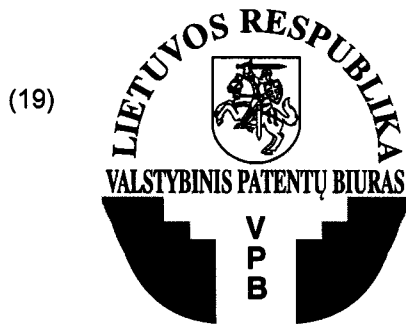




(10) **LT 6013 B**

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

- (11) Patento numeris: **6013** (51) Int. Cl. (2014.01): **B01D 15/00**
A61K 36/00
- (21) Paraiškos numeris: **2012 035**
- (22) Paraiškos padavimo data: **2012 05 18**
- (41) Paraiškos paskelbimo data: **2013 11 25**
- (45) Patento paskelbimo data: **2014 03 25**
- (62) Paraiškos, iš kurios dokumentas išskirtas, numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos numeris: —
- (86) Tarptautinės paraiškos padavimo data: —
- (85) Nacionalinio PCT lygio procedūros pradžios data: —
- (30) Prioritetas: —
- (72) Išradėjas:
Natalia KISELIOVA, RU
Yury GARIPOV, RU
Sergey PONKRATOV, RU
Viačeslavas MASLOVAS, LT
- (73) Patento savininkas:
UAB "ROKIŠKIO PRAGIEDRULIAI", Nepriklausomybės a. 22, Rokiškis, LT
- (74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Jurga PETNIŪNAITĖ, AAA Law, J.Jasinskio g. 16A, LT-03163 Vilnius, LT

- (54) Pavadinimas:
Ypatingai gryno dihidrokvercetino gamybos būdas

- (57) Referatas:

Šis išradimas priklauso chromatografinio (2R,3R)-dihidrokvercetino išskyrimo sričiai, biologiškai aktyvių papildų gamybai medicinos ir farmaciniais tikslais, taip pat maisto ir kosmetikos pramonei. Siūlomas naujas (2R,3R)-dihidrokvercetino aukšto našumo išgavimo būdas, kurio metu būtų gaunamas ypatingai grynas produktas. Dihidrokvercetino turinčią kietą žaliavą tirpina etilo spirito vandens tirpale, esant 20 - 29 °C temperatūrai, iki dihidrokvercetino dalis tirpale pasiekia 50 - 250 g/l. Po to vykdomas chromatografinis atskyrimas esant 100 - 500 kg/cm² slėgiui kolonėlėje su dinamiu ašiniu spaudimu, kur kolonėlėje yra užpildyta grįžamosios fazės sorbentu, kai sorbento eliuavimą vykdo iš anksto degazuotu ir modifikuotu etilo spirito vandens tirpalu. Eliuato frakcijų surinkimas vykdomas refraktometrinės ir masės spektrometrinės analizės būdais su po to sekančiu produkto kristalizavimu šaldant, filtracija ir liofilizacija. Šiuo būdu gaunamas produktas turi ne mažiau negu 99,9 % (2R,3R)-dihidrokvercetino.

Technikos sritis

Išradimas priklauso chromatografinio (2R,3R)-dihidrokvercetino išskyrimo sričiai, biologiškai aktyvių papildų gamybai medicinos ir farmaciniais tikslais, taip pat maisto ir kosmetikos pramonei.

Technikos lygis

(2R,3R)-dihidrokvercetinas ((+)-(2R,3R)-trans- dihidrokvercetinas), taip pat žinomas kaip „Taksifolinas“, priklauso bioflavonoidams ir yra natūralios kilmės etaloninis antioksidantas.

Yra žinomas flavonoidinių junginių išskyrimo iš augalinių žaliavų būdas, būtent proantocianidinų išskyrimo būdas (Patentas US Nr. 5912363, C01D 311/62, 1999). Šiuo būdu yra atliekamas kietų augalinių medžiagų ir vandens mišinio kaitinimas esant aukštam slėgiui ir sumažintam deguonies kiekiui, tirpalo separacija, filtracija ir adsorbcija bei po to sekantis adsorbuoto proantocianidino eliuavimas, poliarinio tirpiklio pagalba. Nors šis būdas leidžia išskirti flavonoidinius junginius, kuriems priskiriamas ir dihidrokvercetinas, iš įvairių, daug antioksidantų turinčių augalinių medžiagų, tokių kaip vynuogių kauliukai, riešutų kevalai, medžio žievė ir daugelis kitų, visgi gaunamų produktų grynumas neviršija 88 - 92%.

Žinomi keli būdai išgauti dihidrokvercetinui, kurio grynumas būtų ne daugiau negu 97%.

Vienu būdu dihidrokvercetinas yra išgaunamas iš susmulkintos lapuočių medienos, ekstrahuojant organiniu tirpikliu iš karto po to, kai žaliava apdorojama vandeniu, toliau garinant ekstraktą ir kristalizuojant iš karšto vandens (Patentas PΦ N 2038094, A 61 K 35/78, 1995).

Kitu būdu dihidrokvercetinas yra išgaunamas vykdant lapuočių medienos pjuvenų ekstrakciją kaitinant vandeniu, atšaldant, filtruojant ir valant poliamido sorbentu, eliuuojant produktą etilacetatu ir kristalizuojant iš karšto vandens. (Patentas PΦ N 2000797, A 61 K 35/78, 1993).

Dar kitu būdu dihidrokvercetas yra išgaunamas apdorojant lapuočių medieną 96,6% etilo spiritu 5 kartus. Prieš apdorojant, mediena yra susmulkinama iki 1-5 mm dydžio dalelių. Toliau, 30-60 minučių, pastoviai maišant, yra vykdoma ekstrakcija esant 50-60°C temperatūrai tol, kol yra gaunamas norimas produktas. Gavus ekstraktą yra vykdoma jo filtracija ir propilenglikolio pridėjimas. Iš gauto mišinio pašalinus etilo spiritą, į gautą junginį yra dedamas 5% natrio chlorido tirpalas. Išmaišius ir išfiltravus, gautas filtratas yra praleidžiamas pro poliamido sorbentą tam, kad būtų nusodintas bioflavonoidinis kompleksas. Sorbentą praplovus distiliuotu vandeniu ir praskiestu etilo spirito vandens tirpalu, jis yra džiovinamas ir iš jo yra išplaunamas bioflavonoidinis kompleksas. Išradimas leidžia padidinti bioflavonoidinio komplekso kokybę, iš jo pašalinant nepageidaujamą medžiagą (Patentas PΦ 2186097, C11B9/00, A23L1/30, A23L1/29, 2001).

Bendras pateiktų būdų trūkumas yra tas, kad gautame produkte esama įvairios kilmės pašalinių medžiagų, tarp jų ir flavonoidinių junginių.

Yra žinomas aukšto grynumo dihidrokvercetino gavimo būdas, kurio metu yra vykdomas išankstinis lapuočių medienos apdorojimas verdančiu vandeniu. Sekantys žingsniai apima acetono ekstrakciją vandens tirpalu ir vandens-acetono ekstrakto išvalymą skysčių chromatografija naudojant grįžamosios fazės Sverisorb C2 - C18 tipo sorbentus, kurių dalelių dydis yra 5 - 10 μm, ir kaip judriąją fazę naudojant 30 - 50% acetono tirpalą 0,1% trifluor-acto rūgšties tirpale bei pašalinant acetoną garinimo būdu. Techninis rezultatas - gaunamas didesnio negu 99,5% grynumo dihidrokvercetas (Patentas PΦ № 2114631 A61K35/78, C07D311/32, 1997 m.).

Esminiai šio būdo trūkumai yra proceso sudėtingumas ir su tuo susijęs nepakankamas produkto gamybos našumas; be to, yra nežinoma dihidrokvercetino stereoizomerų dalies proporcija gaunamame produkte.

Šioje paraiškoje pateiktam ypatingai gryno dihidrokvercetino gavimo būdui pats artimiausias yra būdas, kurio metu alifatinio spirito C₁-C₃ vandens tirpale yra gaunamas dihidrokvercetino turinčios žaliavos tirpalas, esant 1–20 % tūrio spirito koncentracijai tirpale. Taip pat, termostatinėje kolonėlėje yra atliekami vienas ar keli chromatografijos ciklai su sorbentu, pastarąjį eliuuojant alifatinio spirito C₁-C₃ vandens tirpalu, kurio koncentracija yra ne daugiau negu 12-30 % tūrio. Proceso pabaigoje, atlikus eliuato garinimą, gautasis produktas yra džiovinamas. Šio būdo

privalumas yra aukštas gaunamo produkto grynumas: 98,5 - 99,5 %. (Патент РФ № 2349330 A61K36/00, B01D15/08, B01D15/42, 2007 г.)

Tarp jo esminių trūkumų yra proceso sudėtingumas, nepakankamai aukšta 89-93% produkto išeiga, antioksidantinis aktyvumas, kuris yra susijęs su visų optinių dihidrokvercetino izomerų buvimu gautame produkte, ir nedidelis gaunamo tirpalo išeigos greitis - 20 ml/min.

Be to, prie visų aprašytų chromatografinio (2R,3R)-dihidrovercetino išgavimo būdų esminių trūkumų reikia priskirti ir srautinės ultravioletinės detekcijos naudojimą, dėl kurios įvyksta dalinis produkto skilimas.

Šio išradimo tikslas yra sukurti (2R,3R)-dihidrovercetino aukšto našumo išgavimo būdą, kurio metu būtų gaunamas ypatingai grynas produktas.

Išradimo aprašymas

Našus, ypatingai gyno (2R,3R)-dihidrovercetino gavimas yra pasiekiamas etilo spirito vandens tirpale, kurio koncentracija yra 20 - 95 % tūrio esant 20 - 29°C temperatūrai, tirpinant kieto dihidrokvercetino turinčią žaliavą tol, kol dihidrokvercetino sudėtis tirpale pasiekia 50 - 250 g/l, po to vykdant chromatografinį atskyrimą kolonėlėje su dinaminiu ašiniu slėgiu esant 100 - 500 kg/cm² slėgiui, kur kolonėlė yra užpildyta grįžtamos fazės sorbentu su padidintu poliarinių jungčių išlaikymu, kur sorbento dalelių dydis yra 10-20 μm, o porų dydis 120-200 Å, toliau vykdant sorbento eliuavimą iš anksto degazuotu ir modifikuotu etilo spirito vandens tirpalu, eliuato frakcijų surinkimą vykdant refraktometrinės ir masės spektrometrinės analizės būdu, o proceso pabaigoje atliekant produkto kristalizaciją šaldymu, filtraciją ir liofilizaciją.

Eliuento modifikavimą yra geriau vykdyti metanoliu, izopropanoliu, acto rūgštimi, skruzdžių rūgštimi, kai jų sudėtis eliuate yra 0,001 - 5 % tūrio.

Šiuo būdu gautas produktas turi ne mažiau 99,9 % ((+)-(2R,3R)-trans-dihidrovercetino.

Vykdydami pirminius šio būdo laboratorinius bandymus, išradimo autoriai netikėtai pastebėjo, kad gautame produkte yra vien tik (2R,3R)-dihidrovercetas ir

visiškai nėra jo optinių stereoizomerų; buvo vykdomas dihidrokvercetino degazuoto vandens-spirito tirpalo chromatografinis atskyrimas, temperatūrų diapazone 20 - 29⁰ C ir esant 100 - 500 kg/cm² slėgiui kolonėlėje su dinaminiu ašiniu slėgiu, kur kolonėlė buvo užpildyta grįžtamos fazės sorbentu su padidintu poliarinių jungčių išlaikymu, kur sorbento dalelių dydis buvo 10-20 μm, o porų dydis buvo 120-200 Å, kur sorbento eliuavimas buvo vykdomas modifikuotu, iš anksto degazuotu etilo spirito vandens tirpalu, o eliuato frakcijų surinkimas buvo vykdomas refraktometrinės ir masės spektrometrinės analizės būdu, po to sekant kristalizacijos šaldymu, filtracijos ir liofilizacijos žingsniams.

Etilo spirito 20 - 95 % tūrio koncentracijos ir 50 - 250 g/l dihidrokvercetino tūrio gaunamame tirpale reikšmių diapazonai parinkti pagal proceso maksimalaus našumo sąlygą, dėl skirtingo pirminio techninio dihidrokvercetino ir priemaišų tirpumo.

Išankstinis gaunamo vandens-spirito dihidrokvercetino ir eliuato tirpalo degazavimas leidžia išvengti produkto oksidacijos dėl ištirpusio deguonies ir ženkliai padidina (2R,3R)-dihidrokvercetino refraktometrinio ir masės spektrometrinio nustatymo eliuate tikslumą, o tai leidžia iš esmės padidinti gamybos našumą, produkto grynumą ir jo išeigą.

Chromatografinio atskyrimo proceso slėgio reikšmių diapazonas, 100-500 kg/cm², buvo nustatytas preparacinėje kolonoje YMC DAU 100-700 su dinaminiu ašiniu spaudimu, naudojant grįžtamos fazės sorbentą su padidintu poliarinių jungčių išlaikymu YMC ODC-AQ-HG, kurio dalelių dydis buvo 10-20 μm, o porų dydis 120-200 Å. Pastarieji buvo nustatyti atsižvelgiant į produkto prigimtį, į eliuato padavimo maksimalų greitį, 150 - 250 ml/min diapazone, ir kurie buvo susiję su galimu trijų dihidrokvercetino stereoizomerų, turinčių kitokį poliariškumą negu (2R,3R)-dihidrokvercetas, buvimu.

Ypač svarbu yra tai, kad gauto dihidrokvercetino tirpinimo ir jo chromatografinio išskyrimo procesai vyktų 20 - 29⁰ C temperatūrų diapazone. Jeigu procesų temperatūra bus žemesnė negu 20⁰ C, tuomet bus pastebimas ženklus proceso našumo sumažėjimas, o jeigu temperatūra viršys 29⁰ C, tuomet išaugs produkto stereoizomerizacijos tikimybė.

Eliuato frakcijų surinkimas refraktometrinės, spektrometrinės ir masės

spektrometrinės analizės būdais vienu metu, netaikant kruopščios distiliacijos kolonėlėje, leidžia antrą kartą panaudoti tirpalą iš eliuato ir ženkliai padidinti frakcijos su molekulinio svoriu, 100 – 1000 vienetų diapazone, analizės tikslumą, taip pat vykdyti atskirą priemaišų, kaip švarių produktų išskyrimą. Nurodytos procedūros leidžia padidinti produkto išeigą iki 99,5 - 99,9 %.

Iš eliuato frakcijos, gautos po chromatografinio atskyrimo, etilo spiritas ir vanduo yra pašalinami plokštelinio-rotorinio siurblio vakuume, rotoriumi Hei-VAP Value HB/G3 Heidolph, esant 30 - 30⁰ C temperatūrai. Iš likusiųjų frakcijų tirpiklis distiliuojamas rotoriumi Laborota 20 (LR 20 eco).

Surinktas ir į specialias talpas sufasuotas ((2R,3R)-dihidrokvercetinas yra perkeliamas į liofilizatorių, kur specialios fasavimo talpos automatiškai yra užsandarinamos po džiovinimo giliame vakuume, esant -55⁰ C temperatūrai.

Produkto cheminis grynumas yra tiesiogiai kontroliuojamas chromatografinės analizės metu, kuomet eliuato srautas kreipiančiąja yra padalinimas nukreipiant į frakcijų kolektorių ir į detektorius. Refraktometriniai, spektrometriniai ir masės spektrometriniai detektoriai yra naudojami vienu metu. Produktas papildomai yra tikrinamas dujų-garų osmometru K-7000 KNAUER tam, kad nustatyti ar neturi polimerų (surištų dihidrokvercetino monomerų).

Antioksidantinis aktyvumas vertinamas spektrofiorimetru FLUOstar Optima pagal žinomą metodiką ORAC (patentas US Nr. 7132296, G01N 33/00, 2006).

Siūlomu būdu gautas ne mažesnio negu 99,9% grynumo, neatsižvelgiant į rišamąjį vandenį, (2R,3R)-dihidrokvercetinas yra laikomas -30⁰ C temperatūroje.

Eliuato modifikavimas vykdomas metanoliu, izopropanoliu, acto rūgštimi, skruzdžių rūgštimi ar kitais lakiais junginiais, suderinamais su masės spektrometriniu detektoriumi, kol jų kiekis eliuate tampa 0,001 - 5 % tūrio, dėl ko sumažėja dihidrokvercetino sulaikymo grįžamosios fazės sorbente laikas ir tuo pačiu ženkliai padidėja šio būdo našumas.

Šiuo būdu gautas produktas turi ne mažiau negu 99,9 % ((+)-(2R,3R)-trans-dihidrokvercetino, neatsižvelgiant į rišamąjį vandenį.

Išradimo panaudojimo variantai, patvirtinantys jo pramoninį pritaikomumą, iliustruojami sekančiais pavyzdžiais.

1 pavyzdys

400 ml 50% spirito tirpale ištirpiname 62 gramus pusprodukčio, turinčio 70,07 % (2R,3R)-dihidrokvercetino, 3,14 % aromadendrino, 0,96 % eriodiktiolio, 0,39 % kvercetino, 0,15 % naringenino, 0,01 % kempferolio ir 0,24 % pinocembrino.

Į 100x350 mm koloną su dinaminiu ašiniu spaudimu, užpildytą sorbentu YMC ODC-AQ-HG, kurio dalelių dydis yra 20 µm, o porų skersmuo yra 200 Å, 200 ml/min. greičiu yra leidžiamas aukščiau pagamintas mėginys. Po to per koloną yra praleidžiamas eliuatas (etanolis : metanolis : vanduo santykiu 50 : 1 : 49) 200 ml/min. greičiu. Iš kolonos pagrindinis kanalas yra nukreiptas į frakcijų kolektorių, o papildomas – į refraktometrinį ir masės spektrometrinį detektorius. Detektorių rodmenų pagrindu yra surenkama (2R,3R)- dihidrokvercetino turinti frakcija.

Surinkta frakcija yra garinama vakuume iki visiško spirito pašalinimo, po to yra atvėsinama iki 4⁰ C temperatūros, o iškritusios nuosėdos yra filtruojamos ir džiovinamos liofilizatoriuje, esant - 55⁰ C temperatūrai.

Tokiu būdu gaunama 43,1 g tikslinio produkto, turinčio 99,60 % (2R,3R)-dihidrokvercetino ir 0,35 % (2S,3S)-dihidrokvercetino. (2R,3R)-dihidrokvercetino išeiga sudaro 98,5%.

2 pavyzdys

300 ml 70% spirito tirpale ištirpiname 82 gramus pusprodukčio, turinčio 88,09 % (2R,3R)-dihidrokvercetino, 2,49% aromadendrino, 0,86 % eriodiktiolio, 0,59 % kvarcetino, 0,19 % naringenino, 0,03 % kempferolio ir 0,07 % pinocembrino.

Į 100x350 mm koloną su dinaminiu ašiniu spaudimu, užpildytą sorbentu YMC ODC-AQ-HG, kurio dalelių dydis yra 10 µm, o porų skersmuo yra 120 Å, 150 ml/min.

greičiu yra leidžiamas aukščiau pagamintas mėginys. Po to per koloną praleidžiamas eliuatas (etanolis : izopropanolis : vanduo santykiu 70 : 5 : 25) 150ml/min. greičiu. Iš kolonos pagrindinis kanalas yra nukreiptas į frakcijų kolektorių, o papildomas – į refraktometrinį ir masės spektrometrinį detektorius. Detektorių rodmenų pagrindu yra surenkama (2R,3R)- dihidrokvercetino turinti frakcija.

Surinkta frakcija yra garinama vakuume iki visiško spirito pašalinimo, po to yra atvėsinama iki 4⁰ C temperatūros, o iškritusios nuosėdos yra filtruojamos ir džiovinamos liofilizatoriuje esant - 55⁰ C temperatūrai.

Tokiu būdu gaunama 71,6 g produkto, turinčio 99,81 % (2R,3R)-dihidrokvercetino ir 0,014 % (2S,3S)- dihidrokvercetino. (2R,3R)-dihidrokvercetino išeiga sudaro 99,0%.

3 pavyzdys

500 ml 40% spirito tirpale ištirpiname 80 gramus pusprodukčio, turinčio 92,43 % (2R,3R)-dihidrokvercetino, 2,38% aromadendrino, 0,87 % eriodiktioplio, 0,53 % kvercetino, 0,18 % naringenino, 0,03 % kempferolio ir 0,07 % pinocembrino.

Į 100x350 mm koloną su dinaminiu ašiniu spaudimu, užpildytą sorbentu YMC ODC-AQ-HG, kurio dalelių dydis yra 10 μm, o porų skersmuo yra 120 Å, 250 ml/min. greičiu yra leidžiamas aukščiau pagamintas mėginys. Po to, per koloną praleidžiamas eliuatas (etanolis : acto rūgštis : vanduo santykiu 40 : 1 : 59) 250 ml/min. greičiu. Iš kolonos pagrindinis kanalas yra nukreiptas į frakcijų kolektorių, o papildomas – į refraktometrinį ir masės spektrometrinį detektorius. Detektorių rodmenų pagrindu yra surenkama (2R,3R)- dihidrokvercetino frakcija.

Surinkta frakcija yra garinama vakuume iki visiško spirito pašalinimo, po to yra atvėsinama iki 4⁰ C temperatūros, iškritusios nuosėdos yra filtruojamos ir džiovinamos liofilizatoriuje.

Tokiu būdu gaunama 72,76 g tikslinio produkto, turinčio 99,91 % (2R,3R)-dihidrokvercetino, 0,012 % (2S,3S)-dihidrokvercetino. (2R,3R)-dihidrokvercetino išeiga sudaro 99,0%.

Esminiai išradimo požymiai taip pat yra:

- gaunamo dihidrokvercetino tirpalo paruošimo režimas, o būtent etilo spirito vandens tirpale reikšmė yra 20-95%, dihidrokvercetino dalis vandens tirpale yra 50 - 250 g/l ir tirpinimo temperatūra yra 20 - 29⁰ C;

- išankstinis gauto dihidrokvercetino vandens-spirito tirpalo degazavimas;

- chromatografinio atskyrimo proceso slėgio diapazonas - 100 - 500 kg/cm²;

- grįžtamosios fazės sorbento su padidintu poliarinių jungčių išlaikymu, kurio dalelių dydis yra 10-20 μm, o porų dydis yra 120-200 Å, naudojimas;

- išankstinis eliuato degazavimas;

- išankstinis eliuato modifikavimas;

- eliuato modifikavimas metanolio, izopropanolio, acto rūgštimi, skruzdžių rūgštimi, kol jų dalis eliuate sudaro 0,001 - 5 % tūrio;

- eliuato frakcijų surinkimas, vykdomas vienu metu atliekamų refraktometrinės, spektrometrinės ir masės spektrometrinės analizių būdu su srautų atskyrimu;

- produkto kristalizavimas šaldymu, filtracija ir liofilizacija.

Taigi, techninis šio išradimo rezultatas yra ypatingai švaraus dihidrokvercetino gavimo būdas, kuomet gaunamas vien tik ((+)-(2R,3R)-trans-dihidrovercetinas, kurio kiekis yra ne mažesnis negu 99,9 %, (2R,3R)-dihidrovercetino išeiga - 99-99,5%, o tirpalo išeigos našumas yra 150 - 250 ml/min diapazone, taip pat ir produktas, gautas nurodytu būdu.

Informacijos šaltiniai

1. Patentas US № 5912363 , C01D 311/62, 1999 m.
2. Patentas PΦ N 2038094, A 61 K 35/78, 1995 m.
3. Patentas PΦ N 2000797, A 61 K 35/78, 1993 m.
4. Patentas PΦ 2186097, C11B9/00, A23L1/30, A23L1/29, 2001 m.
5. Patentas PΦ № 2114631 A61K35/78, C07D311/32, 1997 m.
6. Patentas US № 7132296, G01N 33/00, 2006 m.

Išradimo apibrėžtis

1. Ypatingai gryno dihidrokvercetino gavimo būdas, dihidrokvercetino turinčią kietą žaliavą tirpinant etilo spirito vandens tirpale, kurio koncentracija yra 20 - 95 % tūrio esant 20 - 29⁰ C temperatūrai, iki dihidrokvercetino dalis tirpale pasiekia 50 - 250 g/l, po to vykdant chromatografinį atskyrimą esant 100 - 500 kg/cm² slėgiui kolonėlėje su dinaminiu ašiniu spaudimu, kur kolonėlė yra užpildyta grįžtamosios fazės sorbentu su padidintu poliarinių jungčių išlaikymu, kur sorbento dalelių dydis yra 10 - 20 μm, o porų dydis yra 120 - 200 Å, sorbento eliuavimą vykdant iš anksto degazuotu ir modifikuotu etilo spirito vandens tirpalu, eliuato frakcijų surinkimą vykdant refraktometrinės ir masės spektrometrinės analizės būdais su po to sekančiu produkto kristalizavimu šaldant, filtracija ir liofilizacija.

2. Būdas pagal 1 punktą, **b e s i s k i r i a n t i s** tuo, kad eliuato modifikavimas yra vykdomas metanolio, izopropanolio, acto rūgštimi, kol jų kiekis eliuate pasiekia 0,001 - 5 % tūrio.

3. Produktas, gautas būdu pagal 1 ir 2 punktą, turintis ne mažiau negu 99,9 % ((+)-(2R,3R)-trans-dihidrokvercetino.