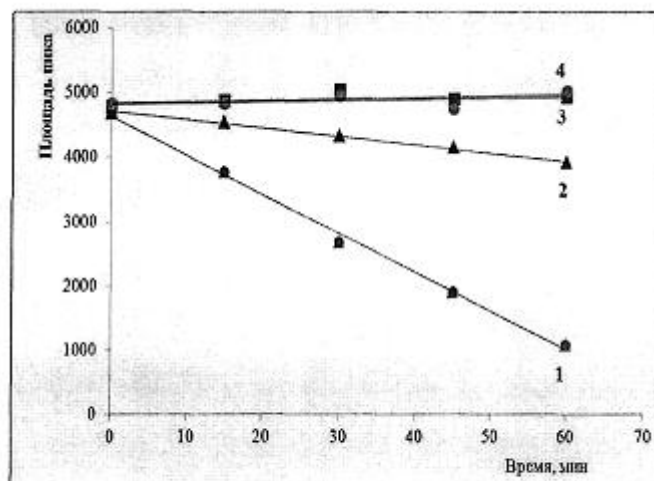


Fig. 1

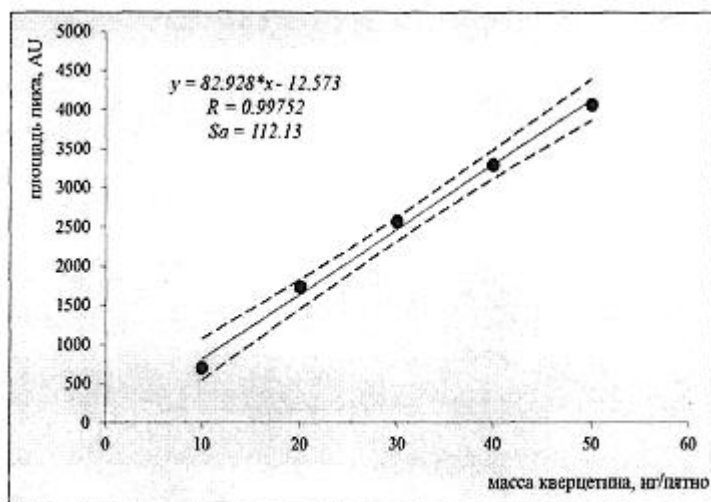


Fig. 2

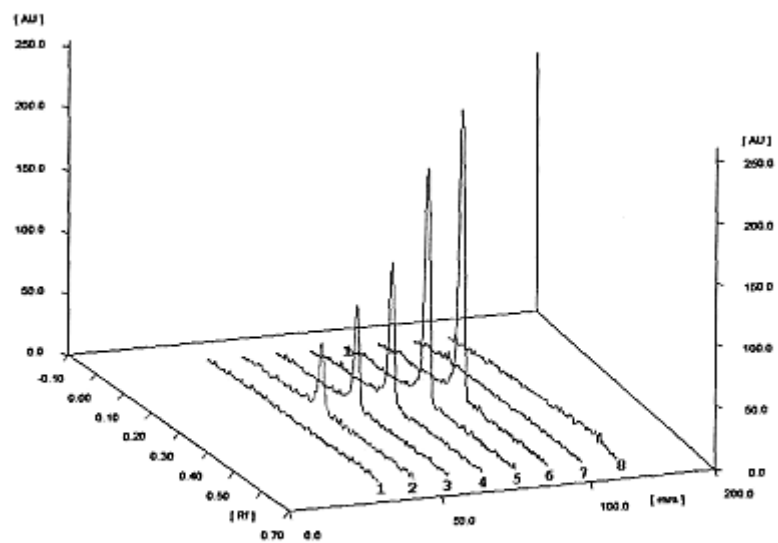


Fig. 3

Комп'ютерна верстка О. Гергіль

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601