

УДК 54.062:547.972.35

Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю.

Національний фармацевтичний університет

## **КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЛАВОНОЇДІВ**

### **ХЕМІЛЮМІНЕСЦЕНТНИМ МЕТОДОМ В ЛІКАРСЬКИХ ФОРМАХ**

Рутин (*P*), кверцетин (*KB*) та дигідрокверцетин (*ДKB*) належать до вітамінів групи Р. Вони мають здатність зменшувати проникність та ламкість капілярів, виявляють антиоксидантні властивості [1]. Для кількісного визначення цих об'єктів у лікарських формах, лікарській рослинній сировині та біологічних рідинах у теперішній час застосовують такі фізико-хімічні методи аналізу, як високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) [2, 3], вольтамперометрія [4], капілярний електрофорез [5], полярографія [6, 7] тощо [8]. Особливу увагу привертає високочутливий хемілюмінесцентний метод аналізу. Так, кількісне визначення *P* пропонується виконувати за ефектом інгібування хемілюмінесцентної (*ХЛ*) реакції окиснення люмінолу (*H<sub>2</sub>L*) вільним йодом [9], перйодатом [10] або гексаціанофератом (III) калію [11, 12]. Межа виявлення рутину становить 0.5 мкг/мл, 0.03 нг/мл та 13.3 нг/мл відповідно.

Метою даної статті є дослідження можливості здійснення кількісного визначення *P*, *KB* та *ДKB* в лікарських препаратах кінетичним

методом за ефектом інгібування *XII* нової аналітичної системи  $H_2L - H_2O_2$  – *Hb* (гемоглобін) [13].

#### *Об'єкти та методи*

Для досліджень використовували субстанції кверцетину дигідрата (99.6%) виробництва фірми „Мегск”, рутину тригідрата (98%) виробництва фірми „Fluka”, дигідрокверцетину (99.2% згідно з ФС 42-3853-99) виробництва ТОВ „Флавир”, Росія, аскорбінової кислоти (99.1%) з відомим ступенем очищення (ФС 42-2668-95), лікарські форми, що містять рутин: таблетки „Аскорутин” виробництва АТ „Київський вітамінний завод”, Україна, серія 430803 та кверцетин – „Гранули кверцетину” виробництва „Борщагівський хімфармзавод”, Україна, серія 30303.

Вихідний 0.001 М розчин люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіону,  $H_2L$  (фірма „Хемапол”, Чехія)) готували з очищеного комерційного препарату перекристалізацією з льодової оцтової кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину лугу за точною наважкою у 0.01 М розчині гідроксида натрію. В роботі використовували розчини лугу без карбонатів.

Для створення та підтримки необхідної кислотності середовища використовували 0.1 М розчин гідроксида натрію, рН розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електрода ЭСЛ-43-07 та йонміра лабораторного И-130. Усі розчини готували на бідистильованій воді.

Розчин гідроген пероксиду 5% (мас.) готували із 50%-вого препарату о.с.ч. розбавленням його водою з наступним контролем концентрації 0.01 М розчином калію перманганата.

Застосовували гемоглобін крові людини виробництва фірми “Simko Ltd”, м. Львів, Україна. Вихідний розчин гемоглобіну 75 мкг/мл готували розчиненням 7.5 мг гемоглобіну в 75 мл бідистильованої води при нагріванні та додаванні 0.5 г натрію дигідроген фосфату. Об'єм доводили до позначки бідистильованою водою при 20°C і перемішували. Робочий розчин гемоглобіну готували розбавленням вихідного бідистильованою водою точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби.

Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на Хемілюмінометрі – 0.1 з фотоелектронним помножувачем ФЭУ-84-А, вимірювачем малих струмів ИМТ-0.5 і швидкодіючим (постійна часу 0.1с) потенціометром-самописцем. Реакцію, що супроводжується хемілюмінесценцією, проводили у кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів зберігали наступний порядок змішування реагентів: до суміші індикатора люмінолу в розчині лугу та гідроген пероксиду (з розчинами досліджуваних речовин або без них) додавали за допомогою піпеточного дозувача П-1 0.50 мл розчину гемоглобіна і реєстрували кінетичну криву інтенсивність хемілюмінесценції ( $I_{хл}$ ) - час ( $xв$ ). Дозувач влаштований у зйомний тримач,

який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, а відтак дозволяє працювати при звичайному освітленні. Усі досліди виконували при температурі +18...20°C.

Інгібуючий вплив ***P***, ***KB*** та ***ДКВ*** оцінювали за величиною зменшення (депресією) максимальної інтенсивності *ХЛ*  $\Delta I_{\text{ХЛ}} = I_0 - I_{\text{ХЛ}}$ , де  $I_0$  (відн. од.) – максимальна інтенсивність *ХЛ* у відсутності ***P***, ***KB*** та ***ДКВ***,  $I_{\text{ХЛ}}$  (відн. од.) – максимальна інтенсивність *ХЛ* у присутності ***P***, ***KB*** та ***ДКВ***.

#### *Результати досліджень та їх обговорення*

Експериментально встановлено, що наявність флавоноїдів в *ХЛ* – системі  $H_2L - H_2O_2 - Hb$  призводить до зменшення максимальної інтенсивності світіння. Оптимальним для вияву ефекту інгібування є порядок змішування компонентів хемілюмінесцентної композиції, коли останнім додається *Hb*. Зменшення інтенсивності *ХЛ* пропорційне концентрації інгібіторів. На рис. 1 представлені залежності  $\Delta I_{\text{ХЛ}}$  від концентрації флавоноїдів.

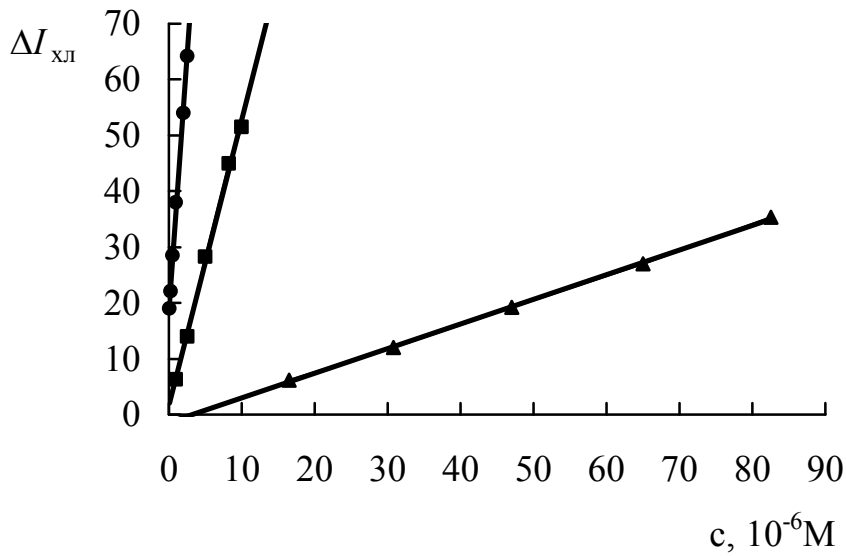


Рис. 1 Залежність  $\Delta I_{xл}$  в системі  $H_2L - H_2O_2 - Hb - Inh$  від концентрації флавоноїдів: 1 – ДКВ; 2 – P; 3 – KB.

Лінійна залежність зменшення максимальної інтенсивності ХЛ ( $r = 0.998 - 0.999$ )  $\Delta I_{xл}$  в присутності флавоноїдів покладена в основу ХЛ методу їх кількісного визначення в модельних розчинах та лікарських формах. В таблиці 1 наведені результати кількісного визначення флавоноїдів методом ХЛ за ефектом інгібування.

Таблиця 1

**Результати кількісного визначення флавоноїдів методом хемілюмінесценції за ефектом інгібування (n = 5, P = 0.95)**

№ п/п	Визначувана речовина	Рівняння градууювального графіка	$C_{min}$ , М	Інтервал визначуваних концентрацій	$S_r$ , %

1.	Дигідро-кверцетин	$\Delta I = 1.8 \cdot 10^7 \cdot c + 18$ ( $r = 0.998$ )	$1.5 \cdot 10^{-8}$	$3.0 \cdot 10^{-8} -$ $2.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}$	$\pm 3.0$
2.	Кверцетин	$\Delta I = 4.4 \cdot 10^5 \cdot c - 1.4$ ( $r = 0.999$ )	$3.8 \cdot 10^{-6}$	$7.6 \cdot 10^{-6} -$ $8.25 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$\pm 1.8$
3.	Рутин	$\Delta I = 5.1 \cdot 10^6 \cdot c + 2$ ( $r = 0.998$ )	$2.7 \cdot 10^{-7}$	$5.4 \cdot 10^{-7} -$ $1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$	$\pm 2.0$

*Приготування робочого стандартного розчину рутину 50 мкг/мл.*

Розчиняють 0.5000 г рутину в мірній колбі на 1000 мл у 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. Об'єм розчину доводять до позначки бідистильованою водою при 20°C. 10.00 мл одержаного розчину переносять в мірну колбу на 100 мл, додають 5 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду і об'єм розчину доводять до позначки бідистильованою водою. Розчин придатний до застосування протягом доби.

*Методика кількісного визначення рутину в таблетках „Аскорутин”.*

До 300 мг розтертих таблеток (точна наважка), додають 50 мл бідистильованої води, ретельно перемішують впродовж 5 хвилин, фільтрують, використовуючи фільтр з червоною стрічкою. Осад тричі промивають по 10 мл бідистильованою водою. Фільтр з осадом переносять у хімічний стакан і додають 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. Отриманий розчин кількісно переносять в колбу місткістю 1000 мл та доводять об'єм до позначки бідистильованою водою при 20°C (**P**).

Паралельно готують об'ємно-ваговим методом розчин робочого стандартного зразка **P** з концентрацією 50 мкг/мл на бідистиляті з додаванням 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. У кварцову кювету послідовно приливають 1.5 мл розчину  $H_2L$ , 5 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, 1.5 мл бідистильованої води, 0.5 мл 5%-вого розчину  $H_2O_2$  та 1 мл розчину рутину, ізольованого з водної суспензії таблеток „Аскорутин”. Одержану суміш перемішують і встановлюють кювету у світлозахисну камеру. Відкривають шторку і вливають за допомогою піпеткового дозувача 0.5 мл розчину  $Hb$ . Аналогічного порядку додавання розчинів дотримуються при виконанні досліду з розчином стандартного зразка. В усіх випадках реєструють максимальне значення інтенсивності світіння у порівнянні до його фонового значення,  $\Delta I_{xl}$ . Вміст **P** в препараті знаходять методом порівняння  $\Delta I_{xl}$  з розчином стандартного зразка.

Вміст рутину в г на таблетку (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot \Delta I_{xl} \cdot 1000 \cdot \bar{m}}{\Delta I_{ct} \cdot m_n},$$

де C – концентрація робочого розчину стандартного зразка **P**, г/мл;

$\Delta I_{ct}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XI$  в досліді з розчином робочого стандартного зразка **P**, відн. од.;

$\Delta I_{xl}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XI$  в досліді з розчином досліджуваного зразка **P**, відн. од.;

1000 – об'єм мірної колби, використаної для аналізу, мл;

$\bar{m}$  – середня маса таблетки (n = 20), г;

$m_n$  – маса наважки розтертих таблеток однієї серії, г;

Таблиця 2

**Результати кількісного визначення рутину в таблетках „Аскорутин”**

**(n = 5, P = 0.95)**

Лікарська форма складу: аскорбінової кислоти 0.05 г рутину 0.05 г	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
Рутину 0.0475*	0.0465	$\bar{X} = 0.0481$
	0.0474	$S = \pm 1.1 \cdot 10^{-3}$
	0.0494	$S_{\bar{X}} = \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$
	0.0484	$\Delta \bar{X} = \pm 1.4 \cdot 10^{-3}$
	0.0487	$S_r = \pm 2.4 \%$
		$\delta = + 1.2 \%$

Примітка. \* вміст встановлено за методикою [14]

*Приготування робочого стандартного розчину кверцетину 80 мкг/мл.* Розчиняють 0.8000 г кверцетину в мірній колбі місткістю 1000 мл з додаванням 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. Об'єм розчину доводять до позначки бідистильованою водою при 20°C. 10.00 мл одержаного розчину переносять в мірну колбу на 100 мл, додають 5 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду і об'єм розчину доводять до позначки



бідистильованою водою. Розчин придатний до застосування протягом доби.

*Методика кількісного визначення кверцетину в лікарській формі „Гранули кверцетину” в пакетах по 2 г.* Біля 2 г гранул кверцетину (точна наважка) вносять у мірну колбу місткістю 1000 мл, розчиняють у 250 мл бідистильованої води, додають 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду та доводять об'єм водою до позначки при 20°C. Паралельно готують об'ємно-ваговим методом розчин робочого стандартного зразка **KB** з концентрацією 80 мкг/мл на бідистильованій воді з додаванням 50 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду. У кварцову кювету послідовно приливають 1.5 мл розчину  $H_2L$ , 5 мл 0.1 М розчин натрію гідроксиду, 1.25 мл бідистильованої води, 0.25 мл 5%-вого розчину  $H_2O_2$  та 1.5 мл розчину кверцетину, виготовленого із гранул. Далі виконують аналіз, як при визначенні вмісту рутину. Вміст кверцетину в г на пакет (X) розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot \Delta I_{xl} \cdot 1000 \cdot \overline{m}}{\Delta I_{ст} \cdot m_n},$$

де C – концентрація розчину робочого стандартного зразка **KB**, г/мл;

$\Delta I_{ст}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XЛ$  в досліді з розчином робочого стандартного зразка **KB**, відн. од.;

$\Delta I_{xl}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XЛ$  в досліді з розчином досліджуваного зразка **KB**, відн. од.;

1000 – об'єм мірної колби, використаної для аналізу, мл;

$\bar{m}$  – середня маса вмістимого пакету ( $n = 20$ ), г;

$m_n$  – маса наважки гранул однієї серії, г;

Таблиця 3

### Результати кількісного визначення кверцетину в лікарській формі

#### „Гранули кверцетину” ( $n = 5$ , $P = 0.95$ )

Лікарська форма	Знайдено, г	Метрологічні характеристики
кверцетину 0.0811*	0.08165	$\bar{X} = 0.0808$
	0.08085	$S = \pm 6 \cdot 10^{-4}$
	0.08025	$S_{\bar{X}} = \pm 2.5 \cdot 10^{-4}$
	0.08035	$\Delta \bar{X} = \pm 7 \cdot 10^{-4}$
	0.0810	$S_r = \pm 0,7 \%$ $\delta = - 0.4 \%$

Примітка. \*точний вміст встановлено за методикою [15]

*Приготування розчину стандартного зразка дигідрокверцетину 3 мкг/мл.* Близько 0.3000 г дигідрокверцетину (точна наважка) розчиняють в мірній колбі місткістю 100 мл. Об'єм розчину доводять до позначки 96%етанолом при 20°C. Одержаний розчин точно розбавляють у 1000 разів 96% етанолом. Розчин придатний до застосування протягом 1 місяця.

Методика кількісного визначення дигідрокверцетину в модельних етанольних розчинах. У кварцову кювету послідовно приливають 1.5 мл розчину  $H_2L$ , 5 мл 0.1 М розчин натрію гідроксиду, 2.25 мл бідистильованої води, 0.25 мл 5%-вого розчину  $H_2O_2$  та 0.5 мл розчину дигідрокверцетину. Далі виконують аналіз, як при визначенні вмісту рутину. Вміст дигідрокверцетину розраховують за формулою:

$$X = \frac{C \cdot \Delta I_{xl}}{\Delta I_{ct}},$$

де  $C$  – концентрація розчину порівняння робочого стандартного зразка **ДКВ**, мкг в 1 мл кінцевого об'єму;

$\Delta I_{ct}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XI$  в досліді з розчином робочого стандартного зразка **ДКВ**, відн. од.;

$\Delta I_{xl}$  – зменшення максимальної інтенсивності  $XI$  в досліді з розчином досліджуваного зразка **ДКВ**, відн. од.;

Таблиця 4

**Результати визначення дигідрокверцетину методом хемілюмінесценції в етанольних розчинах (n = 5, P = 0.95)**

Уведено <b>ДКВ</b> , мкг/мл	Знайдено <b>ДКВ</b> , мкг/мл	Метрологічні характеристики
0.1510	0.1510	$\bar{X} = 0.1516$
0.1510	0.1525	$S = \pm 1.2 \cdot 10^{-3}$
0.1510	0.1530	

0.1510	0.1500	$S_{\bar{X}} = \pm 0.5 \cdot 10^{-3}$
0.1510	0.1515	$\Delta \bar{X} = \pm 1.5 \cdot 10^{-3}$
		$S_r = \pm 0.8 \%$
		$\delta = + 0.3 \%$

Отже, як видно з наведених даних, результати визначення характеризуються задовільною репродуктивністю – відносна помилка не перевищує  $\pm 2.4 \%$ . Нижня межа визначуваних концентрацій  $C_n$  становить для **P** –  $5.5 \cdot 10^{-7}$  М, для **KB** –  $7.7 \cdot 10^{-6}$  М, для **ДКВ** –  $3.0 \cdot 10^{-8}$  М. За інгібуючою здатністю досліджувані флавоноїди можна розташувати в ряд: **ДКВ** > **P** > **KB**.

#### *Висновки*

1. Вивчено інгібаторний вплив рутину, кверцетину та дигідрокверцетину на хемілюмінесцентну реакцію окиснення люмінолу гідроген пероксидом у лужному середовищі в присутності гемоглобіну.
2. Опрацьовано методики кількісного визначення рутину, кверцетину та дигідрокверцетину в субстанції та лікарських формах методом хемілюмінесценції.

#### ЛІТЕРАТУРА:

1. Белая Н.И., Филиппенко Т.А., Николаевский А.Н. и др. Особенности хемилюминесценции при ингибированном растительными фенолами

окислении органических веществ // Теорет. и эксперим. химия. – 2003. – Т. 39, № 3. – с. 161 –166.

2. Dawidowicz Andrzej L., Wianowska Dorota, Gawdjik Jan, Smolarz Danuta H. Optimization of ASE condition for the HPLS determination of rutin and isoquercitrin in Sambucus nigra L. // J. Liq. Chromatogr. and Relat. Technol. – 2003. – V. 26, № 14. – P. 2381 – 2397.
3. Дейнека В.И., Григорьев А.М., Староверов В.М. ВЭЖХ в исследовании флавоноидов. Определение рутина // Хим.- фарм. журн. – 2004. – Т. 38, № 9. – с. 23 –25.
4. Bao Xiaoyu, Zhu Zhiwei, Li Nan-Qiang, Chen Jianguo Electrochemical studies of rutin interacting with hemoglobin and determination of hemoglobin // Talanta. – 2001. – V. 54, № 4. – P. 591 – 596.
5. Chen Gang, Zhang Hongwei, Ye Jiannong Determination of rutin and quercetin in plants by capillary electrophoresis with electrochemical detection // Anal. Chim. acta. – 2000. – V. 423, № 1. – P. 69 – 76.
6. Габричидзе О.А., Шавгулидзе В.В., Нижарадзе Н.М. Полярографическое определение рутина и кверцетина // Georg. Eng. News. – 2002. – № 1. – с. 99 – 101.
7. Kang Jingwan, Lu Xiaoquan, Zeng Hongjuan, Liu Hongde, Lu Baoqiang Investigation of the electrochemistry of rutin and its analytical application // Anal. Lett. – 2002. – V. 35, № 4. – P. 677 – 686.

8. Максютіна Н.П., Пилипчук Л.Б. Використання методу гель-хроматографії для вивчення взаємовпливу кверцетину, пектину і глюкози в штучних сумішах // Фармац. журн. – 1992. – № 1. – с. 85 – 86.
9. Луковская Н.М., Чмиленко Ф.А. Определение микроколичеств тиаминa, рибофлавина, фолиевой и аскорбиновой кислот, рутина, викасола по ингибированию хемилуминесценции // Укр. хим. журн. – 1973. – Т. 39, № 6. – с. 603 –609.
10. Song Zhenghua, Hou Shuang Sensitive determination of sub-nanogram amounts of rutin by its inhibition on chemiluminescence with immobilized reagents // Talanta. – 2002. – V. 57, № 1. – P. 59 – 67.
11. He C., Cui H., Zhao X., Zhao H., Zhao G. Determination of rutin by flow injection with inhibited chemiluminescence detection // Anal. Lett. – 1999. – 32, № 14. – P. 2751 – 2759.
12. Song Zhenghua, Wang Lin Chemiluminescence investigation of detection of rutin in medicine and human urine using controlled-reagent-release technology // J. Agr. and Food Chem. – 2001. – V. 49, № 12. – P. 5697 – 5701.
13. Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю. Визначення рутину в таблетках „Аскорутин” методом хемілюмінесценції // Матеріали ІІІ Міжнар. наук. – практичн. конф. „Динаміка наукових досліджень’2004”. – Том 69. – 2004. – с. 12 –14.

14.ВФС 42У – 4 – 1039 – 98; зміни; ДФУ 2.9.1. Аскорутин, таблетки № 10.

15.ВФС 42У – 4 – 579 – 97. Гранули кверцетину 2 г.

Резюме

Блажеєвський М.Є., Бондаренко Н.Ю.

### **Кількісне визначення флавоноїдів хемілюмінесцентним методом в лікарських формах**

Розроблені методики хемілюмінесцентного визначення рутину, кверцетину та дигідрокверцетину в субстанціях та лікарських формах, що ґрунтуються на інгібуванні реакції хемілюмінесцентного окиснення люмінолу гідроген пероксидом в присутності каталізатору – гемоглобіну. Відносне стандартне відхилення не перевищує  $\pm 2.4 \%$ . Нижня межа визначуваних концентрацій становить: для рутину –  $5.5 \cdot 10^{-7}$  М, для кверцетину –  $7.7 \cdot 10^{-6}$  М, для дигідрокверцетину –  $3.0 \cdot 10^{-8}$  М.

Резюме

Блажеевский Н.Е., Бондаренко Н.Ю.

### **Количественное определение флавоноидов хемилуминесцентным методом в лекарственных формах**

Разработаны методики хемилуминесцентного определения рутину, кверцетина и дигидрокверцетина в субстанциях и лекарственных формах, основанные на ингибировании реакции хемилуминесцентного окисления

люминола пероксидом водорода в присутствии гемоглобина. Относительное стандартное отклонение не превышает  $\pm 2.4 \%$ . Нижняя граница определяемых концентраций составляет: для рутина –  $5.5 \cdot 10^{-7}$  М, для кверцетина –  $7.7 \cdot 10^{-6}$  М, для дигидрокверцетина –  $3.0 \cdot 10^{-8}$  М.

## Summary

Blazheyevskiy M.Y., Bondarenko N.U.

### **Determination of flavonoids in drug preparations by the inhibition of chemiluminescence**

The chemiluminescence method of rutin, quercetin and dihydroquercetin determination in substance and different forms based on reaction of inhibition of chemiluminescent oxidation of luminol by hydrogen peroxide in the presence of blood hemoglobin have been elaborated. The typical relative standard deviation is  $\pm 2.4 \%$ . A lower limit of determining concentration is  $5.5 \cdot 10^{-7}$  М (rutin),  $7.7 \cdot 10^{-6}$  М (quercetin) and  $3.0 \cdot 10^{-8}$  М (dihydroquercetin).