



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106437** (13) **U**
(51) МПК (2016.01)
G01N 30/00
G01N 33/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки:	u 2015 10650	(72) Винахідник(и):	Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA), Малинка Олена Валентинівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	02.11.2015	(73) Власник(и):	ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель:	25.04.2016		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	25.04.2016, Бюл.№ 8		

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ГЛУТАМАТУ НАТРІЮ

(57) Реферат:

Спосіб кількісного визначення глутамату натрію включає відбір проби, відокремлення глутамату натрію методом тонкошарової хроматографії, хімічну обробку проби і реєстрацію аналітичного сигналу. Відокремлений глутамат натрію піддають взаємодії з розчинами хлориду тербію (III), ципрофлоксацину та уротропіну при рН 6,5-7,5 в шарі сорбенту.

UA 106437 U

Корисна модель належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення глутамату натрію (ГН) - моноватрієвої солі аліфатичної дікарбонової амінокислоти (2-амінопентадіонової кислоти), в сушених кальмарах.

Відомий спосіб визначення амінокислот методом зворотно-фазової високоефективної рідинної хроматографії з одержанням фенілтіогідантоїнів амінокислот [див. Руденко А.О., Кардова Л.А. /Определение важнейших аминокислот в сложных объектах биологического происхождения методом обращённо-фазовой ВЭЖХ с получением фенилтиогидантоинов аминокислот /Сорбционные и хроматографические процессы. 2010. - Т. 10. - Вып. 2. - С. 223-230].

Спосіб передбачає кислотний гідроліз проб, модифікацію амінокислот розчином фенілізотіаціанату, додавання дистильованої води, фільтрацію крізь мембранний фільтр з діаметром пор 0,45 мкм і введення у хроматографічну колонку. Далі пробу хроматографують на колонці сумішшю 6,0 мМ розчину ацетату натрію з рН 5,5, 1 % розчину ізопропілового спирту в ацетонітрилі і 6,0 мМ розчину ацетату натрію з рН 4,05. Використовують ультрафіолетову детекцію при $\lambda=254$ нм. Чутливість визначення - 1 мкг/мл глутамінової кислоти.

Найбільш близьким до заявленої корисної моделі є спосіб кількісного визначення глутамату натрію в харчових продуктах оснований на реєстрації світлопоглинання глутамату натрію, посиленого 1 %-ним розчином нінгідрину методом постхроматографічної дериватизації [див. N. Krishna Veni, D. Karthika, M. Surya Devi, M.F. Rubini, M. Vishalini, Y.J. Pradeepa //Analysis of Monosodium 1-Glutamate in Food Products by High-Performance //Thin Layer Chromatography Journal of Young Pharmacists Volume 2, Issue 3, July-September 2010, P. 297-300].

Визначення проводять наступним чином: алюмінієві пластини, попередньо покриті силікагелем 60 GF254 були використані як стаціонарна фаза, а суміш метанол-хлороформ-мурашина кислота в співвідношенні 5: 5: 1(об'єм/об'єм) як рухома фаза. Кількісне визначення проводять методом постхроматографічної дериватизації з використанням 1 % - ного розчину нінгідрину, плями сканують за допомогою денситометра в режимі оптичної густини при $\lambda=485$ нм. Лінійність спостерігається в діапазоні концентрацій (0,4-1) мкг. Це рішення вибране прототипом.

Прототип і корисна модель, що заявляється, мають такі спільні операції:

- 1) відбір проби;
- 2) відокремлення глутамату натрію;
- 3) взаємодія проби з реагентом;
- 4) реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб, запропонований за прототипом, передбачає використання токсичних органічних розчинників - метанолу та хлороформу. Крім того, межа виявлення глутамату натрію, передбачена цим методом, недостатньо низька. Вона складає 0,85 мкг/мл.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб кількісного визначення глутамату натрію, в якому шляхом заміни реагентів забезпечити спрощення способу за рахунок виключення використання токсичних органічних розчинників - метанолу та хлороформу, зниження межі визначення та зменшення похибки визначення.

Поставлена задача вирішена в способі кількісного визначення глутамату натрію, який включає відбір проби, відокремлення глутамату натрію методом тонкошарової хроматографії (ТШХ), хімічну обробку проби і реєстрацію аналітичного сигналу тим, що відокремлений глутамат натрію піддають взаємодії з розчинами хлориду тербію (III), ципрофлоксацину та уротропіну при рН 6,5-7,5 в шарі сорбенту.

Новим у корисній моделі, що заявляється, є використання комплексу тербію (III) з ципрофлоксацином, який утворює з глутаматом натрію різнолігандний комплекс, в якому спостерігається значне зростання інтенсивності люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) іону тербію (III).

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням технічного результату складається в наступному. Виключення використання токсичних органічних розчинників, зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам.

1. Використанню як рухомої фази нетоксичних розчинників-етанол:вода, при використанні яких величина рухомості (R_f) складає 0,63.

2. Використанню сенсibilізованої люмінесценції іону тербію (III), яка виникає внаслідок внутрішньомолекулярної передачі енергії збудження від лігандів (ципрофлоксацину та глутамату натрію) на іону тербію (III).

Ципрофлоксацин має в ультрафіолетовій зоні спектру 2 смуги поглинання $\lambda_{\text{max}}=208$ нм та $\lambda_{\text{max}}=283$ нм ($\epsilon=8,7 \cdot 10^3$ и $2,7 \cdot 10^4$ дм³·моль⁻¹·см⁻¹ відповідно), що обумовлює ефективне поглинання світлової енергії лігандом. Триплетний рівень ліганду складає 21280 см⁻¹. Мабуть, у даному випадку виникає передача енергії збудження на енергетичний рівень тербію D4 (20500 см⁻¹). А введення у систему глутамату натрію надає можливості досягнути підвищення

інтенсивності люмінесценції завдяки утворенню різнолігандного комплексу і витисненню молекул води зі внутрішньої сфери комплексу (Фіг. 1), що запобігає процесам дезактивації енергії збудження і інтенсивність люмінесценції тербію (III) зростає.

Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається при використанні проявляючого розчину з концентрацією Tb (III) - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. При більших концентраціях спостерігається зростання інтенсивності люмінесценції "холостої" проби. Як проявляючий використано розчин хлориду Tb (III) з концентрацією $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л (Фіг. 2). Інтенсивність люмінесценції сорбату тербію (III) залежить від кількості ципрофлоксацину у проявляючому розчині. Найбільша $I_{\text{люм}}$ виявляється в присутності ципрофлоксацину - $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л (Фіг. 3).

Сорбат комплексу Tb (III) - ЦФ - ГН має люмінесцентні властивості в інтервалі значень pH від 5,5 до 8,5 з максимумом люмінесценції при pH 6,5 7,5. Для створення необхідного значення pH використовували розчин уротропіну 4 % - вого.

Як рухома фаза оптимальною виявилася суміш – етанол: вода у співвідношенні 7:3, $R_f=0,63$.

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.

Спосіб ілюструється графічними матеріалами, де:

фіг. 1 - спектр люмінесценції сорбату комплексу Tb(III) ЦФ в присутності (1) і у відсутності глутамату натрію (2);

фіг. 2 - залежність $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу Tb (III) - ЦФ - ГН від концентрації тербію; $C_{\text{цф}}=2 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{ГН}}=1 \cdot 10^{-3}$ М;

фіг. 3 - залежність $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу Tb (III) - ЦФ - ГН від концентрації ципрофлоксацину; $C_{\text{Тб}}=1 \cdot 10^{-3}$ М, $C_{\text{ГН}}=1 \cdot 10^{-3}$ М.

Приклад 1. Визначення глутамату натрію проводили в сушених кальмарах торговельної марки "Беринг".

Наважку зразка сушених кальмарів 5г екстрагували дистильованою водою протягом 1 години при кімнатній температурі при співвідношенні зразок: вода 1:1. Пластинки Silufol активували при 100 °С в сушильній шафі протягом 1 години. Аналізовану пробу в кількості 2 мкл наносили шприцем на лінію старту пластинки розміром 40×80 мм, паралельно на пластинку наносили стандартний розчин глутамату натрію. Як стандартний використовували водно-етанольний розчин (з об'ємною часткою етанолу 50 %) глутамату натрію ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л). Пластинку підсушували і розміщували в хроматографічній камері в рухомій фазі ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=7:3$). Коли фронт розчинника досягав висоти 70 мм, пластинку витягували з камери і відзначали положення фронту розчинника. Отриману хроматограму висушували і рівномірно обробляли проявником – розчином хлориду тербію ($1 \cdot 10^{-3}$ моль/л), ЦФ ($2 \cdot 10^{-3}$ моль/л), уротропіну 4 %-вим, після чого знову висушували. Ідентифікацію глутамату натрію на пластинці проводили по появі зеленої люмінесценції Tb(III) під люмінесцентною лампою зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{збудж}}=365$ нм), візуально порівнюючи $I_{\text{люм}}$ проби і стандарту. Кількісне визначення глутамату натрію проводили по калібрувальному графіку для побудови якого діяли таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину глутамату натрію і далі проводили хроматографування і прояву хроматограми, як описано вище. Потім з пластинки вирізали плями з глутаматом натрію, 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 глутамату натрію, а на осі ординат - значення інтенсивності люмінесценції. За допомогою цього графіка визначали вміст глутамату натрію в аналізованій пробі.

В сушених кальмарах знайдено 1,7 мг/г глутамату натрію (табл. 1). Точність і відтворюваність визначення перевірена методом статистичної обробки результатів. При $n=5$ і $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення (Sr) складає (8,0-9.2) %. Межа виявлення глутамату натрію складає ($1 \cdot 10^{-7}$ моль/л) $1,7 \cdot 10^{-2}$ мкг/мл.

Приклад 2, 3 здійснювали аналогічно прикладу 1, але у зразках кальмарів з іншим вмістом глутамату натрію та іншого виробника. Дані наведені в таблиці 1.

Результати визначення глутамату натрію в сушених кальмарах перевірена методом "введено-знайдено" (табл.2), за допомогою якого показана правильність способу, що заявляється.

Спосіб кількісного визначення глутамату натрію

Таблиця 1

Результати визначення глутамату натрію в сушених кальмарах (n=5, P=0,95)

№	Назва продукту	Торгова марка	Вміст глутамату натрію (мг/г)	S _r , %
1	кальмар сушений	"Беринг"	3,39±0,29	8,5
2	кальмар сушено-солений	"Премія"	3,82±0,34	9,0
3	щупальці кальмара, смужки, солено-сушений	"EUROGROUP"	1,70±0,16	9,2

Таблиця 2

Результати визначення глутамату натрію в сушених кальмарах методом "введено-знайдено" (мг/г) (n=5, P=0,95)

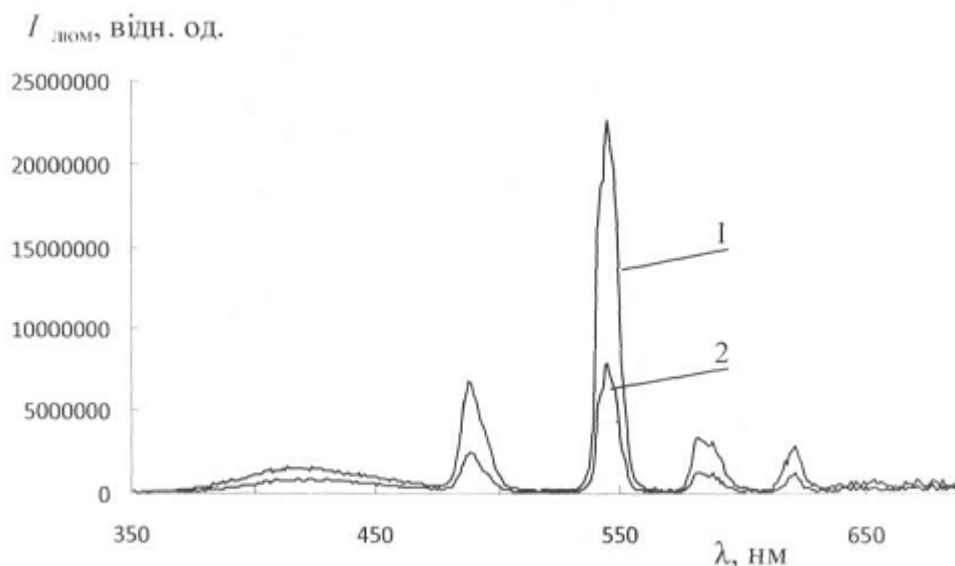
Введено	Знайдено	S _r , %
-	1,70±0,16	9,2
1,0	2,80±0,25	9,0
2,0	3,60±0,29	8,0

5

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб кількісного визначення глутамату натрію, що включає відбір проби, відокремлення глутамату натрію методом тонкошарової хроматографії, хімічну обробку проби і реєстрацію аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що відокремлений глутамат натрію піддають взаємодії з розчинами хлориду тербію (III), ципрофлоксацину та уротропіну при рН 6,5-7,5 в шарі сорбенту.

10



Фіг. 1

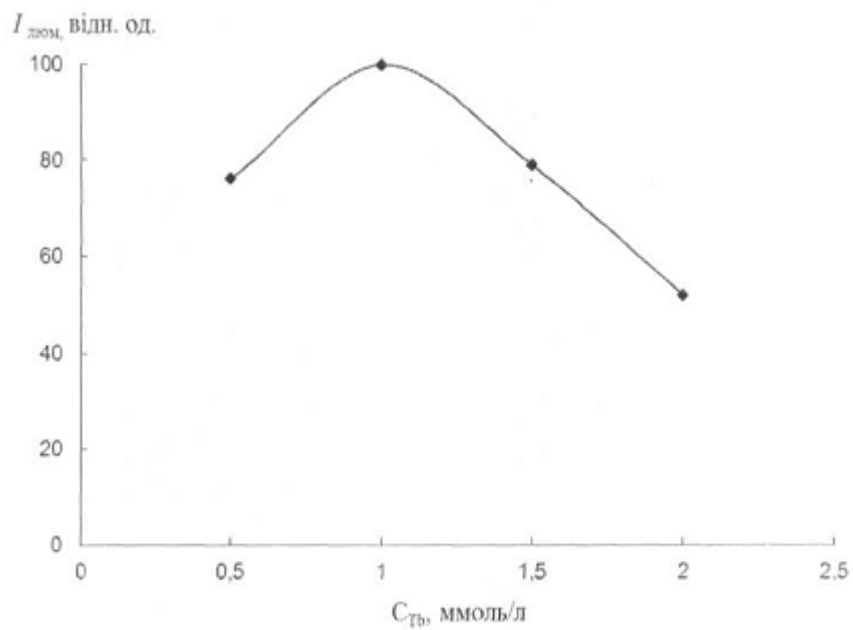


Fig. 2

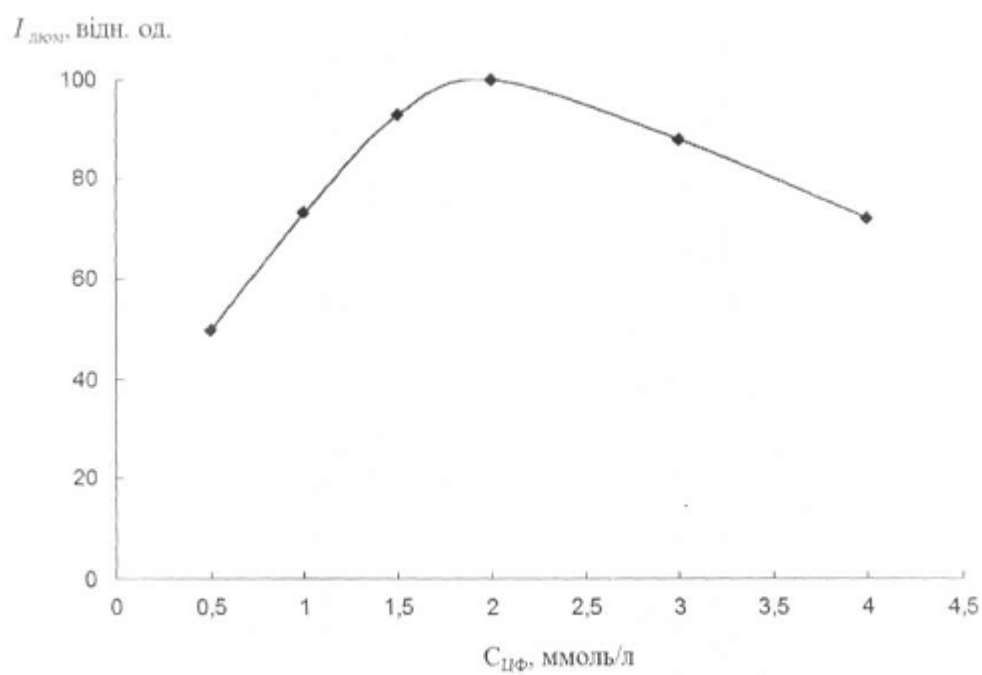


Fig. 3

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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

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