



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 99549

(13) C2

(51) МПК

G01N 33/02 (2006.01)

G01N 33/04 (2006.01)

G01N 31/02 (2006.01)

G01N 30/14 (2006.01)

G01N 30/90 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21)	Номер заявки:	а 2011 04281	(56)	ТЕСЛЮК О.І. КОМПЛЕКСИ Eu(III) ТА Tb(III) З ПОХІДНИМИ ХІНОЛОНКАРБОНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ЗАСТОСУВАННЯ ЇХ В АНАЛІЗІ. АВТОРЕФЕРАТ дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук Одеса - 2001. [он-лайн], 2001 [знайдено 2012-04-17]. Знайдено в Інтернет: <URL: http://www.nbuv.gov.ua/ard/2000/00tlvxdk.zip Давиденко Н.К., Букивская Г.А. Сенсбилизация люминесценции ионов европия и тербия оротовыми кислотами в водных растворах Координац. химия. 1987. 13, № 5, с. 615-619. Давиденко Н.К., Рукивская Г.А. Комплексные соединения европия(III) и тербия(III) с оротовыми кислотами и их люминесцентные свойства Тез. докл. 15 Всес. Чугаев. совещ. по химии комплекс. соедин., 3-6 сент., 1985. Ч. 1. Киев. 1985, с. 255. Yang Chun, Huang Hanguo Fluorimetric Determination of Europium, Terbium and Dysprosium with Orotic or Isoorotic Acid. CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, Year 2003, Issue 9, Page 1079-1081 (abstract). Hallanger L.E., Laakso J.W. and Schultze M.O. OROTIC ACID IN MILK. J. Biol. Chem. 1953, 202: 83-89. Orotic acid salts as sources of orotic acid and various minerals added for nutritional purposes to food supplements 1. Scientific Opinion of the Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS). The EFSA Journal (2009) 1187, 1-25.
(22)	Дата подання заявки:	08.04.2011		
(24)	Дата, з якої є чинними права на винахід:	27.08.2012		
(41)	Публікація відомостей про заявку:	27.02.2012, Бюл.№ 4		
(46)	Публікація відомостей про видачу патенту:	27.08.2012, Бюл.№ 16		
(72)	Винахідник(и):	Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA), Лівенцова Олена Олегівна (UA), Теслюк Ольга Іванівна (UA)		
(73)	Власник(и):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039, Україна (UA), ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080, Україна (UA)		
(56)	Перелік документів, взятих до уваги експертизою:	Anastasi G. et al. Orotic acid: a milk constituent Enzymatic determination by means of a new microcalorimetric method. Talanta, 2000, Volume 52, Issue 5, P. 947-952. Кравченко Т.Б., Бельтюкова С.В., Грицай Т.Л., Полуэктов Н.С. Люминесцентные свойства оротата тербия и использование его в анализе. Укр. хим. журнал. - 1982, т. 48, № 9, с. 972-975.		

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ОРОТОВОЇ КИСЛОТИ В НАТУРАЛЬНОМУ МОЛОЦІ

UA 99549 C2

(57) Реферат:

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення оротової кислоти в молоці. Запропонований спосіб люмінесцентного визначення оротової кислоти у молоці оснований на використанні твердофазної сенсibiliзованої люмінесценції іона тербію(III) в комплексі з оротовою кислотою, яка реєструється у фазі сорбенту на пластинці для тонкошарової хроматографії. Інтенсивність люмінесценції сорбату, яка зростає у присутності неіоногенної речовини - тритону X-100, реєструють при рН 6,8-7,2. Вміст оротової кислоти визначають за градувальним графіком. Запропонований спосіб забезпечує підвищення селективності визначення і дозволяє знизити межу визначення оротової кислоти.

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення попередника піримідинових нуклеотидів - оротової кислоти у молоці.

Відомий спосіб визначення оротової кислоти методом катодної інверсійної вольтамперометрії з ртутним електродом "вісяча крапля" [Calvo L., Rodziguez Y., Vinagre F., Sanchez A., Fresenius Z. Anal. Chem., 1988, V. 330. №2, P. 146-148]. Спосіб передбачає попереднє адсорбційне накопичення оротової кислоти на краплинному Hg-електроді після пропускання через розчин азоту. Методика розроблена для чистих розчинів оротової кислоти і навряд чи відбуватиметься накопичення оротової кислоти на електроді при наявності в розчині інших органічних компонентів. Крім того, спосіб передбачає використання токсичної ртуті та газоподібного азоту, що ускладнює виконання аналізу.

Найбільш близьким до заявленого винаходу є спосіб визначення оротової кислоти (див. Кравченко Т.Б., Бельтюкова С.В., Грицай Т.Л., Полуэктов Н.С. Люминесцентные свойства оротата тербия и использование его в анализе. Укр. хим. журнал.-1982, т. 48, № 9, с. 972-975), оснований на реєстрації сенсibiliзованої люмінесценції іона тербію(III) у присутності оротової кислоти.

Визначення проводять наступним чином: у пробирку додають 1 мл розчину з вмістом оротової кислоти 0,5-15 мкг, додають 1 мл розчину хлориду тербію ($2 \cdot 10^{-2}$ моль/л), додають 5 мл диметилсульфоксиду, 0,4 мл 40 %-го водного розчину уротропіну і дистильованої води до 10 мл. Через 5 хв. реєструють інтенсивність люмінесценції розчину при 545 нм; вміст оротової кислоти визначають за допомогою калібрувального графіку або методом добавок.

Дане рішення вибране прототипом.

Прототип і винахід, що заявляється, мають такі спільні ознаки:

- відбір проби,
- взаємодія проби з хімічним реагентом,
- вимірювання аналітичного сигналу.

Проте спосіб, запропонований за прототипом, передбачає аналіз чистих розчинів оротової кислоти. Він не є селективним, тому що при аналізі харчових продуктів, що містять різні органічні компоненти, на інтенсивність люмінесценції іону Tb(III) впливають амінокислоти, піримідинові основи і інші складові. В результаті цього результати визначення будуть недостовірні. Спосіб передбачає також використання органічного розчинника - диметилсульфоксиду. Крім того, межа виявлення оротової кислоти, передбачена цим методом, недостатньо низька. Вона складає $5 \cdot 10^{-6}$ моль/л.

В основу винаходу поставлена задача створити спосіб, в якому за рахунок застосування відокремлення оротової кислоти з аналізованої проби на хроматографічній пластинці та використання твердофазної люмінесценції іону тербію(III) в тонкому шарі сорбенту на пластинці забезпечують підвищення селективності та зниження межі визначення оротової кислоти.

Поставлена задача вирішена в способі визначення оротової кислоти, що включає відбір проби, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, тим, що спочатку здійснюють відокремлення оротової кислоти методом тонкошарової хроматографії, відокремлену таким чином оротову кислоту піддають взаємодії в шарі сорбенту з іонами тербію(III) в присутності тритону X-100 та уротропіну при рН 6,8-7,2 і вимірюють інтенсивність люмінесценції іону Tb(III) в тонкому шарі сорбенту.

Новим у винаході, що заявляється, є використання реакції взаємодії оротової кислоти з іонами тербію(III), яка проходить у фазі сорбенту на пластинці для тонкошарової хроматографії, з метою відокремлення кислоти із розчину і підсилення сенсibiliзованої твердофазної люмінесценції іона Tb(III) у присутності неіоногенної поверхнево-активної речовини тритону X-100 та уротропіну при рН 6,8-7,2.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням технічного результату полягає в наступному.

Підвищення селективності визначення, зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Застосування методу тонкошарової хроматографії для відокремлення оротової кислоти.

Застосування такого прийому дозволяє поєднувати стадію попереднього відокремлення оротової кислоти в тонкому шарі сорбенту з отриманням сорбату комплексу, який проявляє люмінесцентні властивості в твердій фазі сорбенту, що дозволяє проводити селективне твердофазне люмінесцентне визначення оротової кислоти.

2. Застосування сорбції оротової кислоти в шарі сорбенту сприяє збільшенню інтенсивності люмінесценції сорбатів комплексів внаслідок зменшення безвипромінювальних втрат енергії збудження, що веде до зниження межі визначення оротової кислоти.

Сенсибілізована люмінесценція іона Tb(III) в шарі сорбенту посилюється у присутності неіоногенної поверхнево-активної речовини тритону X-100, що сприяє дегідратації утвореного комплексу і тим самим зменшенню безвипромінювальних втрат енергії збудження.

5 Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається при використанні проявного розчину з концентрацією Tb(III) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. При більших концентраціях спостерігається зростання інтенсивності люмінесценції "холостої" проби. Як проявний розчин використаний розчин хлориду Tb(III) з концентрацією $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) сорбату тербію(III) залежить від кількості тритону X-100 у розчині. Найбільша $I_{\text{люм}}$ виявляється в присутності тритону X-100 у розчині 0,2 %.

10 Сорбат комплексу Tb(III) з оротовою кислотою має люмінесцентні властивості в інтервалі значень рН від 5,5 до 8,5 з максимумом люмінесценції при рН 6,8-7,2. Для створення необхідного значення рН використовували розчин уротропіну 4 %-ого.

Як рухома фаза оптимальною виявилася суміш бензол:метанол:оцтова кислота у співвідношенні 10:5:1.

15 Вивчення впливу об'єму проби, що наноситься на пластинку, показало, що найкращий результат досягається при нанесенні проби об'ємом 2 мкл. При менших або більших кількостях проби плями на пластинці набувають витягнутої форми.

Приклад. Визначення оротової кислоти проводили в натуральному молоці.

20 Вплив білкових компонентів молока, що заважають, усували їх попереднім осадженням. Для цього проби натурального коров'ячого молока об'ємом 10 мл поміщали у мірні колби об'ємом 100 мл, обробляли 1 мл 1,7 моль/л розчином оцтової кислоти і 1 мл 1 моль/л розчином ацетату натрію, додавали 60 мл дистильованої води і нагрівали на водяній бані (40 °C) протягом 5 хвилин при перемішуванні. Потім охолоджували до кімнатної температури і доводили до мітки дистильованою водою, сирну масу фільтрували через подвійний паперовий фільтр "синя стрічка", заздалегідь оброблений гарячою водою.

Отриману сироватку попередньо розбавляли дистильованою водою в 5 разів. Для цього до 2 мл сироватки додавали 8 мл дистильованої води.

2 мл розбавленої проби наносили мікрошприцем на лінію старту хроматографічної пластинки розміром 30×80 мм. Паралельно на пластинку наносили стандартний розчин оротової кислоти. Пластинку поміщали в хроматографічну камеру з рухомою фазою (суміш бензолу:метанолу:оцтової кислоти у співвідношенні 10:5:1). Коли фронт розчинника досягав висоти 70 мм, пластинку витягали з камери і відмічали положення фронту розчинника. Отриману хроматограму висушували при температурі 40 °C протягом 2 хвилин і рівномірно послідовно обробляли пляму оротової кислоти проявними розчинами хлориду тербію ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), а потім тритону X-100 (0,2 %-им) і уротропіну 4 %-им. Ідентифікацію оротової кислоти на пластинці проводили за появою зеленої люмінесценції іону тербію(III) під люмінесцентною лампою зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{збудж}} = 365$ нм), візуально порівнюючи інтенсивність люмінесценції проби і стандарту.

40 Кількісне визначення оротової кислоти проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого виконували наступне. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину оротової кислоти і далі проводили хроматографування і проявлення хроматограми, як описано вище. Потім з пластинки вирізали плями з оротової кислоти, вміщували в кювету для твердих зразків і вимірювали $I_{\text{люм}}$ при $\lambda_{\text{випр}} = 545$ нм. За отриманими даними будували калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію оротової кислоти, а на осі ординат значення інтенсивності люмінесценції. За допомогою цього графіка визначали вміст оротової кислоти в аналізованій пробі.

В коров'ячому молоці знайдено 10 мкг/мл оротової кислоти.

50 Точність і відтворюваність визначення перевірена методом статистичної обробки результатів. При $n=5$ і $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення (S_r) складає 0,07-0,09. Межа виявлення оротової кислоти складає ($1 \cdot 10$ моль/л) $2 \cdot 10^{-3}$ мкг/мл.

Результати визначення оротової кислоти в молоці перевірена методом "введено-знайдено" (табл.), за допомогою якого показано правильність методики.

Таблиця

Результати визначення оротової кислоти в молоці методом "введено-знайдено" (мкг/мл)
(n=5, P=0,95)

Введено	Знайдено	Sr
-	10,1	0,09
10	20,2	0,09
25	34,8	0,08

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 Спосіб кількісного визначення оротової кислоти в натуральному молоці, що включає відбір проби, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що в пробі молока попередньо осаджують білкові компоненти, після чого здійснюють відокремлення оротової кислоти шляхом тонкошарової хроматографії, відокремлену таким чином оротову кислоту піддають взаємодії в шарі сорбенту з іонами тербію(III) в присутності тритону X-100 та уротропіну при рН 6,8-7,2 і вимірюють інтенсивність люмінесценції іону Tb(III) в тонкому шарі сорбенту.
- 10

Комп'ютерна верстка М. Ломалова

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

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