



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **43619** (13) **U**
(51) МПК (2009)
G01N 21/76

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ МОРИНА

1

(21) u200902630

(22) 23.03.2009

(24) 25.08.2009

(46) 25.08.2009, Бюл.№ 16, 2009 р.

(72) БЕЛІТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, БИЧ-
КОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ(57) Спосіб визначення морина, що включає відбір
проби, відокремлювання морина, взаємодію виді-

2

леного морина з хімічним реагентом і вимірювання
аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що
морин з проби відокремлюють 50%-вим етанолом,
а виділений таким чином морин піддають взаємо-
дії з іонами скандію (III), модифікованими на пове-
рхні сорбенту Sephadex G-75, в присутності бича-
чого сироваткового альбуміну і буферного розчину
гексаметилентетраміну при pH=3,8-4,2.

Корисна модель відноситься до аналітичної
хімії, зокрема до способу визначення біологічно
активної речовини поліфенольного типу - морина в
рослинній сировині.

Морин (3,5,7,2',4'-пентагидроксифлавоон) -
структурний ізомер кверцетину (3,5,7,3',4'-
пентагидроксифлавоон), також як кверцетин й ру-
тин відноситься до ряду біологічно активних при-
родних сполук - флавоноїдам, які володіють анти-
оксидантною, антирадикальною,
ангіопротекторною та іншими видами активності
[див. Anees A. Ansary. Paramagnetic NMR shift,
spectroscopic and molecular modeling studies
oflanthanide (III)-morin complexes. J. of coordination
chemistry, 2008, Vol. 61, № 23, p. 3869-3878].

Серед існуючих аналітичних методів визна-
чення структурно родинних флавонолів на основі
реакції окиснення-відновлення слід виділити ме-
тод Фоліна-Деніса [див. Мечикова Г.Я., Степанова
Т.А., Загузова Е.В. Количественное определение
суммы фенольных соединений в листьях земля-
ники. Хіміко-фармацевтичний журнал, 2007, т.41,
№2, С.38-41], заснований на утворенні блакитних
продуктів окиснення фенольних сполук вольфра-
мовою кислотою в лужному середовищі. Однак
цей метод має суттєвий недолік. Він дозволяє ви-
значити тільки суміш флавонолів, при використан-
ні рекомендованих в методиці співвідношень ком-
понентів реакції випадає осад, що приводить к
отриманню занижених результатів.

Найбільш близьким до корисної моделі, що
заявляється, є спосіб визначення структурно ро-
динних флавоноїдів в рослинній сировині методом
високоєфективної рідинної хроматографії (L.-H.
Wang and W.-H. Li. General method for
determination flavonoids in medical plants and raw
cosmetic using HPLS with a photodiode array
detector. Хіміко-фармацевтичний журнал, 2007,
т.41, №4, С.46-51).

Визначення флавоноїдів проводили у такий
спосіб. З наважки аналізованої речовини екстрагу-
вали флавоноїди метанолом з додаванням води.
Розчин нагрівали протягом 30хв. при 70°C на во-
дяній бані. Екстракт центрифугували протягом 30
хв. Флавоноїди екстрагували з розчину 15-ю мл
гексану або ефіру, етилацетату, хлороформу й
суміші дихлорметан-хлороформ (при співвідно-
шенні компонентів 20:80), потім екстракт випарю-
вали й висушували в струмі азоту. Екстракцію
проводили тричі. До сухого залишку додавали 1мл
метанолу й перемішували на мішалці протягом
5хв. Отриманий розчин відфільтровували на мем-
бранних фільтрах. Потім методом зворотньо-
фазової рідинної хроматографії з використанням
рухливої фази (метанол і фосфорна кислота) і
колонки Phenomenex C₁₈ проводили виділення
флавоноїдів протягом однієї години. За допомогою
фотодіодного детектора проводили реєстрацію
піка флавоноїдів на хроматограмі при відповідних
довжинах хвиль. Загальний час проведення ана-

(13) U

(11) 43619

(19) UA

лізу становить 3,5 години. Межа виявлення різних флавоноїдів становить $(5-1) \cdot 10^{-8} \text{M}$.

Це рішення обране як найближчий аналог.

Найближчий аналог і корисна модель, що за-являється мають такі спільні операції:

1. відбір проби;
2. розчинення в органічному розчиннику;
3. взаємодія проби з реагентом;
4. реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб за найближчим аналогом вимагає попередньої пробопідготовки, що передбачає виділення флавоноїдів шляхом розчинення їх в органічному токсичному розчиннику метанолі, а також нагрівання метанольних розчинів зразків при 70°C . Потім флавоноїди екстрагують органічними розчинниками - гексаном, ефіром, етилацетатом, хлороформом, дихлорметаном, багато з яких є токсичними. Екстракцію проводять тричі. Все це ускладнює підготовку проби до аналізу. Крім того, для реєстрації аналітичного сигналу застосовується фотодіодний матричний детектор, яким постачені не всі хроматографи. Усе це значно ускладнює виконання аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб сорбційно-люмінесцентного визначення одного з флавоноїдів - мори́на, в якому шляхом заміни реагенту та зміни умов виконання аналізу забезпечити спрощене проведення аналізу та скоротити час його проведення.

Поставлена задача вирішена в способі сорбційно-люмінесцентного визначення мори́на, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику (50%-вому етанолі), взаємодію мори́на з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу тим, що морин піддають взаємодії з іонами скандію (III), модифікованими на поверхні сорбенту Sephadex G-75, в присутності бичачого сироваткового альбуміну і буферного розчину гексаметилен-тетраміну при $\text{pH}=3,8-4,2$.

Новим в корисній моделі, що заявляється, є використання твердофазної власної люмінесценції мори́на, посиленої у присутності скандію (III) та бичачого сироваткового альбуміну на сорбенті Sephadex G-75 при $\text{pH}=3,8-4,2$.

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

Спрощення й скорочення часу виконання аналізу стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Виділенню мори́на з рослинної сировини в 50%-й етанол і подальшому використанні 50%-го етанольного розчину. Застосування такого прийому дозволило виключити використання токсичного метанолу та трьохкратну екстракцію з використанням різних токсичних органічних розчинників, та послідовне висушування екстракту в струмі азоту.

2. Використанню в якості посилюючого реагенту іонів скандію (III) та бичачого сироваткового альбуміну, що утворюють комплексну сполуку із мори́ном, який адсорбований на поверхні сорбенту Sephadex G-75 і збільшує інтенсивність власної люмінесценції мори́на.

Етанольний розчин мори́на при опроміненні Уф-світлом ртутної лампи з $\lambda_{\text{макс.}}=365\text{nm}$ проявляє

люмінесцентні властивості ($\lambda_{\text{изл.}}=522\text{nm}$), але інтенсивність його люмінесценції невелика. При комплексоутворенні з іонами скандію (III) інтенсивність люмінесценції (I люм.) мори́на зростає за рахунок того, що зростає твердість молекули й зменшуються внутрімолекулярні втрати енергії збудження. Інтенсивність люмінесценції комплексу зберігається на сорбентах.

Експериментальне були обрані сорбенти, на яких I люм. мори́на найбільша. Досліджена сорбція комплексу на різних сорбентах:

пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA), фосфаті алюмінію, силікагелі, Sephadex. Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається на Sephadex G-75, Sephadex G-150, іммобілізованими іонами скандію (III) (Фіг.1). Для подальшого аналізу нами був обраний сорбент Sephadex C-75 на якому I люм. найбільша.

Час сорбції мори́на становить 10-15 хвилин. Інтенсивність люмінесценції мори́на залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція (Фіг.2). Максимальна I люм. спостерігається при pH 4,1. Як буфер використовували розчин гексаметилен-тетраміну 4%-вого. Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від температури і часу висушування сорбенту (Фіг.3). Як видно з рисунка максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається при висушуванні сорбату при 100°C на протязі 60 хвилин.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції мори́на від кількості скандію (III) на Sephadex G-75 показало, що інтенсивність люмінесценції максимальна в області концентрацій скандію (III) $(0,5-1) \cdot 10^{-2}$ моль/л. Нами обрана концентрація скандію (III) $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Лінійна область залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації мори́на спостерігається у діапазоні концентрацій мори́на $(1-11) \cdot 10^{-3}$ мг/мл. I люм. сорбату комплексу мори́на зі скандієм (III) збільшується в 2 рази в присутності альбуміну (використовували бичачий сироватковий альбумін).

Сорбційно-люмінесцентне визначення мори́на проводили у рослинній сировині: листях шовковиці, плодах винограду «Ізабелла», квітах липи, чебреці, листів звіробою, квітах ромашки, чистотілу, подорожника, деревій. Визначення проводили по методу добавок.

Приклад.

Визначення мори́на в лікарських рослинах (листях звіробою). Наважку 1г сухого подрібненого листа звіробою переносять у колбу, додають 50мл 50%-вого етанолу й перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хвилин при 70°C . Отриманий екстракт відфільтровують на фільтрі «синя стрічка» у мірну колбу. Доводять об'єм екстракту до 50мл 50%-вим етанолом.

Як сорбент використовували Sephadex G-75. У три пробірки поміщають по 100мг сорбенту Sephadex G-75, попередньо обробляють 1мл водного розчину хлориду скандію (III) $(1 \cdot 10^{-2})$ моль/л, перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану.

Потім в пробірки додають по 1 мл екстракту рослинної сировини, у дві з них додають по 0,25мл стандартного розчину мори́на з вмістом $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Потім додають у кожну по 0,1мл уро-тропину 4%-ного, по 0,1мл 1мг/мл бичачого сироваткового альбуміну й перемішують на протязі 5 хвилин. Якщо інтенсивність люмінесценції отриманого екстракту велика, то розчин необхідно розбавити 50%-им етанолом так, щоб не спостерігалось гасіння люмінесценції.

Осад відфільтровують і висушують протягом 60 хвилин при 100°C , розтирають у ступці до порошкоподібного стану й реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на сорбенті при $\lambda_{\text{изл.}}=522\text{нм}$, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб.}}=365\text{нм}$).

Аналогічно готують проби із другою добавкою по змісту у два рази перевищуючої першу.

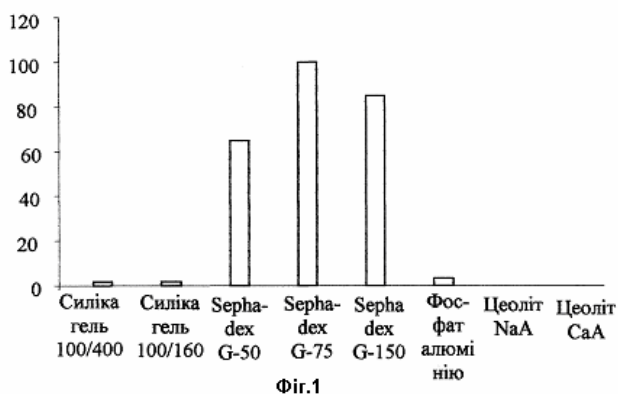
В 50%-вому екстракті листів звіробію знайдено 0,42мг/мл мори́на, це становить 21мг мори́на у 1г сухого продукту. Результати визначення мори́на перевірені методом «введено-знайдено» і показана правильність розробленої методики (Табл.).

Таблиця

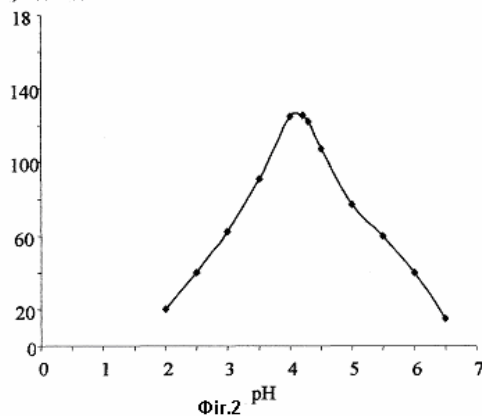
Результати визначення мори́на в листях звіробію методом «введено-знайдено»

Введено, мг/мл	Знайдено, мг/мл	Sr
0,10	0,52	0,037
0,20	0,64	0,040

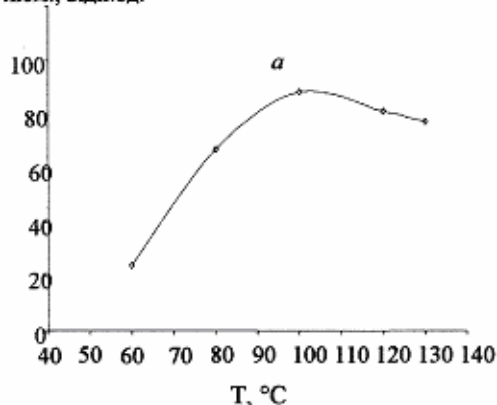
І люм., відн.од.



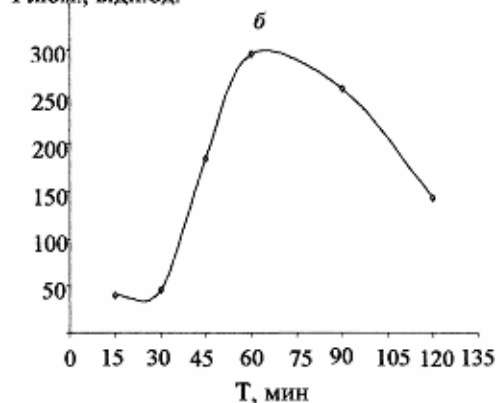
І люм., відн.од.



І люм., відн.од.



І люм., відн.од.



Фиг.3