



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **84586** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G01J 1/48** (2006.01)  
**C07C 401/00**  
**A61N 5/06** (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2013 05215**  
(22) Дата подання заявки: **23.04.2013**  
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: **25.10.2013**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.10.2013, Бюл.№ 20**

(72) Винахідник(и):  
**Самченко Юрій Маркович (UA),**  
**Теренецька Ірина Палладіївна (UA),**  
**Орлова Тетяна Миколаївна (UA),**  
**Болдескул Ігор Євгенович (UA),**  
**Капінос Павло Сергійович (UA),**  
**Ульберг Зоя Рудольфівна (UA)**  
(73) Власник(и):  
**Самченко Юрій Маркович,**  
вул. Предславинська, 25, кв. 70, м. Київ, 03150 (UA),  
**Теренецька Ірина Палладіївна,**  
вул. Рейтарська, 30, кв. 12, м. Київ, 04053 (UA),  
**Орлова Тетяна Миколаївна,**  
пр. Науки, 29 (гуртожиток № 3 ДЖКП НАНУ), м. Київ, 03028 (UA),  
**Болдескул Ігор Євгенович,**  
вул. Прорізна, 10, кв. 26, м. Київ, 01001 (UA),  
**Капінос Павло Сергійович,**  
вул. Академіка Заболотного, 148-а (гуртожиток № 7 ДЖКП НАНУ), м. Київ, 03680 (UA),  
**Ульберг Зоя Рудольфівна,**  
Печерський узвіз, 8, кв. 72, м. Київ, 01023 (UA)

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДОЗИ УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ

### (57) Реферат:

Спосіб визначення біологічної дози ультрафіолетового випромінювання полягає в тому, що опромінюють УФ світлом фоточутливе середовище з молекулами стероїдів, здатних до фотоперетворень під дією УФ випромінювання, що відповідають процесу фотосинтезу превітаміну D in vitro, реєструють його спектр поглинання до і після опромінення і визначають концентраційний склад утворюваних фотоізомерних сумішей за допомогою комп'ютерної обробки спектральних даних, та визначають отриману УФ біологічну дозу за концентрацією превітаміну D, накопиченого під час УФ опромінення. Як фоточутливе середовище застосовують гідрогелеві матриці з молекулами провітаміну D, синтезовані на основі гідрофільних та гідрофобних (або таких, що містять гідрофобні фрагменти) акрилових мономерів.

UA 84586 U



Корисна модель належить до галузі фотобіології та фотохімії і може бути використана у медицині, екології, зоології, курортології, косметології, сільському господарстві, харчовій промисловості, епідеміології і в побуті для контролю специфічної вітамін-D-синтезувальної біологічної активності ультрафіолетового випромінювання Сонця та штучних джерел ультрафіолетового світла.

Синтез вітаміну D<sub>3</sub> у шкірі людини є важливим позитивним наслідком ультрафіолетового опромінення. Як виявлено останнім часом, окрім загально відомих рахиту у дітей та остеопорозу у дорослих, дефіцит вітаміну D<sub>3</sub> спричиняє багато серйозних захворювань серця і внутрішніх органів. Зважаючи на це, контроль специфічної вітамін-D-синтезувальної здатності, тобто антирахітної біологічної активності, ультрафіолетового випромінювання набуває великого значення, зокрема, з огляду на існуючу пандемію дефіциту вітаміну D [Michael F. Holick, Vitamin D: A Millenium Perspective, J. Cell. Biochem., Vol.88 (2003) 296-307].

Термін вітамін D тут і надалі вживається у загальному сенсі, хоча відомі дві хімічні форми вітаміну D: вітамін D<sub>2</sub>, або ергокальциферол (C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O), утворюється із ергостерину (провітаміну D<sub>2</sub>) під дією ультрафіолетового опромінення в рослинах, тоді як синтез вітаміну D<sub>3</sub>, або холекальциферолу (C<sub>27</sub>H<sub>44</sub>O) відбувається у шкірі ссавців внаслідок фотохімічної ізомеризації 7-дегідрохолестерину (7-ДГХ, провітаміну D<sub>3</sub>). Важливо відзначити, що схеми реакції синтезу цих двох вітамінів повністю аналогічні, а всі ці молекули відносяться до класу стероїдів.

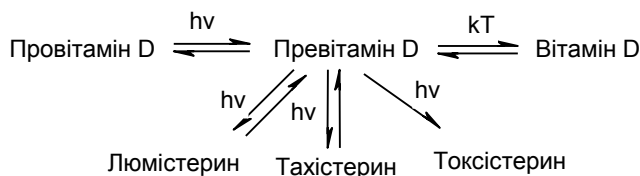
Необхідність постійного контролю дози ультрафіолетового випромінювання обумовлена тим, що біологічна активність ультрафіолетового (УФ) випромінювання може спричиняти як позитивні (синтез вітаміну D), так і негативні ефекти (опіки та інші негативні наслідки).

Більшість відомих приладів для визначення дози біологічно активного ультрафіолетового випромінювання призначена для запобігання негативним ефектам від надмірних УФ доз. Тому в переважній більшості відомі персональні дозиметри мають спектральну чутливість, що відповідає еритемному спектру дії (CIE erythema action spectrum<sup>1</sup> (<sup>1</sup> Commission Internationale d'Eclairage, A reference action spectrum for ultraviolet induced erythema in human skin, C.I.E. J., Vol.6(1987) 17-22.)).

Як приклад можна навести спосіб контролю ультрафіолетового випромінювання, заснований на вимірюванні ступеня потемніння полімерних пластинок із полісульфону внаслідок фотодеградації під дією ультрафіолетового опромінення [A.Davis, G.H.W.Deane, and B.L.Diffey, Possible dosimeter for UV radiation, Nature (London)Vol. 261(1976) 169-170]. Зміну оптичної густини полімерних пластинок реєструють на фіксованій довжині хвилі за допомогою спектрофотометра і визначають отриману дозу ультрафіолетового опромінення за допомогою градувального графіка.

Внаслідок суттєвої різниці поміж спектром дії синтезу вітаміну D та еритемним спектром дії такий спосіб є непридатним для адекватної оцінки вітамін-D-синтезувальної біологічної активності ультрафіолетового випромінювання.

Очевидно, що найбільш відповідним способом визначення вітамін-D-синтезувальної дози сонячного/штучного УФ випромінювання є використання саме того фотопроцесу, який лежить в основі природного синтезу вітаміну D, а саме, фотоізомеризації провітаміну D при поглинанні ультрафіолетового випромінювання, завдяки чому утворюється безпосередній попередник вітаміну D - превітамін D за схемою:



на якій шляхи фотоперетворень показано стрілками, біля яких стоїть енергія кванта УФ світла  $h\nu$ .

Таким чином, кількість фотосинтезованого превітаміну D є природною біологічною мірою отриманої антирахітної УФ біодози.

Але при УФ опроміненні провітаміну D визначення концентрації накопиченого превітаміну D значно ускладнене внаслідок бічних фотоперетворень останнього, які призводять до утворення багатокомпонентної суміші фотоізомерів.

Тому при використанні фотореакції для визначення сезонних змін вітамін-D-синтезувальної активності сонячного випромінювання [A.R. Webb, L.W. Kline, M.F. Holick, Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D<sub>3</sub>: exposure to winter sunlight in Boston and

Edmonton will not promote vitamin D3 in human skin, J. Clin. Endocrinol. Metabol. Vol.67 (4988,) 373-378] концентрація накопиченого превітаміну D визначалась за допомогою хроматографічного аналізу, що виключає можливість контролю ультрафіолетового випромінювання *in situ*.

Суттєвого прогресу було досягнуто завдяки розробці оригінальної комп'ютерної програми спектрофотометричного аналізу, внаслідок чого було запропоновано "Спосіб контролю біоактивного ультрафіолетового випромінювання" [І.П. Теренецька, К.О. Теренецький, Патент UA №19525 А (див. Бюлл. № 6 від 25.12.1997 року)], який вибраний як найближчий аналог і полягає в наступному:

Розчин 7-дегідрохолестерину в етанолі опромінюють у стандартній кварцовій спектрофотометричній кюветі. Спектр поглинання розчину реєструють спектрофотометром в діапазоні 240-330 нм до та після опромінювання, і шляхом подальшої комп'ютерної обробки записаних спектрів за спеціально розробленою програмою визначають концентрацію утвореного превітаміну D, яка і є мірою одержаної антирахітної ультрафіолетової біодози.

До недоліків цього способу належать:

- використання розчину провітаміну D, що утруднює його застосування для персональної дозиметрії ультрафіолетового опромінювання;
- необхідність використання герметизованих крихких та досить дорогих спектрофотометричних кварцових кювет.

Тому було здійснено пошук матеріалів для виготовлення матриці з можливістю інкорпорування в ній молекул провітаміну D. Така спеціально підібрана матриця повинна бути стійкою до УФ випромінювання і прозорою в області поглинання провітаміну D і в ній слабка взаємодія з молекулами стероїдів не призводить до деформації їх спектра поглинання.

Використання як матриці пористої силікатної, полімерної, рідкокристалічної плівок або плівки з полімерно-рідкокристалічної композиції [Патент на винахід № 93569 "СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ *IN SITU* ВІТАМІН-D-СИНТЕЗУВАЛЬНОЇ ДОЗИ ПРИРОДНОГО ТА ШТУЧНОГО УЛЬТРАФІОЛЕТОВОГО ОПРОМІНЕННЯ ТА ПЕРСОНАЛЬНИЙ БІОДОЗИМЕТР ДЛЯ ЙОГО ЗДІЙСНЕННЯ" Теренецька І.П., Орлова Т.М., Кириленко С.К., Єременко А.М., Галіч Г.А.] виявило, що деформація спектра поглинання 7-ДГХ внаслідок його взаємодії з оточуючим мікросередовищем не дозволяє проводити спектральний аналіз, оскільки індивідуальні спектри поглинання фотоізомерів відомі тільки у розчині.

В основу корисної моделі поставлено задачу усунення зазначених недоліків шляхом створення принципово іншого фоточутливого матеріалу, такої матриці, в якій досить слабка взаємодія з молекулами провітаміну D не призводила б до деформації його УФ спектра поглинання, внаслідок чого визначення концентрації превітаміну D, тобто біологічної дози, було б можливим за допомогою спектрального аналізу.

Поставлена задача вирішується способом, що реалізується шляхом УФ опромінювання фоточутливого середовища з молекулами стероїдів, здатних до фотоперетворень під дією УФ світла, що відповідають процесу фотосинтезу провітаміну D *in vitro*, реєстрації його спектра поглинання спектрофотометром у діапазоні 250-330 нм до і після опромінювання, визначення концентрації утвореного превітаміну D, тобто біологічної дози, за допомогою комп'ютерної обробки записаних спектрів, згідно з корисною моделлю, як фоточутливе середовище застосовують гідрогелеві матриці з молекулами провітаміну D, синтезовані на основі гідрофільних та гідрофобних (або таких, що містять гідрофобні фрагменти) акрилових мономерів.

Такі гідрогелеві матриці, на відміну від традиційних гідрогелів, що набухають тільки у водних розчинах, здатні до набухання у широкому спектрі розчинників, як водних (вода, фізіологічний розчин тощо), так і органічних (етанол, метанол, ацетон тощо), причому без втрати оптичної прозорості, внаслідок чого виникає можливість введення молекул провітаміну D у матрицю, а матриця набуває еластичності та міцності.

Було створено просторовозшиитий полімер акрилового ряду радикальною співполімеризацією у водному середовищі гідрофільних та гідрофобних (або таких, що містять гідрофобні фрагменти) акрилових мономерів, взятих при їх мольному співвідношенні 1:0,25-200, з біфункціональним зшиваючим мономером, взятим у кількості від 0,001 до 2,5 мас. % від сумарної маси мономерів у композиції, з подальшим відмиванням отриманої матриці від залишків мономерів, що не прореагували, шляхом багатоденної екстракції у циркулюючій воді, та з подальшим висушуванням та насиченням розчином відповідного стероїду з концентрацією від 0,001 до 0,1 мас. %.

Як гідрофільний мономер співполімер може містити мономері із групи: акриламід, акрилова кислота, N-вінілпіролідон, гідроксіетилметакрилат, аліламін, а як гідрофобний мономер (чи

мономер, що містить гідрофобні фрагменти) - акрилонітрил, N-ізопропілакриламід або метакрилат.

Як функціональний зшиваючий мономер співполімер може містити мономері із групи: N,N'-метилден-біс-акриламід, етиленглікольдиметакрилат діакрилоїлпіперазин.

5 Як стероїд використовують речовину із групи провітамінів D: ергостерин (провітамін D<sub>2</sub>), 7-дегідрохолестерин (провітамін D<sub>3</sub>).

Проілюструємо синтез гідрогелевих матриць для визначення *in situ* вітамін-D-синтезувальної дози природного та штучного ультрафіолетового опромінення конкретними прикладами його виконання, що, однак, не обмежують подальшу область застосування.

10 Приклад 1

Через розчин, що містить 0,65 г акриламід та 0,35 г акрилонітрилу, 0,001 г N,N'-метилден-біс-акриламід, 0,012 г персульфату амонію та воду, пропускають аргон протягом двох хвилин при охолодженні льодом, після чого добавляють 0,006 г тетраметилетилендіаміну і перемішують протягом 1 хв на магнітній мішалці. Отриманий розчин заливають між двома плоскопаралельними пластинами, виготовленими зі скла або тефлону, що розділені спейсерами товщиною 1 мм. Через 1 годину після завершення полімеризації, пластини рознімають, отримані гідрогелеві плівки виймають і промивають від залишків непрореагованих мономерів при температурі 40 °C протягом 120 годин зі щоденною її заміною.

Приклад 2

20 Через розчин, що містить 0,25 г акриламід та 0,75 г N-ізопропілакриламід, 0,0025 г етиленглікольдиметакрилату, 0,02 г персульфату амонію та воду, пропускають аргон протягом трьох хвилин при охолодженні льодом, після чого добавляють 0,01 г тетраметилетилендіаміну і перемішують протягом 1 хв на магнітній мішалці. Отриманий розчин заливають між двома плоскопаралельними пластинами, виготовленими зі скла або тефлону, що розділені спейсерами товщиною 1 мм. Через 1 годину після завершення полімеризації, пластини рознімають, отримані гідрогелеві плівки виймають і промивають від залишків непрореагованих мономерів при температурі 40 °C протягом 120 годин зі щоденною її заміною.

Приклад 3

30 Через розчин, що містить 0,05 г акриламід та 0,95 г N-ізопропілакриламід, 0,002 г N,N'-метилден-біс-акриламід, 0,03 г персульфату амонію та воду, пропускають аргон протягом двох хвилин при охолодженні льодом, після чого добавляють 0,015 г тетраметилетилендіаміну і перемішують протягом 1 хв на магнітній мішалці. Отриманий розчин заливають між двома плоскопаралельними пластинами, виготовленими зі скла або тефлону, що розділені спейсерами товщиною 1 мм. Через 1 годину після завершення полімеризації, пластини рознімають, отримані гідрогелеві плівки виймають і промивають від залишків непрореагованих мономерів при температурі 40 °C протягом 120 годин зі щоденною її заміною.

Приклад 4

Гідрогелеву матрицю, отриману за прикладами 1-3, висушують при температурі 30-40 °C, після чого просочують етанольним розчином провітаміну D з концентрацією 0,01 % протягом 24 годин при температурі близько 5 °C. Оптичну густину провітаміну D, інкорпорованого до гідрогелевої матриці, вимірюють на УФ спектрофотометрі при довжині хвилі 282 нм відносно повітря або відносно ненаповненої гідрогелевої матриці та оцінюють за попередньо побудованою відповідною калібрувальною прямою.

Спосіб докладно розкривається на прикладах з посиланнями на наступні фігури.

45 На фіг. 1 наведено трансформацію спектрів поглинання 7-ДГХ провітаміну D<sub>3</sub> у гідрогелевій плівці, виготовленій за прикладом 2 та в етанольному розчині фіг. 2 внаслідок УФ опромінення лампою ЕЛ-30 протягом 30 хвилин.

На фіг. 3 наведено результати концентраційного аналізу, отримані шляхом комп'ютерної обробки спектрів поглинання 7-ДГХ в гідрогелевій плівці та в етанолі, зареєстрованих після фіксованих експозицій при УФ опроміненні лампою ЕЛ-30, тобто відображено порівняння зміни концентрацій провітаміну D та його фотоізомерів у гідрогелевій плівці, виготовленій за прикладом 3, та в етанольному розчині від часу УФ опромінювання лампою ЕЛ-30 протягом 30 хвилин.

Приклад виконання способу

55 Готують дві гідрогелеві матриці, отримані за прикладами 1-3: одну, просочену етанольним розчином провітаміну D (для каналу зразка), та другу, просочену етанолом (для каналу порівняння). За допомогою спектрофотометра Perkin&Elmer Lambda 25 UV/VIS реєструють спектр поглинання гідрогелевої плівки з домішкою 7-ДГХ в діапазоні 250-330 нм до опромінювання. Потім плівку опромінюють УФ флуоресцентною лампою ЕЛ-30. Після кожної з 60 фіксованих експозицій вимірюють спектр поглинання плівки (фіг. 1). Отримані спектри

поглинання порівнюють із спектрами поглинання провітаміну D в етанольному розчині (фіг. 2), отримані при УФ опроміненні в таких же умовах.

За допомогою комп'ютерної обробки спектрів отримують залежності концентрацій провітаміну D та його фотоізомерів від часу УФ опромінення в плівці і в етанолі (фіг. 3), близька подібність яких свідчить про схожість накопичення провітаміну D в гідрогелевій плівці і в етанолі.

В подальшому антирахітну УФ дозу визначають за концентрацією утворюваного провітаміну D.

Пропонований спосіб може знайти широке застосування в екології, медицині, косметології та ін.:

- для щоденного контролю сонячного ультрафіолетового випромінювання, здатного ініціювати синтез вітаміну D;

- для дозиметричного контролю штучних джерел ультрафіолетового випромінювання (ламп і лазерів);

- для персонального контролю антирахітичних ультрафіолетових доз при епідеміологічних дослідженнях;

- для контролю одержаної антирахітичної дози ультрафіолетового опромінення в фізіотерапевтичних кабінетах і соляріях;

- в зоології, біології, океанології, сільському господарстві тощо.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб визначення біологічної дози ультрафіолетового випромінювання, який полягає в тому, що опромінюють УФ світлом фоточутливе середовище з молекулами стероїдів, здатних до фотоперетворень під дією УФ випромінювання, що відповідають процесу фотосинтезу провітаміну D *in vitro*, реєструють його спектр поглинання до і після опромінення і визначають концентраційний склад утворюваних фотоізомерних сумішей за допомогою комп'ютерної обробки спектральних даних, та визначають отриману УФ біологічну дозу за концентрацією провітаміну D, накопиченого під час УФ опромінення, який **відрізняється** тим, що як фоточутливе середовище застосовують гідрогелеві матриці з молекулами провітаміну D, синтезовані на основі гідрофільних та гідрофобних (або таких, що містять гідрофобні фрагменти) акрилових мономерів.

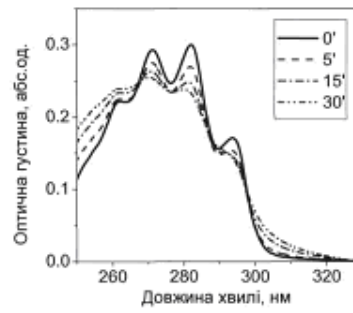
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що гідрогелеві матриці виготовляють шляхом змішування просторовозшитих (спів)полімерів, що містять ланки гідрофільних та гідрофобних (або таких, що містять гідрофобні фрагменти) мономерів, взятих при їх мольному співвідношенні 1:0,25-200, що дозволяє здійснювати його набухання у широкому спектрі розчинників, як водних (вода, фізіологічний розчин тощо), так і органічних (метанол, етанол, ацетон тощо), з забезпеченням оптичної прозорості у діапазоні 250-330 нм.

3. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що як гідрофільні мономер для отримання просторовозшитого (спів)полімеру використовуються мономері із групи: акриламід, акрилова кислота, N-вінілпіролідон, гідроксіетилметакрилат, аліламін.

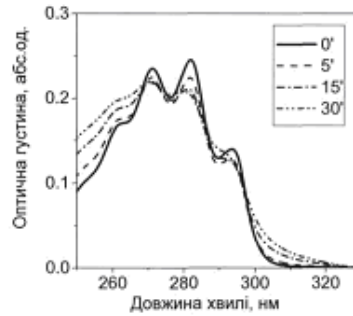
4. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що як гідрофобні мономері (або такі, що містять гідрофобні фрагменти) для отримання просторовозшитого (спів)полімеру використовуються мономері із групи: акрилонітрил, N-ізопропілакриламід, метилакрилат.

5. Спосіб за пп. 1, 2, який **відрізняється** тим, що як зшиваючий агент для отримання просторовозшитого (спів)полімеру використовуються біфункціональні мономері із групи: N,N'-метилден-біс-акриламід, етиленглікольдиметакрилат, діакрилоїлпіперазин, причому кількість зшиваючого агента складає від 0,001 до 2,5 мас. % від сумарної маси мономерів у композиції.

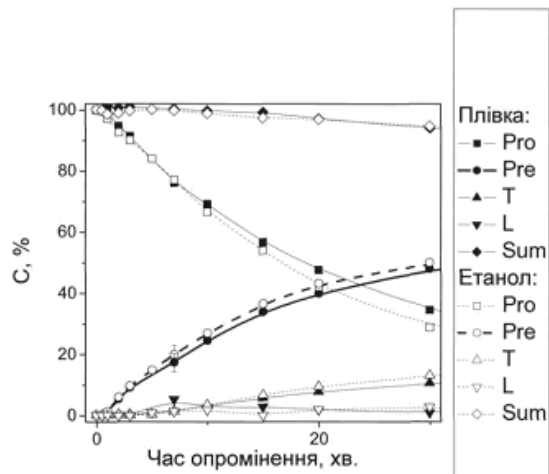
6. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що як стероїд використовують речовину із групи провітамінів D: ергостерин (провітамін D<sub>2</sub>), 7-дегідрохолестерин (провітамін D<sub>3</sub>) та інші.



Фіг. 1



Фіг. 2



Pro - провітамін D, Pre - превітамін D, T - тахістерін,  
L - люмістерін, Sum - їх сумарна концентрація.

Фіг. 3

Комп'ютерна верстка В. Мацело

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

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