

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О. О.
БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
КАФЕДРА АНАЛІТИЧНОЇ, ФІЗИЧНОЇ ТА КОЛОЇДНОЇ ХІМІЇ

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА
на тему «ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ
КВЕРЦЕТИНУ У ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБАХ ТА ДІЄТИЧНИХ
ДОБАВКАХ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ»

Виконала здобувачка вищої освіти 3-го курсу,
групи 128Б3А

напряму підготовки 226 «Охорона здоров'я»
освітня програма «Фармація»

Головко Вікторія Олексіївна

Керівниця: завідувачка кафедри аналітичної,
фізичної та колоїдної хімії, кандидатка
хімічних наук, доцентка

Зайцева Галина Миколаївна

Рецензентка: к.х.н., доцентка

Глушаченко Ольга Олександрівна

Київ 2025

ЗМІСТ

	Перелік умовних позначень, символів, скорочень і термінів.	4
	ВСТУП	5
	ОСНОВНА ЧАСТИНА. Розділ 1. Огляд літератури	8
1.1.	Застосування лікарських засобів, до складу який входить кверцетин	8
1.2.	Фізико-хімічні властивості кверцетину	9
1.3.	Механізм та фармакологічна дія кверцетину та кверцетину дигідрату	10
1.4.	Методи ідентифікації та визначення кверцетину	13
1.5.	Хроматографічні методи ідентифікації та визначення кверцетину	15
	Розділ 2. Експериментальна частина.	19
2.1.	Об'єкти дослідження	19
2.2.	Реагенти та приготування розчинів	20
2.3	Прилади	22
2.4	Методики дослідження	23
2.4.1.	Методика визначення вмісту кверцетину у розчинах	23
2.4.2.	Пробопідготовка	24
2.4.3	Оптимізація умов динамічного концентрування кверцетину з модельних розчинів та його елюювання	25
	Розділ 3. Результати дослідження та обговорення	26
3.1.	Підбір градієнтного режиму	26
3.2.	Вибір оптимальних умов ідентифікація кверцетину	28
3.3.	Залежність хроматографічних параметрів від концентрації кверцетину	29
3.4.	Дослідження сорбційних характеристик запропонованих ТФЕ в динамічних умовах	30

3.5.	Оптимізація умов десорбції кверцитину	32
3.6.	Ідентифікація та визначення кверцетину у зразку	34
	Висновки.	38
	СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	39
	ДОДАТКИ	44
	Анотація (Summary)	46

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

ВКР – випускна кваліфікаційна робота.

ТФЕ – твердофазна екстракція.

ТЕ - твердофазний екстрагент

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія.

ОФ-ВЕРХ - обернено фазова високоефективна рідинна хроматографія

GC-MS - газова хроматографія з мас-спектрометрією

НМУ – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця.

УФ - ультра фіолетова частина спектру.

ГГ – градувальний графік.

КАС - кватенарна амонійна сіль.

SiO₂-C₁₈/КАС - кремнезем із ковалентно-закріпленими групами довголанцюгової кватенарної амонієвої солі

ЛЗ -лікарський засіб

ДД - дієтична добавка

г – грам.

мл – мілілітр.

С⁰ – градуси Цельсія.

ВСТУП

Кверцетин — природний флавоноїд, міститься в багатьох рослинах, тобто є натуральною речовиною, яку можна отримати з їжі або приймати у вигляді добавок. Завдяки своєму природному походженню і численним корисним ефектам, він є привабливим інгредієнтом для використання в складі дієтичних добавок і лікарських засобів, зокрема: антиоксидантній активності, що дозволяє нейтралізувати вільні радикали в організмі; протизапальній, антивірусній та антигістамінній активностям; здатності знижувати рівень холестерину (ЛПНЩ) і тригліцеридів, покращувати ендотеліальну функцію (функцію кровоносних судин), модулювати активність імунної системи; сприяти поліпшенню пам'яті та когнітивних функцій (нейропротекторний ефект), потенційному антипухлинному ефекту тощо.

Зважаючи на великий інтерес до кверцетину впродовж років, набуває великого значення розробка надійних методик його визначення в ЛЗ та ДД. Ідентифікацію та кількісне визначення біологічних активних речовин проводять, як правило, методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [1-5]. Перед хроматографуванням лікарські засоби чи рослинну сировину піддають пробопідготовці з метою відокремлення та/чи концентрування цільового компонента від матриці, і тим самим підвищують точність і чутливість визначення. Для цього застосовують методи екстракції, зокрема, простий у виконання метод твердофазної екстракції (ТФЕ) [6-9]. Відомі наразі патрони для концентрування поліфенольних сполук, наприклад, $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$, не задовільняють сучасним вимогам. Тому однією з актуальних задач дослідників є пошук твердофазних екстрагентів для селективного вилучення поліфенолів, удосконалення і спрощення багатостадійних етапів пробопідготовки.

Актуальність теми: Актуальність визначення вмісту кверцетину у лікарських засобах та дієтичних добавках обумовлена кількома важливими факторами, такими як: ефективність і безпека продукції, контроль якості на

різних етапах виробництва [1,2]. Лікарські засоби та дієтичні добавки повинні містити точну кількість активної речовини для досягнення терапевтичного ефекту. При виробництві лікарських засобів і дієтичних добавок забезпечення стабільності і консистентності складу продуктів є важливою і необхідною складовою визначення кверцетину на всіх етапах виробництва. Регуляторні органи кожної країни мають чіткі вимоги до відповідності нормативним нормам вмісту активних речовин, таких як кверцетин. Необхідно бути впевненим, що вміст кверцетину гарантує безпеку та ефективність його вживання. Важливим етапом є перевірка збереження фізико-хімічних властивостей кверцетину за умов зберігання, температури, світла, вологості.

Таким чином, визначення вмісту кверцетину у лікарських засобах та дієтичних добавках гарантує, що споживач отримає саме ту кількість активної речовини, яка регламентована виробником і здатна забезпечити терапевтичний ефект без ризику побічних ефектів.

Метою роботи було розробити методику визначення кверцетину та способу його ідентифікації методом вискоефективної рідинної хроматографії із застосуванням адсорбенту на основі кремнезему із ковалентно-закріпленими групами кватернарної амонієвої солі ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$) на стадії пробопідготовки.

Для досягнення мети, поставлено наступні **завдання**:

1. Дослідити хіміко-аналітичні характеристики процесу вилучення кверцетину з розчинів за допомогою $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ та порівняти їх з властивостями відомого $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$;
2. Визначити оптимальні умови ідентифікації кверцетину;
3. Дослідити можливість визначення кверцетину в зразках лікарських засобів та дієтичних добавок методом ОФ-ВЕРХ з використанням твердофазної екстракції.
4. Валідувати методику за лінійністю, правильністю та специфічністю.

Новизна та значення одержаних результатів. Розроблено альтернативну методику визначення та ідентифікації кверцетину у лікарських засобах та дієтичних добавках методом ВЕРХ з використанням твєдрофазного екстрагенту на стадії пробопідготовки з метою відокремлення та концентрування кверцетину. Це дозволяє знизити межу визначення кверцетину та відокремити його від інших поліфенолів.

Апробація результатів дослідження:

Результати дослідження представлено на XVII Міжнародній науково-практичній конференції «Scientific trends in the development of education in universities», 24-27 грудня 2024 р., Афіни, Греція (Додаток 1).

Публікації: Зайцева Г.М, Коноплицька О.П., Головка В.О. Ідентифікація та кількісне визначення кверцетину в дієтичних добавках хроматографічним методом // Тези доповідей XVII Міжнародної науково-практичної конференції «Scientific trends in the development of education in universities», 24-27 грудня 2024 р., Афіни, Греція. С.32-33. (Додаток 2)

Структура роботи: загальна кількість сторінок - 47, кількість розділів -3, кількість додатків -2, кількість використаних джерел - 36, рисунків 9, таблиць - 8.

Розділ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Застосування лікарських засобів, до складу який входить кверцетин.

Фенольні сполуки - є представниками природних біологічно активних хімічних сполук. Феноли в кількості до 7% (як глікозиди чи у вигляді простих сполук) містяться у переважній більшості лікарської рослинної сировини [3-6, 10]. Поліфеноли - це категорія хімічних сполук, у молекулах яких присутні дві чи більше фенольних груп. Поліфеноли - природні сполуки, які у значних кількостях містяться у рослинній сировині. За структурою та специфічними біологічними властивостями їх поділяють на 4 основні групи: лігнани, стилбени (ресвератрол), фенольні кислоти, флавоноїди (кверцетин, катехіни, антиціани). Це досить велика і різноманітна група хімічних сполук. На сьогодні відомо понад 4000 поліфенолів.

Більшість поліфенолів мають потужні антиоксидантні властивості: протидіють впливу вільних радикалів на клітини, тобто сприяють боротьбі клітин з процесами окислення та старіння [11-19], зменшують запалення [13], захищають від деяких видів раку [14], зміцнюють капіляри, захищають від тромбоутворення, покращують травлення та роботу мозку тощо [15].

Велика увага приділяється групі флавоноїдів, назва яких походить від латинського «флавам» - жовтий. Ці пігменти широко поширені в рослинах, що надають жовте забарвлення багатьом квітам, але вони містяться також і в листах, і в коренях, і в плодах. До флавоноїдів в свою чергу відносяться флавоноли та катехіни.

Особливо часто зустрічаються такі представники флавонолів, як кверцетин, кемпферол, мірицетин і їх численні похідні, що відповідають за протипухлинну, протизапальну та протинабрякову дію, стабілізують клітинні мембрани, знижують проникність капілярів, гальмують процес старіння клітин шкіри, міокарда, покращують розумову діяльність [12-20].

До основних джерел кверцетину природного походження відносяться: брусниця, чорна смородина, малина, ожина, журавлина, чорниця, горобина, обліпіха, цибуля, броколі, яблука, чай [10, 12-18].

Кверцетин входить до складу лікарських препаратів, що застосовуються в лікуванні бронхіальної астми, захворювань серцево-судинної системи, опіків, обморожень, запалень, раку молочної залози, товстого кишечника, легень; міститься в косметичних засобах, призначених сповільнювати старіння шкіри та для профілактики атеросклерозу і захворювань суглобів (артрозу, артриту), міститься в деяких БАДах. У вигляді індивідуальної речовини його застосовують як препарат з Р-вітамінною активністю

1.2. Фізико-хімічні властивості кверцетину.

Кверцетин існує у двох формах: дигідрокверцетин та безводний кверцетин (Рис.1)

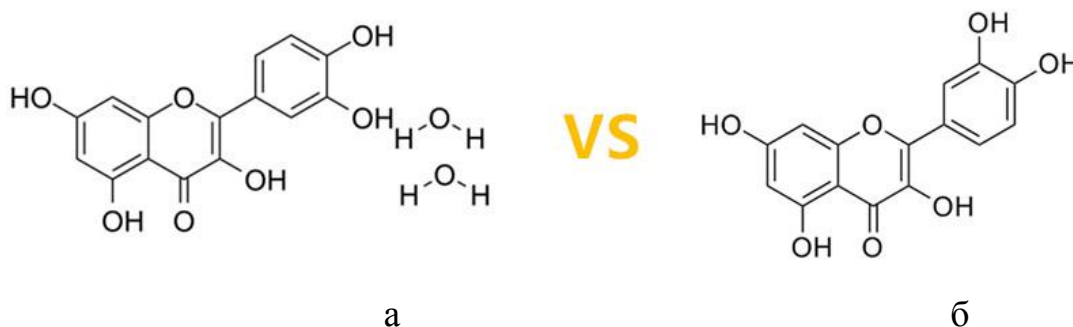


Рис.1. кверцетин дигідрат (а) та кверцетин (б).

Хімічна назва за IUPAC : 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4H-1-бензопіран-4-ондигідрат (Рис.1, а) 2-(3,4-дигідроксифеніл)-3,5,7-тригідрокси-4H-хромен-4-он (Рис.1,б).

Інші назви: мелетін, софоретін

Кверцетин дигідрат, як правило, отримують з з бруньок софори японської. Безводну форма кверцетину називають кверцетин.

Найпоширеніша форма кверцетину - його дигідрат, яка міститься у природних джерелах і дієтичних добавках. Ця форма кверцетину водорозчинна, стабільна, має високу біодоступність. Ці властивості кверцетину дигідратудозволяють краще засвоюватися організмом і є ключовими щодо його застосування у рідкій формі або у вигляді водорозчинної добавки.

Кверцетин безводний менш розчинна форма у воді порівняно з дигідратом кверцетину. Але стабільність та тривальність зберігання безумовно є перевагами кверцетину для створення певних рецептур і застосувань, зокрема, у твердих лікарських формах (таблетки чи капсули). Чи, наприклад, у випадках коли наявність молекул води зменшує його стабільність або ефективність кінцевого продукту, оскільки відсутність води знижує ризик реакцій розкладання.

Основні фізико-хімічні властивості безводного кверцетину представлено у табл. 1.

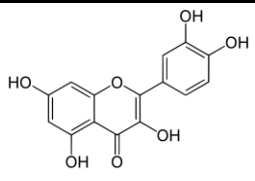

1.3. Механізм та фармакологічна дія кверцетину та кверцетину дигідрату

Кверцетин характеризується ефективними антиоксидантними та протизапальними властивостями [16 -20]. Його потенційні переваги:

Протизапальний ефект: кверцетин пригнічує утворення в організмі молекул, що спричиняють запалення, зокрема за рахунок інгібування різних запальних маркерів, таких як циклооксигеназа (COX) та ліпооксигеназа (LOX).

Антиоксидантні властивості: кверцетин захищає клітини від пошкодження вільними радикалами і, тим самим, сповільнює старіння та розвиток низки захворювань.

Таблиця 1. Основні фізико-хімічні властивості кверцетину.

Молекулярна формула кверцетину	$C_{15}H_{10}O_5$ 
Молярна маса	302,236 г/моль
Зовнішній вигляд	Жовта з зеленуватим відтінком кристалічна речовина 
$T_{пл}$	316°C
Густина	1,799 г/см ³
Розчинність в етанолі	0,345 г/100 мл
Розчинність у оцтовій кислоті	4,35 г/100 мл
Розчинність у гідрофільних розчинниках у нейтральному середовищі	майже не розчинний. При зміні рН розчинність порошку покращується.[16].

Підвищення імунітету: кверцетин має потенціал для підтримки імунної системи та посилення імунної функції.

Серцево-судинна система: кверцетин може знижувати тиск, поліпшувати кровообіг і зменшувати ймовірність серцевих захворювань. Кверцетин позитивно впливає на серцево-судинну систему, покращуючи кровообіг, знижуючи рівень холестерину та зменшуючи ризик розвитку атеросклерозу.

Протиалергійний ефект: кверцетин зменшує симптоми алергії шляхом вивільнення гістаміну, хімічної речовини, пов'язаної з алергічними реакціями.

Антиканцерогенні властивості: кверцетин може мати антиканцерогенний ефект, знижуючи ріст і поширення деяких видів ракових клітин.

Покращення метаболічного здоров'я: Кверцетин може допомогти в нормалізації рівня цукру в крові та зниженні ризику розвитку діабету 2 типу.

Антивірусна дія: Кверцетин демонструє здатність інгібувати реплікацію деяких вірусів, таких як грип і герпес. Результати експериментальних досліджень [17]. демонструють значний протівірусний потенціал кверцетину проти SARS-CoV-2. Кверцетин входить до протоколу Східновірджинської медичної школи (EVSM), де він застосовується при лікуванні усіх клінічних форм коронавірусної хвороби.

Нейропротекторні властивості: Кверцетин має здатність знижувати нейродегенерацію, що може бути корисним для профілактики хвороби Альцгеймера та інших нейродегенеративних захворювань.

Дигідрокверцетин (3,5-дигідрокверцетин або Тріоксид), є похідним кверцетину, і має схожі фармакологічні властивості з основним флавоноїдом, але з деякими відмінностями у механізмі дії. Він є більш стабільною і біодоступною формою кверцетину.

Механізм його дії аналогічний кверцетину [21]:

- ✓ активно нейтралізує вільні радикали та інші молекули, що можуть спричиняти окислення ліпідів, білків і ДНК, тим самим знижуючи ризик розвитку захворювань, пов'язаних з окисним стресом;
- ✓ гальмує активність ферментів, які відповідають за синтез простагландинів і лейкотрієнів, що є основними медіаторами запалення. Цей ефект зменшує запальні процеси в організмі.
- ✓ покращує кровообіг, зміцнює стінки судин, знижує їх проникність і допомагає в нормалізації артеріального тиску.
- ✓ здатен впливати на імунні клітини, зокрема знижувати активацію тучних клітин, що призводить до зменшення алергічних реакцій.

✓ може мати заспокійливу дію на нервову систему завдяки здатності знижувати рівень запальних медіаторів, що є корисним при стресі та неврологічних розладах.

✓ завдяки своїй здатності впливати на рівень глюкози в крові і чутливість до інсуліну, дигідрокверцетин може допомогти в боротьбі з діабетом 2 типу і покращити метаболічне здоров'я в цілому.

Таким чином, кверцетин та дигідрокверцетин є потужними біоактивними з'єднанням з широким спектром фармакологічних ефектів, зокрема антиоксидантними, протизапальними, антиалергічними та кардіопротекторними властивостями. Їх застосування може бути корисним для профілактики та лікування різних захворювань, що пов'язані з окислювальним стресом, запаленнями та порушенням метаболізму.

Рідка форма дигідрокверцетина є більш ефективною, доступною і засвоюванню, ніж кверцетин безводний. Ця форма кверцетину має здатність підвищувати міцність і еластичність судин і капілярів, знижує в'язкість крові. При захворюваннях легенів, печінки, онкології, алергії, ревматизмі, ІХС, септичному ендокардиті, вегетосудинній дистонії дигідрокверцетин має високу ефективність. Окрім цього сприяє омолодженню шкіри і всього організму, ефективний при розумових і фізичних перевантаженнях тощо. За ефектів близький до кверцетину, але перевершує їх по активності.

1.4. Методи ідентифікації та визначення кверцетину

Для визначення вмісту флавоноідів, як правило, застосовують фізико-хімічні методи аналізу, зокрема:

Колориметричний метод базується:

- на реакціях утворення забарвлених комплексних сполук при взаємодії з катіонами деяких металів та реакціях з діазосполуками з утворенням азобарвників. Була запропонована [22] флуориметрична методика визначення кверцетину, яка базується на реєстрації інтенсивності люмінесценції комплексу кверцетину з алюмінієм, межа виявлення становить $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л].

Дані реакції мають велику специфічність, проте мають той недолік, що не дають змогу селективно визначити ту чи іншу сполуку.

- цианідинова проба (проба Шинода) – загальна реакція на флавоноїдні сполуки, що проводиться в присутності концентрованої соляної кислоти і металічного магнію - при відновлення карбонільної групи атомарним воднем в кислому середовищі в присутності металевого магнію спостерігається зміна забарвлення від оранжевого (флавоноли) до фіолетово-червоного забарвлення (флаванони, флавоноли, флаваноноли) [2].

- на реакції з лимонно-борним реактивом (реакція Вільсона-Таубека): 5-оксифлавоноли і 5-оксифлавоноли, взаємодіючи з борною кислотою в присутності лимонної кислоти (реактив Вільсона), утворюють жовте забарвлення з червоною флюоресценцією в УФ-світлі. При заміні лимонної кислоти на щавелеву (реактив Таубека) в УФ-світлі відмічається зелена чи жовта флюоресценція [2].

- 5-оксифлавоноли і 5-оксифлавоноли, взаємодіючи з трьох хлористим стибієм утворюють комплексні сполуки, забарвлені в жовтий чи жовто-оранжевий колір [2].

Спектрофотометричний метод

Метод ґрунтується на вимірі поглинання розчинів флавоноїдів чи розчинів їх забарвлених комплексних з'єднань, отриманих у результаті взаємодії з, наприклад, бор-гідридним, сумішшю HCl - CuOH, ваніліном, за рахунок реакції діазотування тощо [22].

Спектрофотометричні методи не є селективними по відношенню до конкретних флавоноїдів. Проте їх можна використати за отримання даних про сумарну кількість флавоноїдів у рослинній сировині, фітохімічних препаратах [22].

Люмінесцентні та сорбційно-люмінесцентні методи

Чутливість флуориметричного методу у відношенні флавоноїдів є на порядок вищою у порівнянні з спектрофотометричним, що дає можливість

визначати флавоноїди в діапазоні концентрацій 0,05-1 мкг сполуки в 1 мл розчину.

У роботі [23] запропоновано методику визначення кверцетину в лікарських рослинах. Принцип методу базується на реєстрації твердофазної люмінесценції кверцетину у присутності ітрію (III) з межею визначення кверцетину на поверхні алюміній фосфату дорівнює $5,0 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Незважаючи на високу чутливість флюорометричного методу об'єктивні результати аналізу сировини і фітохімічних препаратів на вміст флавоноїдів можливо за умови хроматографічного розділення сполук [24].

Електрохімічні методи

Для визначення флавоноїлів застосовують полярографію, метод амперометричного титрування, вольтамперометрію [25], циклічну вольтамперометрію [26,27].

Наприклад, запропоновано вольтаметричну методику визначення флавоноїлів в фармпрепаратах, що базується на реєстрації висоти хвилі окиснення кверцетину на платиновому електроді на фоні 0,1М H₂SO₄ [25] або 0,1М HCl [26]. Проте чутливість визначення в цих методах невисока, межа виявлення складає $3,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

На відміну від спектрофотометрії, даний метод дає більш близькі результати до істинного сумарного вмісту флавоноїдів.

Мала вибірковість методу потребує при визначенні індивідуальних флавоноїдів у рослинній сировині та фітопрепаратах їх попереднє розділення [3-9].

1.5. Хроматографічні методи ідентифікації та визначення кверцетину

Для визначення кверцетину, зокрема у складних сумішах, найчастіше застосовують методи хроматографії і капілярний електрофорез [3-5, 28-]. Розроблена та валідована методика одночасного визначення 7 головних поліфенолів у фармацевтичних препаратах *Ginkgo biloba* методом газової

хроматографії-мас-спектрометрії (GC-MS) з межею виявлення до 2,5 мг/мл для кверцетину [29].

Метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) є пріоритетним для визначення поліфенолів, в тому числі і кверцетину. За останні роки кількість публікацій, присвячених цьому питанню, значно зросла завдяки зростаючому інтересу дослідників до вивчення природних антиоксидантів, і безумовним перевагам методу ВЕРХ.

Одним із важливих завдань методу ВЕРХ є вибір оптимальних умов відокремлення компонентів суміщей, близьких за властивостями. З цією метою досліджують наступні фактори:

- тип нерухомої фази
- склад рухомої фази,
- температура колонки.

Нерухомі фази. Октадецилсилікагелеві (C_{18}) обернені фази (діаметр 2-5 мкм) посідають провідне місце при визначенні фенольних сполук унаслідок унікальних властивостей і широкої доступності [30-32].

Хроматографічне розділення сполук на неполярних фазах C_{18} характеризують як обернено-фазовий тип утримування, в якому утримування здійснюється за рахунок комплексу дисперсійних і сольвофобних взаємодій, що кількісно характеризується властивістю гідрофобності. У першому наближенні, чим краще будь-яка речовина розчиняється в неполярних розчинниках, або гірше розчиняється у водних середовищах, тим вище його гідрофобність і відповідно тим сильніше вона утримується в обернено-фазових умовах [30-32].

Вважається [6], що молекули фенольних сполук утримуються на неполярній поверхні алкілсилікагеля за рахунок ван-дер-ваальсових сил, причому міцність зв'язку зростає із збільшенням довжини бічного ланцюга.

В якості *рухомих фаз в обернено-фазовій хроматографії* найчастіше використовують водно-спиртові (вода - метанол), водно - тетрагідрофуранові

та водно - ацетонітрильні суміші з додаванням в них до рН ~ 2-5 різних органічних або неорганічних кислот (водні розчини оцтової) [30-33].

Елюююча сила рухомої фази в обернено-фазовому режимі зростає із збільшенням частки органічного розчинника, який прийнято називати модифікатором. Найчастіше як модифікатор застосовують метанол або ацетонітрил, як буферний розчин: фосфатний або ацетатний. Тобто чим більша частка модифікатора в рухомій фазі – тим швидше відбувається елюювання досліджуваних сполук.

Оскільки часто досліджувані сполуки знаходяться в широкому діапазоні полярності, то для їх аналізу потрібне використання градієнтного режиму елюювання. Так у роботі [30] було запропоновано градієнтний режим для визначення кверцетину: спочатку елюювали розчинником А (ТФА, 0,2% у воді, рН 1,9) протягом 7 хв (1,5 мл/хв), далі застосовували градієнтний режим промивання розчинником В (ацетонітрил) - 0-4% протягом 3 хвилин, далі до 50% наступні 20 хв. Це дало змогу отримати гарні часи виходу кверцетину (27,2 хв), який зазвичай виходить останнім і досить довго.

Найбільш часто для визначення фенольних сполук використовується швидкість потоку 1-2 мл/хв [3-5].

Через велику різноманітність нерухомих фаз і елюентів для хроматографічного розділення фенольних сполук існує певна складність при виборі оптимальної рухомої фази та сорбенту в застосуванні до конкретної хроматографічної системи. Потрібні детальні дослідження умов розділення і детектування.

Для *детектування фенольних сполук* методом ВЕРХ використовують різноманітні детектори: діодно-матричний, мас-спектрометричний, флуоресцентний, хемілюмінесцентний та електрохімічний.

Кожна фенольна сполука свій максимум інтенсивності поглинання: для кверцетину – 365 нм. Тому, найбільш часто для детектування кверцетину застосовується спектрофотометричний метод (УФ).

Таким чином, на практиці поліфеноли розділяють хроматографічним методом в обернено-фазовому (ОФ) варіанті. Як нерухому фазу використовують модифіковані кремнеземи.

Метод ОФ-ВЕРХ при використанні різного роду детекторів дозволяє аналізувати і різною мірою ідентифікувати флавоноїди в різних об'єктах, в тому числі в лікарських рослинах [3-5] та лікарських засобах [29].

Успіх аналізу визначається як підготовкою проби до аналізу, так і оптимально обраними умовами розділення і детектування.

Пробопідготовка. Найбільш поширеними методами очищення і концентрування поліфенолів є рідинно-рідинна [30, 31] і твердофазна екстракція (ТФЕ) [30, 34].

При проведенні ТФЕ великі переваги мають сорбційні системи на основі силікагелю. Завдяки своїй жорсткості, силікагель стійкий при великих швидкостях елюювання та значних змінах тиску: його легко отримати з точно заданими розмірами часточок та пористістю. Силікагель можна модифікувати дуже великим рядом органічних груп, значно збільшуючи їх стійкість комплексоутворення з катіонами металів. Широкого використання набули кремнеземи, модифіковані амінопропільними, диетиламіноетильними та епоксигрупами [7,30].

У роботах [6,7,30] показано, що твердофазна екстракція забезпечує більший ступінь вилучення фенолів і поліфенолів з різних зразків, ніж рідинно-рідинна

Розділ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

2.1. Об'єкти дослідження.

В роботі було досліджено:

Зразок 1 - кверцетин LipoMicel Matrix

Склад: Капсула кверцетин - 250 мг (допоміжні речовини -желатин, гліцерин, очищена вода, порошок ріжкового дерева), середньоланцюгові тригліцериди (кокос), личтя стевії (*Stevia rebaudiana*), фосфатидилхолін лецитин (соняшник), м'ятна есенція



Зразок 2 - Квертин

Склад лікарського засобу:

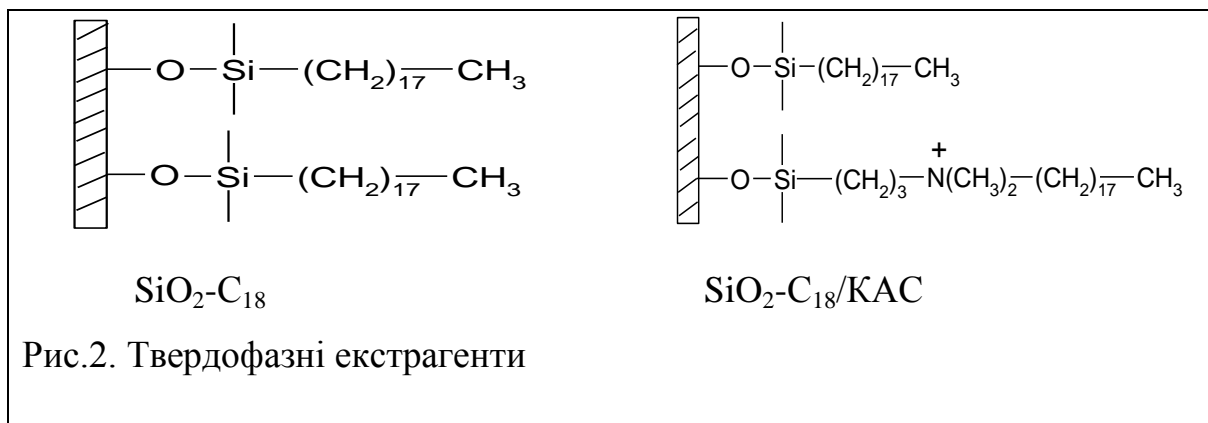
діюча речовина: кверцетин; 1 таблетка містить кверцетину (у перерахунку на 100 % суху речовину) – 40 мг;

допоміжні речовини: пектин, моногідрат глюкози, сахароза, ароматизатор апельсинова ароматична добавка, магній стеарат, мильний камінь.



Як адсорбенти дослідили: $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ (C_{18}) - кремнезем, модифікований октадецильними групами та $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ - кремнезем із закріпленою за

рахунок аніонообмінного механізму кватернарою амонійною сіллю (КАС)
(Рис. 2)



ТФЕ надані для дослідження кафедрою аналітичної хімії Київського національного університету Т.Г Шевченко відповідно до Угоди про співпрацю.

2.2. Реагенти та приготування розчинів

Реагенти:

- етанова кислота (99%, для хроматографії);
- соляна кислота (х.ч.);
- натрій етаноат (х.ч.)
- натрій гідрогенфосфат (х.ч.)
- калій дигідрогенфосфат (х.ч.)
- вода деіонізована (очищена на Millipore, Direct-Q).
- органічні розчинники (*for HPLC, Sigma*): ацетонітрил та метиловий спирт;

Розчини.

Для приготування стандартного розчину кверцетину з масовою концентрацією $C_T=1000$ мг/л розчиняють точну наважку (0,01 г) у метанолі об'ємом 10 мл.

Для приготування стандартних розчинів з меншою концентрацією змішують аліквотні частини вихідного стандартного розчину з метанолом.

Приготовлені розчини зберігають у холодильнику (5°C), термін зберігання 1 місяць.

Робочі розчини готують перед виконанням експериментів шляхом розбавлення аліквоти вихідних розчинів.

Розчин з $\text{pH}=2$ готують за методикою: 2,5 мл вихідного розчину кверцетину за допомогою піпетки поміщають у мірні колби місткістю 50 мл, вносять за допомогою піпетки метанол (5,0 мл) та необхідну кількість 0,1М НСІ до досягнення заданого значення рН, додавали до позначки деіонізовану воду та ретельно перемішували.

Розчин з $\text{pH}=5$ - 2,5 мл вихідного розчину кверцетину за допомогою піпетки поміщали у мірні колби місткістю 50 мл, вносять метанол (5,0 мл) та додають 0,01 моль/л етановий буферний розчин до позначки і ретельно перемішують.

Елюенти та допоміжні розчини

1 моль/л розчин хлоридної кислоти готують розведенням вмісту фіксаналу у мірній колбі на 100 мл. Розчини меншої концентрації готують методом розбавлення аліквоти основного розчину.

Елюент А: готують змішуванням 0,3 мл 0,1%-ого розчину ацетатної кислоти та 0,3 л очищеної води.

Елюент В - готують змішуванням 0,3 мл 0,1%-ого розчину ацетатної кислоти та 300 мл ацетонітрилу.

Перед використанням розчинники фільтрують за допомогою скляного фільтру з водоструминним вакуумним насосом.

Розчин ацетатної кислоти 0,1 М: У мірну колбу ємністю 1000мл поміщають 6 мл концентрованої етанової кислоти та додають дистильовану воду до позначки і перемішують.

Розчин натрій етаноату 0,1М готують розчиненням 3,4 г солі натрій етаноату у 250 мл дистильованої води.

Буферний розчин рН=5,2: ацетатний буферний розчин 0,1 моль/л з рН=5,2 готують змішуванням 59 мл розчину 0,1 моль/л ацетатної кислоти і 141 мл розчину 0,1 моль/л натрій ацетату.

Регулюючий розчин рН=6,5: 78,3 мл розчину А поміщають у мірну колбу на 250 мл і доводять до позначки розчином В.

Розчин А: натрій гідрофосфат;

Розчин В: калій дигідрофосфат.

Регулюючий розчин рН=7: 191,3 мл розчину А поміщають у мірну колбу ємністю 250 мл і доводять до позначки розчином В.

2.3. Прилади

У роботі для ідентифікації та визначення кверцетину застосували модульний рідинний хроматограф *Agilent 1200 Series* (Agilent Technologies, США), основні параметри приладу наведено у табл. 2.

Таблиця 2. Характеристики хроматографічної системи.

Прилад:	Рідинний хроматограф <i>Agilent 1200</i>
Колонка:	<i>Eclipse XDB-C18</i> : обернена фаза, C ₁₈ Геометричні розміри: 4,6 мм x 150 мм Зерно розміром : 5 мкм
Насос:	Agilent 1200 Series Quaternary Pump, Градієнтний
Інжектор:	Agilent 1200 Series Manual Injector, 20 мкл
Термостат:	Agilent 1200 Series Thermostatted Column Compartment, Повітряний
Детектор:	Діодно-матричний, Agilent 1200 Series Diode Array and Multiple Wavelength Detectors
Програмне забезпечення:	Chemstation A.08.03 (Agilent Technologies, США)

Зважування речовин з точністю до четвертого знаку проводять на аналітичних терезах METTLER TOLEDO.

Іономір рН-150МИ з комбінованим електродом ЭСК-10603 застосовано для виміру рН розчинів

Лабораторну магнітну мішалку Lab Disk (IKA Werke, Германия) використано для перемішування розчинів.

Мембранні фільтри ISO-DISC 0,45 μm .

Автоматичний дозатор змінного об'єму Termo Scientific Lite 1-5-50 мкл та BIONIT PROLINE (100-1000 μl) використано для відбору аліквотних частин розчинів досліджуваних сполук.

Перистальтичний насос марки ПН – 1М застосовано для пропускання розчинів аналітів через ТФЕ.

Для ТФЕ використовують стандартні патрони з фазою C_{18} (Agilent) ($m=0,1$ г, $h=5$ мм), а з $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ - заповнюють пластиковий картридж суспензією води-метанолу і 0,1 г $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$. Після відстоювання тверду фазу фіксували терефталевою плівкою. Отриманий картридж з $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ з висотою 5 мм і діаметром 3 мм зберігали під шаром води.

Перед використанням картридж нормували додаванням метилового спирту (1 мл), суміш метилового спирту та дистильованої води (1:1) об'ємом 5 мл та дистильованої води (10 мл).

2.4. Методики дослідження

2.4.1. Методика визначення вмісту кверцетину у розчинах

Вміст кверцетину у модельних розчинах визначають за методом градуувального графіка хроматографічним методом. Для цього готують серію стандартних розчинів у діапазоні концентрацій 50 – 200 мг/л шляхом розведенням вихідного стандартного розчину кверцетину ($C_T=1000$ мг/л) та хроматографують. Методами хімічної метрології [35] отримуть математичний опис графіка у вигляді $y = aC + b$ та розраховують концентрацію C кверцетину.

Визначення вмісту кверцетину в об'єктах дослідження проводять методом стандартних добавок чи за метом градуувального графіку. Для цього у мірну колбу на 25 мл піпеткою вносять 2,5мл розчину кверцетину

($C_T=1000$ мг/л) і додають воду очищену до мітки, перемішують ретельно. Мікропіпеткою відбирають 100 мкл цього розчину та переносять у мірну колбу ємністю 10 мл, додають розчин зразку (з рН=5,2) до позначки, перемішують та пропускають через мембранний фільтр і поміщають у склянку. Хроматографують розчини (модельний та зразка) і розраховують вміст (мг/мл) кверцетину за формулою:

$$\frac{S_a}{C_a \cdot (V_0/V_k)} = \frac{S_{a+d}}{C_a \cdot (V_0/V_k) + C_c \cdot (V_c/V_k)}$$

де S_a – площа піку, мм²;

C_a – вміст кверцетину, мг/мл;

V_0 - об'єм зразка, мл;

V_c - об'єм розчину добавки з концентрацією C_c мг/мл; мл

V_k - об'єм розчину зразка з добавкою, мл.

2.4.2. Пробопідготовка

У стакан ємністю 50 мл вносили вміст капсули (зразок 1) чи одну таблетку зразка 2 (попередньо розтерту у порошок у порцеляновій ступці), додавали 10 мл метанолу, 15 хвилин перемішували на магнітній мішалці, фільтрували через звичайний фільтр, фільтрат центрифугували протягом 30 хвилин. 0,1 мл фільтрату зразка 1 чи 1 мл фільтрату зразка 2 переносили у мірну колбу на 25 мл, додавали метанол (10 мл), 1 моль/л етаноатний буфер (15 мл) та ретельно перемішували. Аліквотну частину 10 мл пригволеного розчину для аналізу контактували з ТФЕ шляхом пропускання його крізь нормований картридж.

Усі розчини перед подачею у хроматограф фільтрували через мембранний фільтр Iso-Dis 0,45 μm.

2.4.3. Оптимізація умов динамічного концентрування кверцетину з модельних розчинів та його десорбції з фази сорбенту.

Характеристики процесу сорбції кверцетину твердофазним екстрагентом вивчали у режимі пропускання розчину кверцетину через картридж за допомогою престальтичного насосу.

Дослідження проводили у наступній послідовності: визначали оптимальне значення рН розчину; при обраному оптимальному значенні рН встановлювали вплив метилового спирту на процес сорбції; доліждали вплив елюентів з різною елююючою здатністю на вилучення кверцетину з фази адсорбенту; визначали оптимальний об'єм елюенту; встановлювали оптимальний об'єм розчину кверцетину для пропускання через картридж.

Умови адсорбції та десорбції кверцетину вивчали у динамічному режимі. Модельні розчини пропускали (швидкість 1-2 мл/хв) крізь патрони з ТФЕ, аліквоту розчину, що пройшов через шар сорбенту, об'ємом 1 мл приносили у склянку, хроматографували і визначали вміст кверцетину після контакту з твердофазними екстрагентами. Ступінь сорбції кверцетину розраховували за різницею початкової та рівноважної концентрації.

Десорбцію кверцетину вивчали шляхом пропускання через патрони з ТФЕ різних потенційних елюатів: воду очищену, розчин хлоридної кислоти (0,1-0,5%) у метанолі та розчин етанової кислоти (0,1-0,5%) у метанолі. Елюати об'ємом 1 мл хроматографували та розраховували вміст кверцетину за рівнянням градууювального графіка.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Підбір градієнтного режиму

Для ефективного елюювання та/чи розділення поліфенолів використовують розчини із змінним складом розчинників, а саме – зменшують частку органічного елюенту. В нашій роботі вивчено кверцетин, який у природній сировині знаходиться наряду із іншими поліфенолами з широким діапазоном полярностей, тому обирали оптимальний градієнтний режим елюювання кверцетину.

Для вибору оптимальних умов елюювання були вивчені хроматографічні параметри отримані в декількох градієнтних режимах. Параметри запропонованих градієнтних режимів наведено в табл. 3.

Таблиця 3. Параметри градієнтних режимів 1: Елюент А: вода (0,1% етановоїкислоти); та 2 -Елюент В: метанол (0,1% етанової кислоти).

Параметри градієнтного режиму			
1		2	
Час (хв.)	%А	Час (хв.)	%В
0	0	0	10
6	9	6	30
8	30	7	30
10	30	9	11
12	11		

Експериментальні параметри хроматографічної системи: об'єм проби -2 мкл, швидкість пропускання елюенту - 2 мл/хв, температура колонки - 30°C, кверцетин детектували при довжині хвилі 369 нм.

На Рис. 3 представлено хроматограму приготовленого розчину кверцетину в режимі 1 (а) та 2 (б) відповідно, при довжині хвилі 369 нм.

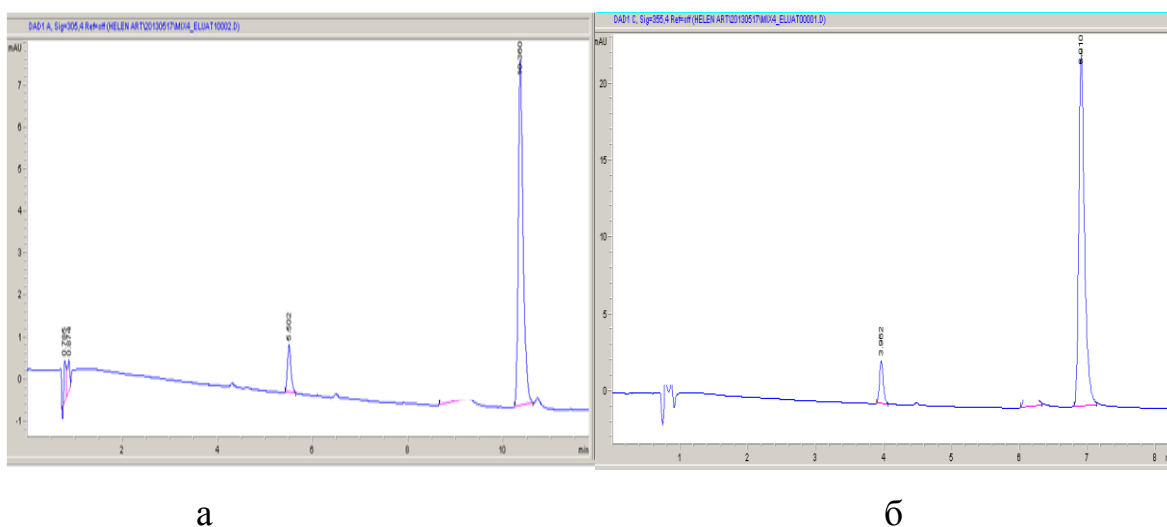


Рис.3 Хроматограма модельного розчину кверцетину (C= 10 мг/л) на колонці Eclipse XDB-C18 в режимі 1 (а) та 2(б) в оптимальних умовах при довжині детектування 369 нм, проба об'ємом 2 мкл, швидкість пропускання розчину 2 мл/хв.

Аналіз хроматографічних параметрів, отриманих за різними градієнтними режимами елюювання. (табл.4) показує, що час проведення експерименту у режимі 2 коротший у порівнянні з режимом 1.

Таблиця 4. Порівняння хроматографічних параметрів, отриманих за різними градієнтними режимами елюювання.

№	Назва сполуки	λ , нм	t_R , хв	$W_{1/2}$, хв	S, mAu	N	R_s	α	Symm.
Гرادієнт 1 -12 хв									
1	Кверцетин	369	10,36	0,1069	160,8	52079	6,01	1,16	0,649
Градієнт 2 – 8 хв									
1	Кверцетин	369	6,91	0,0868	161,6	35141	4,52	1,14	0,670

Примітка до таблиці:

λ , нм – обрана довжина хвилі детектування сполуки; t_R , хв– час утримання;

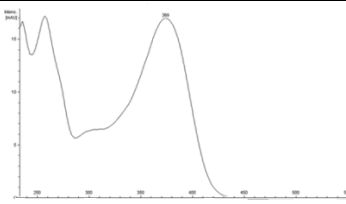
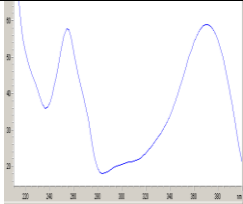
$W_{1/2}$, хв- напівширина піку при обраній довжині хвилі детектування; S , mAu- площа хроматографічного піку; N - число теоретичних тарілок; α - селективність розділення; R_s – фактор розділення; $Symm.$ - коефіцієнт симетрії.

3.2. Вибір оптимальних умов ідентифікація кверцетину

При дослідженні методом ОФ - ВЕРХ складних природних об'єктів для ідентифікації компонентів використовують часи утримування аналітів, УФ - спектри та / або відносні оптичні густини при фіксованих довжинах хвиль детектування.

Для досягнення найбільшої чутливості детектування індивідуальні фенольні сполуки повинні реєструватися на найбільш оптимальних довжинах хвиль. Для роботи були обрано довжину хвилі детектування в довгохвильовому максимумі поглинання кверцетину 369 нм (табл.5) .

Таблиця 5. Спектри оптичного поглинання фенольних сполук

Назва сполуки	Спектри поглинання кверцетину в УФ-області		
	З літературних джерел	Спектр кверцетину	Максимум поглинання, λ_{max} , нм
Кверцетин			256, 369 нм

Таким чином, на підставі проведеного дослідження і літературних даних були вибрані оптимальні умови детектування кверцетину, які в подальшому і використовували в роботі.

3.3. Залежність хроматографічних параметрів від концентрації кверцетину

Для встановлення залежності площі піку хроматограми кверцетину в оптимальних умовах було підготовлено серію розчинів у концентраційному діапазоні 50–250 мг/л. У пронумеровані хроматографічні склянки відбирали по 50,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0 мкл розчину кверцетину з масовою концентрацією 1000 мг/л, додавали метанол до 1000 мкл за об'ємом. Концентрацію кверцетину визначали методом хроматографії. На основі отриманих даних було побудовано графік залежності площі піку від концентрації кверцетину, мг/л (Рис. 4).

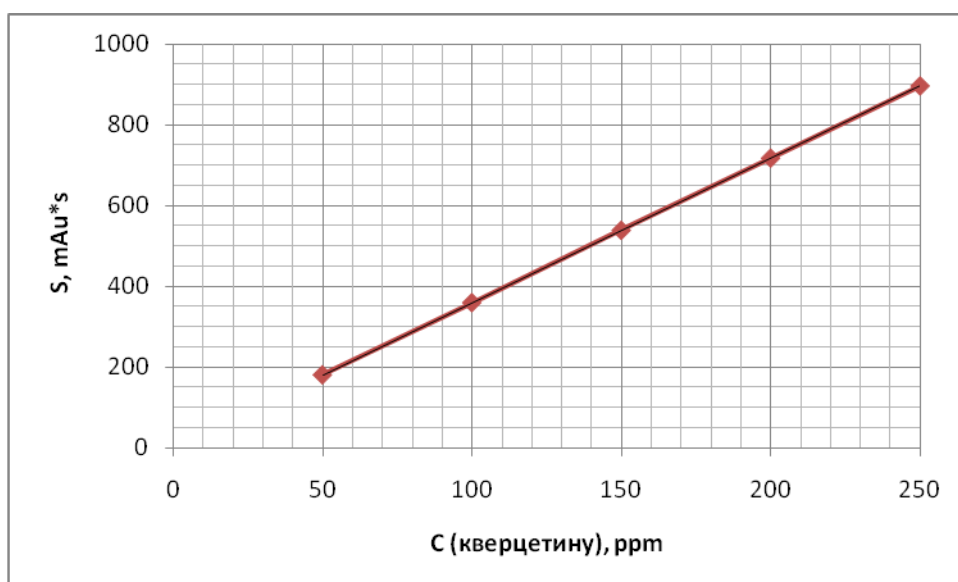


Рис.4. Градувальний графік визначення кверцетину, $\lambda = 369$ нм .

Як видно з Рис. 4 графік лінійний. Розраховано наступні градувальні залежності:

$$S, \text{ mAu*s} = (1,9 \pm 0,8) + (3,58 \pm 1,35) * C_{\text{мг/л}}; \quad \text{MB} = 0,67 \text{ мг/л}; \quad R^2 = 0,99983; \quad n = 5;$$

Визначені статистичні характеристики відповідають вимогам ДФУ [21, 35, 36], тому методику можна вважати лінійною.

3.4. Дослідження сорбційних характеристик запропонованих ТФЕ в динамічних умовах

Сорбційні характеристики ТФЕ були вивчені виходячи з кривих динамічної ємності, отриманих в експериментальних умовах, достатніх для встановлення адсорбційної рівноваги.

Можна припустити, що $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ буде краще вилучати кверцетин в кислому середовищі, коли вони перебувають в молекулярному стані. Щоб перевірити це припущення досліджено сорбційні властивості запропонованих ТЕ для концентрування кверцетину при $\text{pH}=2,2$ та $\text{pH}=5,2$, $\text{pH}=6,5$, $\text{pH}=7,2$. Для десорбції кверцетину з поверхні $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ застосували такі елюенти як метанол чи розчин соляної кислоти (0,1-0,5%) у метанолі, а для десорбції кверцетину з поверхні $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{КАС}$ - розчин етанової кислоти (0,05-0,5 %) у метанолі. Об'єм елюентів варіювали у діапазоні 1-5 мл.

На Рис. 5 Наведено, як приклад, ізотерми адсорбції немодифікованого $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. (б) та модифікованого $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ кватенарними амонійними групами (а) до кверцетину при pH оптимальної сорбції.

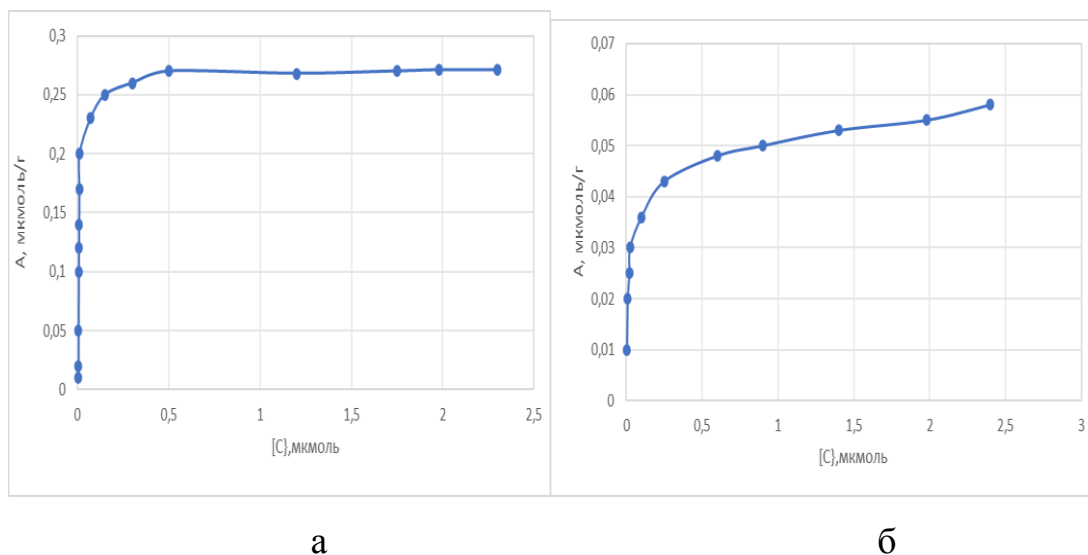


Рис.5. Ізотерми адсорбції $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{КАС}$ (а) та $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ (б) для кверцетину з розчинів із $\text{pH} = 5,2$, C (кверцетину) = 100 мг/л (а), 20 мг/л (б), $m(\text{сорб.})=0,1\text{г}$, $T = 22^\circ\text{C}$.

Як бачимо, сорбційна здатність $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ до кверцетину значно вища, ніж у $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. Це підтверджує високу ефективність запропонованого ТФЕ, оскільки було очікувано, що його ємність буде вищою завдяки наявності на поверхні двох типів закріплених лігандів - октадецильних та кватенарних амонійних.

Ізотерми сорбції кверцетину на $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ можна віднести до L-типу, що також свідчить про високу спорідненість сорбенту до кверцетину. Значення сорбційної ємності (СОЄ) $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ до кверцетину у залежності від кислотності середовища значно вищі для $\text{pH}=5,2$, ніж у кислих розчинах (Табл. 6)

Таблиця 6. Значення сорбційної ємності $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ та $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ при різних значеннях рН.

рН	СОЄ, мкмоль/г	
	$\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$	$\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$
2,2	0,040	0.038
2,6	0,043	-
5,2	0,270	0,053
6,5	0,151	0,055
7,2	0,042	0,061

Значення СОЄ на $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ із кислих розчинів з практично співпадають із значеннями СОЄ на $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$ (табл.6). Це можна пояснити з точки зору існування на поверхні $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ залишкових силанольних груп, які в сильно кислому середовищі здатні протонуватись і разом з ЧАС створювати сильно позитивно заряджену поверхню, що призводить до гіршої абсорбції гідрофобних молекул. З іншого боку при значеннях $\text{pH} \geq 6$ силанольні групи ТФЕ перебувають у депротонованому стані, що і спричиняє зниження ступеня вилучення кверцетину за рахунок утворення на поверхні йонних асоціатів з КАС. При $\text{pH}=5,2$ силанольні групи $\text{SiO}_2\text{-}$

C₁₈/КАС непротоновані не знижують адсорбцію кверцетину. Тому для ТФЕ кверцетину на SiO₂-C₁₈/КАС було обрано рН=5,2, яке створювали етаноатним буфером.

На рис. 6 представлено діаграму залежності ступеня вилучення водно-метанольних розчинів кверцетину на SiO₂-C₁₈/КАС та SiO₂-C₁₈ від кислотності розчинів.

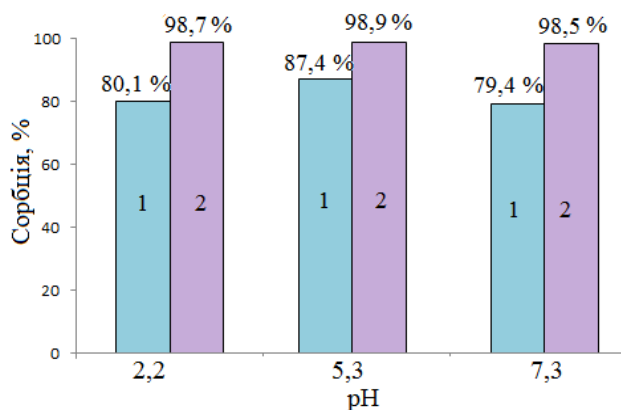


Рис.6. Залежність ступеня сорбції кверцетину на поверхні сорбенту SiO₂-C₁₈ (1) та SiO₂-C₁₈/КАС (2) від кислотності середовища; C_{кверцетину}= 5 мг/л (1), 50 мг/л (2), m(ТФЕ)=0,1 г, V=10 мл, V_{елюенту}=5 мл (1), 1 мл (2).

Як бачимо з Рис. 6 ступінь вилучення кверцетину SiO₂-C₁₈/КАС значно більший і становить біля 98% незалежно від кислотності розчину порівняно з SiO₂-C₁₈, беручи до уваги те, що вихідні концентрації кверцетину при використанні адсорбенту SiO₂-C₁₈/КАС в десять разів більші ніж при використанні адсорбенту SiO₂-C₁₈. Тому, для вилучення та концентрування кверцетину був обраний SiO₂-C₁₈/КАС при рН=5,0.

3.5. Оптимізація умов десорбції кверцетину

Як видно з попередніх досліджень ефективність ТФЕ визначається ступенем іонізації сполук, тобто рН системи. Найбільша ефективність вилучення з розчину досягається у тих випадках, коли молекули аналітів іонізовані, а найбільша ефективність елюювання – коли аналіти перебувають в молекулярній формі. Оскільки ми мали справу з поліфенолом кверцетин, для елюювання його слід використовувати органічні розчинники з рН≤2,0,

оскільки при цих значеннях кислотності кверцетин знаходиться в молекулярній формі і вилучається з поверхні ТФЕ. Тому як елюенти дослідили розчини різної концентрації соляної та етеноатної кислоти у метанолі.

Встановлено, що наявність кислоти в елюенті впливає на повноту вилучення кверцетину, а саме: при збільшенні вмісту кислоти спостерігається збільшення ступеня вилучення. При додаванні 0,5 % соляної кислоти ефективність вилучення збільшується в 1,4 рази у порівнянні з чистим метанолом, а при додаванні 0,5 % оцтової кислоти – у 1,3 рази.

З Рис.7. видно, що для повного (>95%) елюювання за вибраних умов достатнім є використання 1 мл елюенту. Таким чином, для кількісного вилучення кверцетину з поверхні $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ в подальшому використовували, як елюент метанол з додаванням 0,5% хлоридної кислоти. Саме ці умови були використані при оптимізації умов десорбції в залежності від об'єму елюенту.

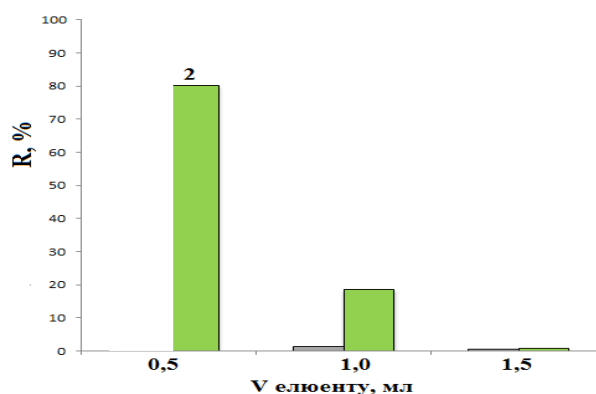


Рис.7. Діаграма впливу об'єму елюенту на ступінь елюювання кверцетину з поверхні $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$: $C_{\text{кверцетину}}=10$ мг/л, $m(\text{ТФЕ})=0,1$ г, $\text{pH}=5,0$, $V_p=10$ мл.

Результати досліджень впливу об'єму розчину на ступінь вилучення кверцетину показали, що для кількісного концентрування та вилучення кверцетину доцільно проводити сорбцію з розчинів об'ємом 25 мл і менше..

3.6. Ідентифікація та визначення кверцетину у зразках

Виходячи з меж визначення ПФС хроматографічним методом з УФ-детектуванням без концентрування (0,5-1,0 мг/л) та вмісту кверцетину у лікарських засобах було розраховано оптимальні умови використання ТФЕ, що наведені нижче.

Оптимальні умови: об'єм розчину для аналізу 25 мл, об'єм елюенту – 1 мл, аліквота для введення в хроматограф – 2 мкл. В якості добавки використовували стандартний розчин кверцетину, який містив 10 мг/л.

На Рис.8 представлено хроматограму розчину зразка 2 та метанольного розчину стандарту кверцетину (C=10мг/л). З хроматограм видно, що у розчині зразку присутній кверцетин, інші компоненти не заважають.

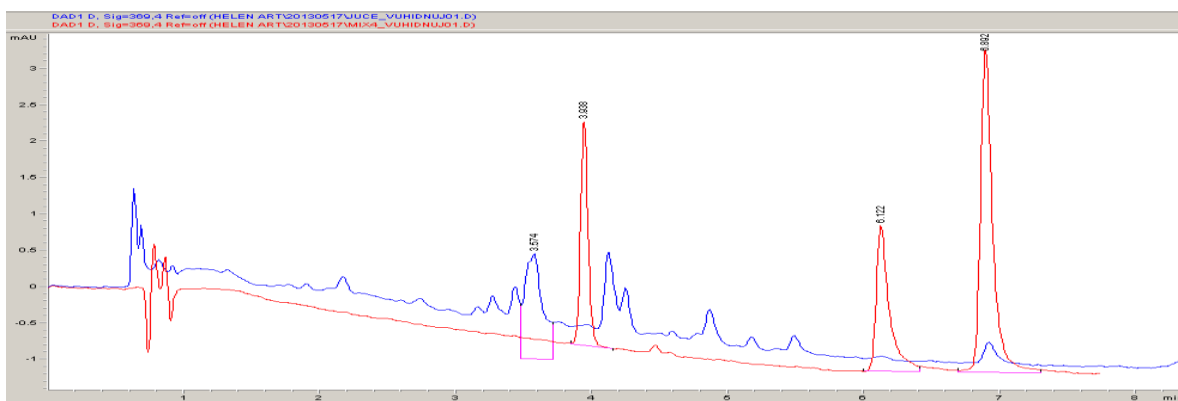


Рис.8. Хроматограма розчину зразка 2 та розчину стандарту кверцетину (C=10 мг/л) (червоний), градієнтний режим 2, хвиля детекції 369 нм.

Час утримування кверцетину у градієнтному режимі 2 (Рис.8) у стандартному розчині 6,910 хв, а час утримування аналіту у розчині зразка 6,917 хв

Хроматограми елюату зразка 2 та елюату зразка зі стандартною добавкою при довжині хвилі детекції 369 нм без та після концентрування наведено на Рис.9.

Як видно з Рис.9 на запропонованому $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$ відбувається відокремлення і одночасно концентрування кверцетину, що проявляється в

пропорційному зростанні інтенсивності піків на хроматограмі. З хроматограми видно, що пробопідготовка дозволяє не тільки відокремити, а й сконцентрувати і, відповідно, понизити межу виявлення кверцетину. Отже, методику можна вважати специфічною.

Положення піків аналізу без та з пробопідготовкою співпадають (Рис.9). Це дало можливість перейти до кількісного обрахунку вмісту кверцетину у зразку за методом добавок.

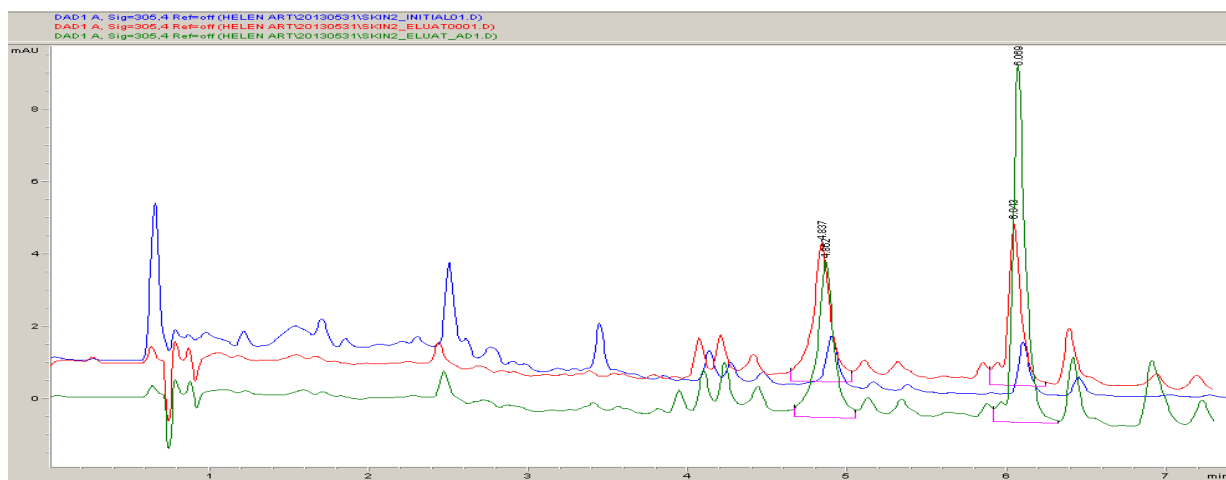


Рис.9. Хроматограма розчину зразка 2 до (синій) та після відокремлення та концентрування без (червоний) та з стандартною добавкою (зелений) при 369 нм на сорбенті $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{KAC}$; $m(\text{ТФЕ})=0,1\text{г}$, $\text{pH}=5,0$, $V=25\text{ мл}$; $V_{\text{елюента}}=1\text{мл}$.

Правильність запропонованої методики визначали на основі методу «введено-знайдено». Результати представлено у табл.7.

Результати дослідження наведені у табл.7 свідчать про достатню точність і відтворюваність методики. Як бачимо, відносна похибка середнього значення корелює з вимогами ДФУ [21,35, 36]. Отже, запропонована альтернативна методика кількісного визначення кверцетину методом ОФ-ВЕРХ може бути признана правильною.

Таблиця 7. Результати визначення кверцетину у зразку 2 запропонованим методом та методом добавок: рН = 5,0; V_{ел.} = 1 мл, елюент метанол з додаванням 0,5% хлоридної кислоти; n = 3

№ проби	V розчину зразка, мл	Вміст кверцетину, мг			Sr
		Метод добавок		Запропонований метод	
		Введено	Знайдено	Знайдено	
1	25	10,00	48,46 ± 0,32	38,61 ± 0,28	0,002884
2	25	15,00	53,53 ± 0,20	38,79 ± 0,73	0,007646

Результати кількісного визначення кверцетину у зразку 1 та 2 запропонованим методом наведено у табл. 8.

Таблиця 8. Кількісне визначення кверцетину у зразку 1 та 2 запропонованим методом: рН = 5,0; V_{елюенту} = 1 мл, елюент метанол з додаванням 0,5% хлоридної кислоти; n = 3. Метрологічні характеристики методу.

№ проби	Вміст діючої речовини, мг	
	Зразок 1	Зразок 2
1	237,96	38,49
2	241,01	38,63
3	239,03	38,71
RSD, %	0,65	0,29
дисперсія	2,39	0,0124
довірчий інтервал $\bar{x} \pm t_{p,v} \frac{s}{\sqrt{n}} = \bar{x} \pm \Delta \bar{x}$	239,33 ± 3,84	38,61 ± 0,28
відносна похибка середнього значення, %	1,61	0,72

оцінка збіжності	$ x_1 - x_n < L(P, n) \cdot s$	
	3,05 < 5,12	0,22 < 0,37

Як бачимо з наведених даних Табл. 8, величина відносного довірчого інтервалу свідчить про достатню внутрішньолабораторну точність запропонованої методики.

Оскільки значення відносного довірчого інтервалу не перевищує максимальну припустиму невизначеність аналізу (2,0%), то методика відповідає критерію прийнятності.

Таким чином, результати кількісного визначення вмісту кверцетину у зразках 1 та 2 запропонованим альтернативним методом можна вважати збіжними [21,35, 36].

ВИСНОВКИ

- ✓ Встановлено закономірності процесу вилучення кверцетину з модельних розчинів за допомогою ТФЕ на основі кремнезему, що містить одночасно октадецильні (C_{18}) та аніонообмінні (КАС) групи ($SiO_2-C_{18}/КАС$); Обґрунтовано, що для концентрування кверцетину в динамічних умовах твердофазний екстрагент SiO_2-C_{18} мало ефективний.
- ✓ Показано, що оптимальним значенням для вилучення кверцетину на $SiO_2-C_{18}/КАС$ є значення $pH=5,0$. Кількісна десорбція кверцетину досягається невеликим об'ємом елюенту, що вказує на ефективність концентрування кверцетину і знижує межу його виявлення.
- ✓ Розроблено методику ідентифікації та визначення кверцетину у лікарських засобах та дієтичних добавках методом ОФ-ВЕРХ за умови використання $SiO_2-C_{18}/КАС$ як ТФЕ .
- ✓ Методику валідовано за лінійністю, специфічністю та правильністю

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
2. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». – 2-е вид. – Доповнення 2. – Харків : Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2018. 336 с.
3. М. І. Шанайда, М. О. Черевко /Хроматографічний аналіз флавоноїдів і фенольних кислот у траві васильків // Фармацевтичний журнал, 2024, Т. 79, № 1.- С.68-76. DOI: 10.32352/0367-3057.1.24.08
4. Л. В. Вронська. /ВЕРХ-дослідження агліконів флавоноїдів сухого екстракту пагонів чорниці // Фармацевтичний часопис. 2020. № 3 С. 5-14 DOI: <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2020.3.11424>
5. С. М. Марчишин, Л. В. Костишин, Т. В. Валько, В. М. Кіщук, Е. А. Паращук./Дослідження флавоноїдів чорнобривців золотистих // Медична та клінічна хімія. 2021. Т. 23. № 4/ С95-102. DOI 10.11603/mcch.2410-681X.2021.i4.12743
6. Н.О. Липковська, В.М. Барвінченко / Супрамолекулярні взаємодії природних флавоноїдів з катіонною ПАР етонієм в розчинах і на поверхні кремнезему // Хімія, фізика та технологія поверхні. 2018. Т. 9. № 1. С. 92-103 doi: 10.15407/hftp09.01.092
7. О.О. Казакова, В.М. Гунько, Н.О. Липковська, Є.П. Воронін, В.К. Погорелий / Адсорбція кверцетину на поверхні високодисперсного кремнезему у водних суспензіях у присутності полівінілпіролідону //Хімія, фізика та технологія поверхні. 2003. Вип. 9. С.107-114

8. Zaitsev, V.N., Khalaf, V.A. & Zaitseva, G.N. Organosilica composite for preconcentration of phenolic compounds from aqueous solutions. // *Anal Bioanal Chem* **391**, 1335–1342 (2008). <https://doi.org/10.1007/s00216-008-1934-y>
9. В. М. Зайцев, В. А. Халаф, Г. М. Зайцева Методи концентрування та визначення фенольних сполук (Огляд) // *МОХА*, 2008, т. 3, № 1, С. 4–21.
10. Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. // *J. Nutr. Biochem.* – 2002. - № 13. – P. 572-584.
11. Коноплицька О.П., Зайцева Г.М., Дворецька Д.М./ Ідентифікація та кількісне визначення ресвератролу в дієтичних добавках хроматографічним методом // *Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяченої 25-річчю фармацевт. ф-ту Нац. мед. ун-ту імені О. О. Богомольця*, 19-20 груд. 2023 р. м. Київ, С. 415-416.
12. Kochetova. M.V., Semenistaya E.N., Larionov O.G., Revina A.A.. Determination of biologically active phenols and polyphenols in various objects by chromatographic techniques. // *Russ.Chem.Rev.* – 2007. –№76 – 79-90 P.
13. Middleton Jr.E., Kandaswami C., Theoharides T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. // *Pharmacol. Rev.* – 2000 - V. 52, № 4 – P. 673-751.
14. H.Nishino, M.Murakoshi, X.Y.Mou, S.Wada, M.Masuda, Y.Ohsaka, Y.Satomi, K.Jinno. Cancer prevention by phytochemicals. // *Oncology* – 2005. - №69 – P. 38-40.
15. Joshipura K.J., Hu F.B., Manson J.E., Stampfer M.J., Rimm E.B., Speizer F.E., Colditz G., Ascherio A., Rosner B., Spiegelman D., Willett W.C. The Effect of Fruit and Vegetable Intake on Risk for Coronary Heart Disease. // *Ann. Intern. Med.*, - 2001. – V.134, №12. – P.1106-1114.
16. І. В. Ковалевська Визначення фізико-хімічних характеристик кверцетину Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики (2014), №1 (14) С. 9–11

17. Arlorio M., Coi'sson J.D., Travaglia F., Varsaldi F., Miglio G., Lombardi G., Martelli A. Antioxidant and biological activity of phenolic pigments from Theobroma cacao hulls extracted with supercritical CO₂. // Food Res. Int. – 2005. – V38,№8. - P. 1009-1014.
18. Júlio César Moreira Brito William Gustavo Lima Waleska Stephanie da Cruz Nizer Quercetin as a potential nutraceutic against coronavirus disease 2019 (COVID-19)// Ars Pharm. 2021;62(1):85-89
doi: 10.30827/ars.v62i1.15684
19. Goncalves C., Dinis T., Batista M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. // Phytochemistry . - 2005. - V.66,№ 1. - P. 89-98.
20. Higdon JV, Frei B. Coffee and health: a review of recent human research. //Rev Food Sci Nutr. – 2006. - V46,№2. - P. 101-123.
21. Пушкарьова, Я. М., Зайцева, Г. М. / Основи хімічної метрології // 2024. 115 с.
22. Kuntić, V.a, Pejić, N.a, Mičić, S.a, Vukojević, V.b, Vujić, Z.a, Malešev, D.a Determination of quercetin in pharmaceutical formations via its reaction with potassium titanyloxalate. Determination of the stability constants of the quercetin titanyloxalato complex. // Journal of the Serbian Chemical Society. - 2005. - , V.70,№ 5. - P. 753-763
23. Бельтюкова С.В., Бичкова А.А. Сорбційно-люмінесцентне визначення кверцетину у лікарських рослинах. - Праці Одеського політехнічного університету. // Одеський національний політехнічний університет- 2008. - №2. - С. 242-246.
24. Juan Juan Ren, Hai Yan Liu, Yu Hong Hao, Pin Gang He, Yu Zhi Fang. Determination of resveratrol in red wine by solid phase extraction-flow injection chemiluminescence method. // Chinese Chemical Letters. - 2007. - V.18,№ 8. - P. 985–988.

25. Слепченко Т.Б. Контроль якості біологічно активних добавок методами вольтамперометрії. Визначення вітамінів В1, В2, С, Е. і кверцетина // Хім.-фарм. Журн., - 2005. – Т. 39, № 3. – С.54-56.
26. Makhotkina O., Kilmartin P.A. The use of cyclic voltammetry for wine analysis: Determination of polyphenols and free sulfur dioxide. // *Analytica Chimica Acta.* – 2010. – V.668.- P. 155–165.
27. Zielinska D., Nagels L., Piskula M.K. Determination of quercetin and its glucosides in onion by electrochemical methods. // *Analytica Chimica Acta.* – 2008. – V.617.- P. 22-31.
28. Zhi Chen, Jianxia Zhang, Gang Chen. Simultaneous determination of flavones and phenolic acids in the leaves of *Ricinus communis* Linn. by capillary electrophoresis with amperometric detection. // *Journal of Chromatography B.* - 2008. – V.863.- P. 101-106.
29. Fengxia Deng, S. William Zito. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations. // *Journal of Chromatography A.* - 2003. – V.986.- P. 121-127.
30. Francisco Maria Leonora dL., Resurreccion A.V.A. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) procedure for the simultaneous determination of phenolic compounds in peanut skin extracts. // *Food Chemistry.* - 2009. – V.117.- P. 356-363.
31. Porgali Esra, Büyüktuncel Ebru. Determination of phenolic composition and antioxidant capacity of native red wines by high performance liquid chromatography and spectrophotometry methods.// *Food Research International.* - 2012. – V.45.- P. 145-154.
32. Dmitrienko S.G., Apyari V.V., Kudrinskaya V.A., Stepanova A.V. Preconcentration of flavonoids on polyurethane foam and their direct determination by diffuse reflectance spectroscopy. // *Talanta.* – 2012. – V.102.- P. 132-136.

33. Yamaguchi, L. F., Vassao, D. G., Kato, M. J., Di Mascio, P., Biflavonoids from Brazilian pine *Araucaria angustifolia* as potential protective agents against DNA damage and lipoperoxidation. // *Phytochemistry* . – 2005. – V.66 - P. 2238-2247.
34. Халаф В.А., Зайцев В.М. Пробовідбір та пробопідготовка в хроматографії: навч. посіб. для студ. Вищ. навч. закл. – К.: Вид-во – 2010 – 280 с.
35. Валідація аналітичних методик і випробувань. Державна Фармакопея України. Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». 1-е видання. Харків : РІРЕГ, 2001. С.58 – 67. Доповнення 1. 2004. С. 2 – 4.
36. Георгіянц В.А. Валідація аналітичних методик у фармації : теорія, нормативні аспекти, проблеми практики. В.А. Георгіянц. О.А. Євтіфєєва. *Фармацевтичний часопис*. 2007. №2. С.13 – 18.



ІДЕНТИФІКАЦІЯ ТА КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КВЕРЦЕТИНУ В ДІСТИЧНИХ ДОБАВКАХ ХРОМАТОГРАФІЧНИМ МЕТОДОМ

Зайцева Галина Миколаївна,

к.х.н, доцентка

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Коноплицька Олена Петрівна,

к.х.н, доцентка

Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Головко Вікторія Олексіївна,

студентка

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця



Кверцетин один із найважливіших представників групи флавоноїдів, який широко використовується як біологічно активний компонент різноманітних лікарських засобів, дієтичних добавок завдяки протипухлинній, протизапальній та протинабряжувальній, стабілізації клітинних мембран, зниженню проникності капілярів, гальмуванню процесу старіння клітин шкіри, міокарда, покращенню розумової діяльності тощо. Навряд чи знайдуться інші речовини, що володіють настільки різноманітною оздоровчою дією на організм людини.

Для визначення вмісту кверцетину, як правило, застосовують фізико-хімічні методи аналізу, зокрема: колориметричні, спектрофотометричні, люмінесцентні, сорбційно-люмінесцентні, електрохімічні методи тощо. Мала вибірковість вказаних методів потребує при визначенні індивідуальних флавоноїдів їх попереднього розділення чи концентрування. Тому метод високоєфективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) є пріоритетним для визначення поліфенолів, в тому числі і кверцетину. Як правило, перед хроматографуванням поліфенолів необхідно провести прободіготовку-очищення, розділення і концентрування. З цією метою застосовують методи рідинно-рідинної і твердофазної екстракції.

У даній роботі запропоновано як твердофазний екстракт (ТФЕ) силікагель модифікований четвертинною амонійною сіллю ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$). З огляду на існування кверцетину у йонній формі в області $\text{pH}=5\text{-}7$, можна припустити, що такий ТФЕ покращить ефективність вилучення кверцетину за рахунок іон-іонних взаємодій.

Метою даної роботи було дослідити перспективи використання твердофазного екстрагенту на основі силікагелю C_{18} модифікованого четвертинною амонійною сіллю для концентрування кверцетину з розчинів лікарських засобів перед стадією його рідинно-хроматографічного ідентифікування чи/та визначення.

Об'єктом дослідження обрано дієтичну добавку антиоксидантної дії Дигідрокверцетин ДТК G 1500 мг краплі під язик.

32

Визначення вмісту кверцетину у розчинах проводили на модульному рідинному хроматографі Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, США).

В роботі використано патрони для твердофазної екстракції (ТФЕ) фірми , що готували шляхом заповнення стандартного пластикового картриджа водно-метанольною суспензією, яка містила 0,1 г сорбенту.

Процеси сорбції/десорбції кверцетину вивчали шляхом пропускання стандартних розчинів через патрони Agilent з фазою C_{18} та патрони із фазою $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ зі швидкістю 1 мл/хв в динамічному режимі. Вміст кверцетину в елюаті визначали хроматографічним методом. За різницею початкового та рівноважного вмісту кверцетину в розчині елюату розраховували ступінь його вилучення.

Методом стандартних добавок та за спектрами оптичного поглинання ідентифікували кверцетину при довжині хвилі детектування 369 нм.

Встановлено залежність ступеня вилучення кверцетину на $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ від кислотності розчину та порівняно з умовами вилучення на $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. Показано, що кверцетин вилучається сорбентом $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ значно краще, ніж $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$. Ефективність $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ пояснюється участю у процесі сорбції як гідрофобних октадецильних груп ТФЕ, так й груп четвертинної амонійної солі. Встановлено, що із збільшенням іонізованості молекул кверцетину ефективність його вилучення зростає і досягає максимуму при $\text{pH}\geq 5,0$.

Досліджено процес десорбції кверцетину та ВЕРХ визначення його в елюаті. Встановлено, що кількісна десорбція кверцетину досягається застосуванням метанольного розчину із вмістом 0,5% хлоридної кислоти.

Ідентифікацію кверцетину проводили шляхом порівняння спектрів поглинання чистих речовин із положенням піків стандартів в методі добавок. Час утримування кверцетину без та з прободіготовкою співпадає.

Встановлено пропорційність інтенсивності піків на хроматограмі зі збільшенням концентрації кверцетину у розчині. Отримані результати дали підґрунтя для розробки методики кількісного визначення вмісту кверцетину у об'єкті дослідження методом ОФ-ВЕРХ з використанням на стадії прободіготовки $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$.

Отримані результати свідчать про доцільність використання $\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{ЧАС}$ для концентрування кверцетину з розчинів лікарських засобів перед стадією його рідинно-хроматографічного ідентифікування чи/та визначення. Запропоновано методику ідентифікації та кількісного визначення кверцетину методом ОФ-ВЕРХ.

SUMMARY

IDENTIFICATION AND QUANTITATION OF QUERCETIN IN MEDICINES AND DIETARY SUPPLEMENTS BY CHROMATOGRAPHIC METHOD

Quercetin is one of the most important representatives of the flavonoid group, which is widely used as a biologically active component of various medicines, dietary supplements due to its antitumor, anti-inflammatory and anti-edema effects, stabilization of cell membranes, reduction of capillary permeability, inhibition of the aging process of skin and myocardial cells, improvement of mental activity, etc. It is unlikely that there will be other substances that have such a diverse health-improving effect on the human body.

To determine the content of quercetin, as a rule, physicochemical methods of analysis are used, in particular: colorimetric, spectrophotometric, luminescent, sorption-luminescent, electrochemical methods, etc. The low selectivity of these methods requires their preliminary separation or concentration when determining individual flavonoids. Therefore, the high-performance liquid chromatography (HPLC) method is a priority for the determination of polyphenols, including quercetin. As a rule, before chromatography of polyphenols, it is necessary to carry out sample preparation-purification, separation and concentration. For this purpose, liquid-liquid and solid-phase extraction methods are used.

In this work, silica gel modified with a quaternary ammonium salt ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}/\text{QAS}$) is proposed as a solid-phase extractant (SFE). Given the existence of quercetin in the ionic form in the pH range of 5-7, it can be assumed that such a SFE will improve the efficiency of quercetin extraction due to ion-ion interactions.

The aim of this work was to investigate the prospects for using a solid-phase extractant based on silica gel C_{18} modified with a quaternary ammonium salt for the concentration of quercetin from drug solutions before the stage of its liquid chromatographic identification or/and determination.

The object of the study was the dietary supplement and medicine.

The content of quercetin was determined using a modular liquid chromatograph, Agilent 1200 Series (Agilent Technologies, USA).

The sorption/desorption processes of quercetin were analyzed by passing standard solutions through Agilent cartridges with a C₁₈ phase and cartridges with an SiO₂-C₁₈/QAS phase at a flow rate of 1 ml/min in dynamic mode. The quercetin content in the eluate was measured using a chromatographic method. The extraction efficiency was calculated based on the difference between the initial concentration and the equilibrium concentration of quercetin in the eluate solution.

Quercetin identification was performed using the method of standard additions and optical absorption spectra, with a detection wavelength of 369 nm.

The dependence of the degree of extraction of quercetin on SiO₂-C₁₈/QAS on the acidity of the solution and compared with the extraction conditions on SiO₂-C₁₈ was established. It was shown that quercetin is extracted by the SiO₂-C₁₈/QAS sorbent much better than SiO₂-C₁₈. The efficiency of SiO₂-C₁₈/QAS is explained by the participation in the sorption process of both hydrophobic octadecyl groups of SFE and groups of quaternary ammonium salt. It was established that with an increase in the ionization of quercetin molecules, the efficiency of its extraction increases and reaches a maximum at pH \geq 5.0.

The process of desorption of quercetin and HPLC determination of it in the eluate were investigated. It was determined that effective desorption of quercetin is achieved using a methanol solution containing 0.5% hydrochloric acid.

Quercetin was identified by comparing the absorption spectra of the pure compound with the positions of the peaks obtained using the standard addition method. The retention time of quercetin remained consistent both with and without sample preparation.

The findings confirm the suitability of SiO₂-C₁₈/QAS for concentrating quercetin from pharmaceutical solutions prior to its liquid chromatographic identification and/or quantification. A method for identifying and quantifying quercetin using RP-HPLC has been developed.