



УКРАЇНА

(19) UA (11) 63937 (13) U  
(51) МПК  
G01N 33/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ОРОТОВОЇ КИСЛОТИ

1

(21) u201103681

(22) 28.03.2011

(24) 25.10.2011

(46) 25.10.2011, Бюл.№ 20, 2011 р.

(72) БЕЛЬТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, ЛІВЕНЦОВА ОЛЕНА ОЛЕГІВНА, ТЕСЛЮК ОЛЬГА ІВАНІВНА

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ, ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

2

(57) Спосіб кількісного визначення оротової кислоти, що включає відбір проби, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що спочатку 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.

Корисна модель 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., Rodriguez 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 заявленої корисної моделі є спосіб визначення оротової кислоти [див. Т.Б. Кравченко, С.В. Бельтюкова, Т.Л. Грицай, Н.С. Полуэктов. Люмінесцентные свойства оротата тербия и использование его в анализе. // Укр. хим. журнал. - 1982. - т. 48. - №9. - С. 972-975], заснований на реєстрації сенсibiliзованої люмінесценції іона тербію (III) у присутності оротової кислоти.

Визначення проводять наступним чином: у пробірку додають 1 мл розчину з вмістом оротової кислоти 0,5-15 мкг, приливають 1 мл розчину хлориду тербію ( $2 \cdot 10^{-2}$  моль/л), додають 5 мл диметилсульфоксиду, 0,4 мл 40 %-вого 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 графіка або методом добавок.

Дане рішення вибрано прототипом.

Прототип і корисна модель, 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 корисної моделі 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, забезпечити підвищення селективності та зниження межі визначення оротової кислоти.

Поставлена задача вирішена в способі визначення оротової кислоти, що включає відбір проби,

(13) U

(11) 63937

(19) UA

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 pH 6,8-7,2 і вимірюють інтенсивність люмінесценції іону Tb (III) в тонкому шарі сорбенту.

Новим у корисної моделі, 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 сенсibilізованої твердофазної люмінесценції іона Tb (III) у присутності неіоногенної поверхнево-активної речовини тритону X-100 та уротропіну при pH 6,8-7,2.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням технічного результату випливає з наступного.

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.

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

Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається при використанні проявляючого розчину з концентрацією Tb (III) -  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

При більших концентраціях спостерігається зростання інтенсивності люмінесценції "холостої" проби. Як проявляючий 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 %.

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

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

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 коров'ячому молоці.

Вплив білкових компонентів молока, що заважають, усували їх попереднім осадженням. Для цього проби 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 раз. Для цього до 2 мл сироватки додавали 8 мл дистильованої води.

2 мкл 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: етанолу:оцтової кислоти у співвідношенні 10:5:1). Коли фронт розчинника досягнув 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 проявляючими розчинами: хлориду тербію ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л), а потім тритону X-100 (0,2 %-вим) і уротропіну 4 %-вим. Ідентифікацію оротової кислоти на пластинці проводили по появі зеленої люмінесценції іону тербію (III) під люмінесцентною лампою зі світлофільтром УФС-2 ( $\lambda_{\text{збудж}}=365$  нм), візуально порівнюючи інтенсивність люмінесценції проби і стандарту.

Кількісне визначення оротової кислоти проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого діяли таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину оротової кислоти і далі проводили хроматографування і прояву хроматограми, як описано вище. Потім з пластинки вирізали плями з оротової кислоти, вміщували в кювету для твердих зразків і вимірювали  $I_{\text{люм}}$  при  $\lambda_{\text{збудж}}=545$  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.

Точність і відтворюваність визначення перевірена методом статистичної обробки результатів. При  $n=5$  і  $P=0,95$  величина відносного стандартного відхилення (Sr) складає 0,07-0,09. Межа виявлення оротової кислоти складає ( $1 \cdot 10^{-8}$  моль/л)  $2 \cdot 10^{-3}$  мкг/мл.

Результати визначення оротової кислоти в  
молоці перевірена методом "введено-знайдено"

(табл.), за допомогою якого показана 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