

## ДОСЛІДЖЕННЯ З ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКІСНОГО ВМІСТУ КВЕРЦЕТИНУ В КОМБІНОВАНОМУ ГЕЛІ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ПРОМЕНЕВИХ УШКОДЖЕНЬ ШКІРИ

**Вступ.** Підвищений інтерес до фітотерапії можна пояснити переважно її відносною нешкідливістю та ефективністю, а також нижчою вартістю лікарських препаратів, отриманих із рослинної сировини, порівняно із синтетичними засобами. З огляду на це, в результаті проведення експериментальних досліджень ми розробили технологію комплексної переробки очитку великого трави з метою одержання соку і водного екстракту з вичавок після віджимання соку та дослідили показники їх якості.

**Мета дослідження** – провести експериментальні дослідження з розробки методик визначення кількісного вмісту кверцетину в комбінованому гелі під умовною назвою “Біоседум плюс” для лікування променевих ушкоджень шкіри.

**Методи дослідження.** Об'єктами дослідження стали модельні зразки комбінованого гелю. У роботі використовували ТШХ-пластинки із шаром силікагелю та флуоресцентним індикатором  $F_{254}$  (с. НХ04954354, “Merk”, Німеччина), стандартний зразок кверцетину, спектрофотометр “Evolution 60s” (“Thermo Fisher Scientific”, США), аналітичні ваги “AXIS” (Польща), мірний посуд класу А і реактиви, що відповідають вимогам Державної Фармакопеї України (ДФУ).

**Результати й обговорення.** Для опрацювання методики кількісного визначення кверцетину в досліджуваному гелі методом абсорбційної спектрофотометрії у видимій ділянці було обрано інтенсивно виражений максимум поглинання речовини при довжині хвилі 438 нм після проведення реакції з борною кислотою. Специфічність методики доведена утворенням забарвленого комплексу кверцетину з борною кислотою за наявності суміші мурашиної та оцтової кислот. Прецизійність експериментальних результатів характеризувалася низьким стандартним відхиленням у досліджуваному діапазоні концентрацій кверцетину ( $RSD=0,46\%$ ), а систематична похибка перебувала на рівні  $0,01\%$ , коефіцієнт кореляції запропонованої методики  $r=0,9995$ . При вивченні робастності методики встановлено, що стабільність поглинання розчинів у часі спостерігається через 30 хв і розчини стабільні впродовж 60 хв.

**Висновки.** Розроблено методику спектрофотометричного у видимій ділянці кількісного визначення кверцетину в гелі після реакції утворення комплексу з борною кислотою при довжині хвилі 438 нм. За такими валідаційними характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність та робастність, методика є коректною (з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту  $+5,0\%$ ).

КЛЮЧОВІ СЛОВА: комбінований гель; кверцетин; кількісне визначення; променеві ушкодження шкіри.

ВСТУП. Враховуючи підвищений інтерес до фітотерапії, який можна пояснити переважно її відносною нешкідливістю та ефективністю, а також нижчою вартістю лікарських препаратів, отриманих із рослинної сировини, порівняно із синтетичними засобами [1–3], в результаті проведення експериментальних досліджень ми розробили технологію комплексної переробки очитку великого трави [4, 5] з метою одержання соку і водного екстракту з вичавок після віджимання соку та дослідили показники їх якості [6, 7].

Мета дослідження – провести експериментальні дослідження з розробки методик визна-

чення кількісного вмісту кверцетину в комбінованому гелі під умовною назвою “Біоседум плюс” для лікування променевих ушкоджень шкіри.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Об'єктами дослідження стали модельні зразки комбінованого гелю. У роботі використовували ТШХ-пластинки із шаром силікагелю та флуоресцентним індикатором  $F_{254}$  (с. НХ04954354, “Merk”, Німеччина), стандартний зразок (СЗ) кверцетину, спектрофотометр “Evolution 60s” (“Thermo Fisher Scientific”, США), аналітичні ваги “AXIS” (Польща), мірний посуд класу А і реактиви, що відповідають вимогам Державної Фармакопеї України (ДФУ) [8].

© О. І. Бурбан, Л. І. Вишневська, 2022.

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Для кількісного визначення кверцетину в комбінованому гелі використовували фармакопейну методику визначення вмісту флавоноїдів у лікарській рослинній сировині [9, 10]. Методика ґрунтується на утворенні речовинами, що містять у 5 положенні гідроксильну групу, флавоноїдної будови, комплексної сполуки з борною кислотою за наявності щавлевої кислоти. Фармакопейна методика рекомендована для визначення суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид у лікарській рослинній сировині “Глоду листя та квітки”. Оптичну густина забарвленого комплексу гіперозиду з борною кислотою визначають при довжині хвилі 410 нм з урахуванням питомого показника поглинання гіперозиду 405 [5].

**Вихідний розчин.** У конічну колбу місткістю 100 мл поміщають 0,500 г гелю, додають 40 мл 96 % етанолу та кип'яють 30 хв зі зворотним холодильником на водяній бані. Охолоджують. Розчин кількісно переносять у мірну колбу місткістю 50 мл та доводять до позначки 96 % етанолом, перемішують. У мірну колбу місткістю 20 мл поміщають 2 мл отриманого розчину та доводять до позначки 96 % етанолом.

**Випробовуваний розчин.** Упарюють насуху 5 мл вихідного розчину. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р – оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують випаровувальну чашку 3 мл суміші метанол – оцтова кислота безводна Р (10:100), одержаний розчин поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл. До отриманого розчину додають 10 мл розчину, що містить 25,0 г/л борної кислоти Р, 20,0 г/л щавлевої кислоти Р у мурашиній кислоті безводній Р, і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25 мл.

**Компенсаційний розчин.** Упарюють насуху 5 мл вихідного розчину. Одержаний залишок за допомогою 8 мл суміші метанол Р – оцтова кислота безводна Р (10:100) переносять у мірну колбу місткістю 25 мл. Обполіскують випаровувальну чашку 3 мл суміші метанол – оцтова кислота безводна Р (10:100), одержаний розчин поміщають у ту саму мірну колбу місткістю 25 мл.

До отриманого розчину додають 10 мл мурашиної кислоти безводної і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25 мл.

Оптичну густина випробовуваного розчину вимірюють відносно компенсаційного розчину через 30 хв після приготування при довжині хвилі 438 нм.

**Приготування розчину порівняння.**

**Вихідний розчин.** Стандартний зразок кверцетину в кількості 0,020 г розчиняють при нагріванні в 50 мл 96 % етанолу. В мірну колбу місткістю 20 мл поміщають 5 мл розчину та доводять до позначки сумішшю метанол Р – оцтова кислота безводна Р (10:100).

**Випробовуваний розчин.** У мірну колбу місткістю 25 мл переносять 1 мл вихідного розчину, додають 10 мл розчину, що містить 25,0 г/л борної кислоти Р, 20,0 г/л щавлевої кислоти Р у мурашиній кислоті безводній Р, і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25 мл.

**Компенсаційний розчин.** У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 1 мл вихідного розчину, додають 10 мл мурашиної кислоти безводної і доводять об'єм розчину оцтовою кислотою безводною Р до 25 мл.

Оптичну густина випробовуваного розчину вимірюють відносно компенсаційного розчину через 30 хв після приготування при довжині хвилі 438 нм.

Вміст кверцетину, у відсотках, обчислюють за формулою:

$$x, \% = \frac{A_1 \cdot 50,0 \cdot 20,0 \cdot 25,0 \cdot m_0 \cdot 5,0 \cdot 1,0 \cdot 100}{A_0 \cdot m_1 \cdot 2,0 \cdot 5,0 \cdot 50,0 \cdot 20,0 \cdot 25,0}$$

де  $A_1$  – оптична густина випробовуваного розчину гелю при довжині хвилі 438 нм;

$m_1$  – маса наважки гелю, г;

$A_0$  – оптична густина розчину порівняння СЗ кверцетину при довжині хвилі 438 нм;

$m_0$  – маса наважки СЗ кверцетину, г.

Вміст кверцетину повинен становити від 3,8 до 4,2 %.

Результати кількісного визначення кверцетину в досліджуваному комбінованому гелі та метрологічні характеристики наведено в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати кількісного визначення кверцетину в гелі

Наважка гелю, г	Оптична густина досліджуваного розчину	Оптична густина розчину порівняння	Вміст кверцетину, %	Метрологічна характеристика
0,4939	0,7762	0,3762	4,07	$\bar{x}=4,05$ $S^2=0,0078$ $S=0,0882$ $S_x=0,0360$ $\Delta x=0,2268$ $\Delta \bar{x}=0,0926$ $\bar{\varepsilon}=2,29 \%$ $\varepsilon=5,61 \%$
0,5503	0,8873		4,18	
0,5038	0,7645		3,93	
0,4971	0,7608		3,97	
0,5029	0,7908		4,08	
0,5011	0,7821		4,05	

*Специфічність* методики кількісного визначення доводили шляхом порівняння положення максимумів інтенсивності оптичної густини випробовуваного розчину і розчину порівняння при визначенні спектрофотометричним методом після реакції з кислотою борною за присутності кислоти щавлевої. Забарвлений продукт характеризується наявністю максимуму поглинання при довжині хвилі 438 нм (рис. 1).

На основі даних рисунка 1 встановлено, що інші активні фармацевтичні інгредієнти і допоміжні речовини гелю не впливають на положення максимуму поглинання кверцетину.

*Селективність* спектрофотометричного аналізу кверцетину забезпечували, використовуючи груповий реактив, який застосовують під час аналізу сполук флавоноїдної будови, а також реакцією із сумішшю борної та щавлевої кислот (див. рис. 1).

При визначенні *лінійності* вимірювали оптичну густину (3 рази для кожного розчину з вийманням кювети) розчину СЗ кверцетину в концентрації 80–120 % від обраної за методикою. Відносно середніх значень оптичної густини для кожного з 9 розчинів до обраної концентрації будували градувальний графік залежності (рис. 2).

Оптичну густину отриманих модельних розчинів визначали на спектрофотометрі при довжині хвилі 438 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Результати досліджень наведено в таблиці 2.

Критерієм прийнятності є лінійна залежність між концентрацією кверцетину в гелі й оптичною густиною та коефіцієнтом кореляції не менше 0,9995.

Правильність і прецизійність методики визначали на основі результатів, отриманих при визначенні лінійності (табл. 3).

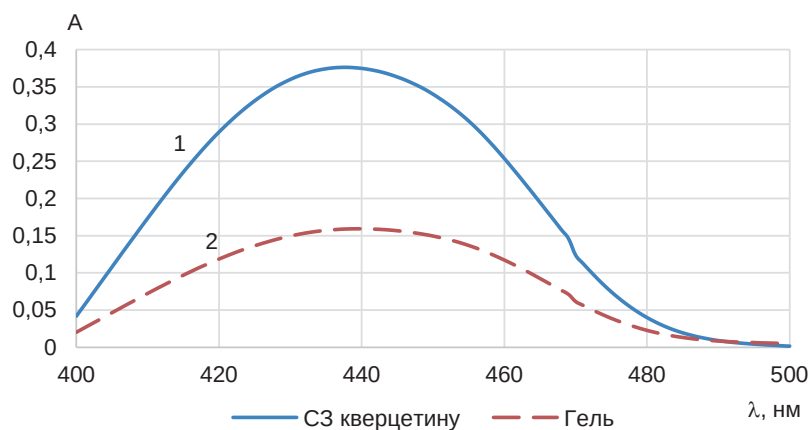


Рис. 1. Абсорбційні спектри поглинання: 1 – стандартного зразка кверцетину; 2 – гелю.

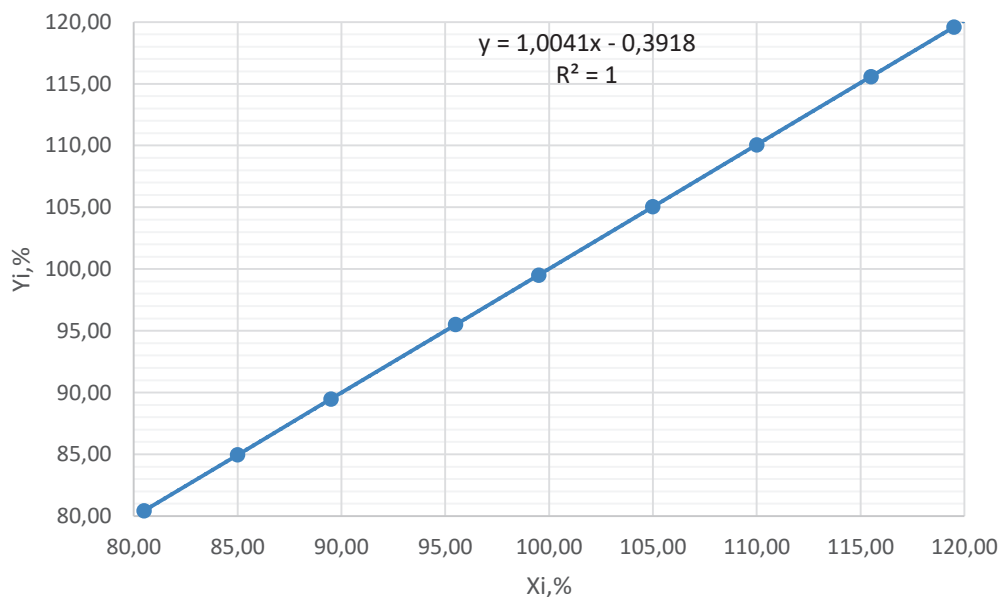


Рис. 2. Градувальний графік залежності оптичної густини від концентрації кверцетину після реакції з борною кислотою.

Таблиця 2 – Результати досліджень оптичної густини модельних розчинів

Відсоток від робочої концентрації	Маса наважки кверцетину, г	Оптична густина
80,50	0,0161	0,3017
85,00	0,0170	0,3204
89,50	0,0179	0,3395
95,50	0,0191	0,3579
99,50	0,0199	0,3768
105,00	0,0210	0,3954
110,00	0,0220	0,4145
115,50	0,0231	0,4333
119,50	0,0239	0,4523
Середнє=100,01 %	RSD=0,45 %	

Таблиця 3 – Результати дослідження прецизійності та правильності методики кількісного визначення кверцетину

Параметр	Значення	Критерій	Висновок	
Прецизійність	$\Delta Z$	0,46	$\leq 1,60$	Витримується
Правильність	$ Z_{сер} - 100 $	0,01	$\leq 0,51$	Витримується

Як видно з даних таблиці 3, розраховані критерії практичної незначущості не перевищують максимально допустимої невизначеності аналізу.

Отже, в результаті проведення експериментальних досліджень розроблено методику визначення кверцетину в багатокомпонентному гелі та визначено її коректність за такими валідаційними характеристиками, як лінійність, прецизійність, правильність і робасність.

**ВИСНОВКИ.** 1. Розроблено методику спектрофотометричного у видимій ділянці кількісного визначення кверцетину в гелі після реакції утворення комплексу з борною кислотою при довжині хвилі 438 нм.

2. За визначеними валідаційними характеристиками, такими, як лінійність, прецизійність, правильність та робасність, методика є коректною (з використанням критеріїв прийнятності для допусків вмісту +5,0 %).

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шматенко О. П. Фітотерапія як допоміжний метод при гострих респіраторних захворюваннях / О. П. Шматенко // Сучасні досягнення фармацевтичної технології : матеріали ІХ Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф., присвяченої 45-річчю кафедри аптечної технології ліків (Харків, 11–12 листоп. 2021 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2021. – С. 237–242.

2. Гарна С. В. Рациональне використання лікарської рослинної сировини / С. В. Гарна // Зб. наук. праць співроб. НМАПО ім. П. Л. Шупика. – 2015. – Вип. 24 (5). – С. 306–311.

3. Фітотерапія: сучасні тенденції до використання в лікарській практиці та перспективи подальшого розвитку (огляд літератури та результати власних досліджень) / В. А. Туманов, В. В. Поканевич, Т. П. Гарник [та ін.] // Фітотерапія. – 2012. – № 1. – С. 4–11.

4. Тимофєєва С. В. Очиток великий – перспективна рослина для створення нових лікарських фітозасобів / С. В. Тимофєєва, І. О. Журавель // Технологічні та біофармацевтичні аспекти створення лікарських препаратів різної направленості дії : ма-

теріали ІІ Міжнар. наук.-практ. Інтернет-конф. (Харків, 12–13 листоп. 2015 р.). – Х. : Вид-во НФаУ, 2015. – С. 237.

5. Атаунех Х. Е. Біогенні стимулятори і використання алое деревовидного у фармації / Х. Е. Атаунех, К. С. Пугачова // Сучасні тенденції у медичних та фармацевтичних науках : зб. тез наук. робіт учасн. Міжнар. наук.-практ. конф. (Київ, 2–3 груд. 2016 р.). – К. : Київський медичний науковий центр, 2016. – С. 99–101.

6. Бурбан О. І. Дослідження з розробки технології соку очитку великого як біогенного стимулятора для одержання лікарських засобів / О. І. Бурбан, Л. І. Вишневська, Т. М. Зубченко // Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. – 2021. – № 1. – С. 14–20.

7. Бурбан О. І. Розроблення технології біогенного стимулятора на основі трави та вичавок очитку великого (*Sedum maximum* L.) / О. І. Бурбан, Л. І. Вишневська, Т. М. Зубченко // Фармац. журн. – 2021. – № 2. – С. 48–57.

8. Державна Фармакопея України : в 3 т. / Державне підприємство "Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів". – Харків, 2014. – Т. 3. – 732 с.

9. Quercetin as a tyrosinase inhibitor: inhibitory activity, conformational changes and mechanism / M. Fan,

G. Zhang, X. Hu [et al.] // Food Res. Int. – 2017. – **100**. – P. 226–233.

10. Ковалевська І. В. Визначення фізико-хімічних характеристик кверцетину / І. В. Ковалевська // Актуальні питання фармац. і мед. науки та практики. – 2014. – № 1. – С. 9–11.

## REFERENCES

1. Shmatenko, O.P. (2021). Phytotherapy as an auxiliary method in acute respiratory diseases. Modern achievements of pharmaceutical technology: mater. IX International Scientific-Practical Internet-Conference dedicated to the 45th anniversary of the Department of Pharmaceutical Technology of Medicines. November 11-12, 2021. Kharkiv: Published by NUPh [in Ukrainian].

2. Garna, S.V. (2015). Rational use of medicinal plant raw materials. *Collection of Scientific Works of NMAPE named after P. L. Shupyk*, 24 (5), 306-311 [in Ukrainian].

3. Tumanov, V.A. (2012). Phytotherapy: current trends in medical practice and prospects for further development (literature review and results of own research). *Phytotherapy*, 1, 4-11 [in Ukrainian].

4. Timofeeva, S.V., & Zhuravel, I.O. (2015). Sedum maximum- a promising plant for the creation of new medicinal phytopreparations. *Technological and Biopharmaceutical Aspects of the Creation of Drugs of Different Directions of Action: Materials of the II International Scientific-Practical Internet Conference*. Kharkiv, November 12-13. Kharkiv: NUPh Publishing House [in Ukrainian].

5. Atauneh, H.E., & Pugacheva, K.S. (2016). Biogenic stimulants and the use of aloe vera in pharmacy. Modern

trends in medical and pharmaceutical sciences: *Collection of Science Works Thesis of International Scientific-Practical Conference*. December 2-3. Kyiv: Kyiv Medical Research Center [in Ukrainian].

6. Burban, O.I., Vishnevskaya, L.I., & Zubchenko, T.M. (2021). Research on the development of technology of stonecrop juice as a biogenic stimulant for drugs. *Management, Economics and Quality Assurance in Pharmacy*, 1, 14-20 [in Ukrainian].

7. Burban, O.I., Vishnevskaya, L.I., & Zubchenko, T.M. (2021). Development of biogenic stimulator technology based on grass and pomace of large stonecrop (*Sedum maximum* L.). *Pharmaceutical Journal*, 76 (2), 48-57.

8. Fan, M., Zhang, G., & Hu, X. (2017). Quercetin as a tyrosinase inhibitor: inhibitory activity, conformational changes and mechanism. *Food Res. Int.*, 100, 226-233.

9. Kovalevskaya, I.V. (2014). Determination of physicochemical characteristics of quercetin. *Current Issues Pharmaceutical and Medical Science and Practice*, 1, 9-11 [in Ukrainian].

10. *State Pharmacopoeia of Ukraine: in 3 volumes*. State Enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeial Center for Quality of Medicines". Pharmacopoeial Center of Quality of Medicines [in Ukrainian].

O. I. Burban, L. I. Vyshnevskaya

NATIONAL UNIVERSITY OF PHARMACY, KHARKIV

## RESEARCH ON DETERMINATION OF QUANTITATIVE QUERCETIN CONTENT IN COMBINED GEL FOR TREATMENT OF RADIATION SKIN DAMAGE

### Summary

**Introduction.** Increased interest in phytotherapy can be explained mainly by its relative safety and effectiveness, as well as the lower cost of drugs derived from herbal raw materials, compared to synthetic remedies. With this in mind, as a result of experimental research, we have developed a technology for complex processing of large grass stonecrops in order to obtain juice and aqueous extract from the pomace after squeezing the juice and investigated their quality indicators.

**The aim of the study** – to conduct experimental research to develop methods for determining the quantitative content of quercetin in the combined gel under the conditional name "Biosedum Plus" for the treatment of radiation damage to the skin.

**Research Methods.** The objects of the study were model samples of the combined gel. TLC plates with a layer of silica gel and a fluorescent indicator  $F_{254}$  (s. HX04954354, Merk, Germany), a standard sample of quercetin, Evolution 60s spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA), analytical scales "AXIS" (Poland), measuring

instruments of class A and reagents that meet the requirements of the State Pharmacopoeia of Ukraine (SPhU) were used.

**Results and Discussion.** An intensely expressed maximum absorption of the substance at a wavelength of 438 nm after the reaction with boric acid was chosen to develop the method of quantitative determination of quercetin in the studied gel by the method of absorption spectrophotometry in the visible region. The specificity of the technique was proved by the formation of a coloured complex of quercetin with boric acid in the presence of a mixture of formic and acetic acids. The precision of the experimental results was characterized by low standard deviation in the studied range of quercetin concentrations (RSD = 0.46 %), and the systematic error was 0.01 %, the correlation coefficient of the proposed method  $r = 0.9995$ . When studying the robustness of the method, it was found that the stability of the absorption of solutions over time is observed after 30 minutes and the solutions are stable for 60 minutes.

**Conclusions.** A method of spectrophotometric quantitative determination of quercetin in a gel after the reaction of formation of a complex with boric acid at a wavelength of 438 nm was developed. According to such validation characteristics as linearity, precision, accuracy and robustness, the method is correct (using eligibility criteria for content tolerances + 5.0 %).

KEY WORDS: **combined gel; quercetin; quantification; radiation damage to the skin.**

Отримано 03.02.22

Адреса для листування: Л. І. Вишнеvsька, Національний фармацевтичний університет, вул. Пушкінська, 53, Харків, 61002, Україна, e-mail: liliavyshnevsk@gmail.com.