



УКРАЇНА

(19) UA (11) 54422 (13) U
(51) МПК (2009)
A61K 36/00
G01N 21/77

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХІНІВ

1

(21) u201004847
(22) 22.04.2010
(24) 10.11.2010
(46) 10.11.2010, Бюл.№ 21, 2010 р.
(72) БЕЛТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, БИЧ-
КОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА
(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ
(57) Спосіб визначення катехінів, що включає від-
бір проби, виділення катехінів, взаємодію їх з хімі-

2

чним реагентом і вимір аналітичного сигналу, який відрізняється тим, що виділення катехінів здійснюють сорбцією на сорбенті, виділені таким чином катехіни піддають взаємодії з іонами скандію (III), модифікованими на поверхні сорбенту, а вимір аналітичного сигналу здійснюють в присутності цитрату калію і лаурилсульфату натрію при pH=4,3-4,5.

Корисна модель відноситься до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення групи біологічно активних речовин поліфенольного типу - катехінів (флавонол - 3-олів) та їх галових ефірів, які складають найбільш цінну частину чайного листа.

Відомий хемілюмінесцентний метод визначення катехінів [див. Hidetoshi Arakawa, Mahina Kanemitsu, Noriko Tajima, Masako Maeda. Chemiluminescence assay for catechin based on generation of hydrogen peroxide in basic solution. Analytica Chimica Acta, 2002, №472, P.75-82], заснований на антиоксидантній здатності катехінів в умовах лужного розчину у наслідку дисоціації ОН-груп катехінів утворювати радикал. Радикал катехіну відновлює пероксид водню, який реагує з трихлорфенілоксалатом (ТХФО), у результаті хімічної реакції спостерігається хемілюмінесценція. Ідентифікацію відновленого пероксиду водню катехіном проводять за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу.

Однак цей метод має суттєвий недолік. Він потребує використання великої кількості реагентів таких як барбітурати натрію, ефір оцтової кислоти, диметилсульфоксид, диметилентриамінпентаоцтова кислота, пероксид водню, 8-анілінонафтален, сульфонат амонію, біс (2,4,6-трихлорфеніл) оксалат, бичачий сироватковий альбумін, а також наявність спеціального хемілюмінесцентного спектрометра.

Найбільш близьким є спосіб визначення катехінів, у частково ферментативних сортах чаю методом вискоєфективної рідинної хроматографії [див. Шафигулін Р.В., Буланова А.В. ВЭЖХ час-

тино ферментативних сортів чаю. Вестник СамГУ, 2007, №2, С.134-139.]

Визначення катехінів проводили у такий спосіб. Для виділення групи катехінів готували екстракти чаю: наважку чаю (2 г) заливали дистильованою водою й настоювали при 50±5°C на протязі 4 годин при постійному перемішуванні. Отриманий екстракт фільтрували за допомогою паперового фільтра для видалення чайної флеші. Фільтрат упарювали на вакуумному випарнику до 10 мл, потім змішували його з 10 мл хлороформу й проводили рідинно-рідинну екстракцію. Хлороформну фракцію видаляли. Водний екстракт змішували з 10 мл етилацетату й проводили рідинно-рідинну екстракцію. Водну фракцію видаляли. Етилацетатну фракцію використовували для подальшого хроматографічного аналізу. Експеримент здійснювали на рідинному хроматографі Waters (USA) з УФ детектором, при довжині хвилі 280 нм. Застосовували колонку Optimapark OP C18. Елювання проводили у градієнтному режимі. Як органічний модифікатор рухливої фази використовували ацетонітрил; рН елюенту підтримували постійним, додаючи в нього 0,1 мл оцтової кислоти. Створювали наступний градієнтний режим: протягом 30 хвилин концентрація ацетонітрила лінійно збільшувалася з 10% до 30%. Ідентифікацію компонентів проводили шляхом порівняння з автентичними зразками речовин. Для кількісного хроматографічного аналізу був використаний метод абсолютного градування. При побудові градувальних залежностей готували розчини стандартів з концентра-

(13) U
(11) 54422
(19) UA

цією 500 ppm і вводили у хроматограф різні їхні обсяги - 5, 10, 15, 20 мкл. Будували залежності площі піка від абсолютної маси стандарту катехіну в обсязі проби, що вводиться.

Це рішення обране як найближчий аналог.

Найближчий аналог і корисна модель, що заявляється мають такі спільні операції:

1. відбір проби;
2. виділення катехінів;
3. взаємодія виділених катехінів з реагентом;
4. реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб за найближчим аналогом вимагає подвійну екстракцію - попереднє очищення катехінів шляхом екстракції хлороформом та екстракцію катехінів з водної фази етилацетатом. Розділення катехінів проводять на спеціальній колонці. Спосіб вимагає використання органічних токсичних розчинників - хлороформу й етилацетату, а також дорожню апаратуру. Усе це значно ускладнює виконання аналізу.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення катехінів, в якому за рахунок застосування реакції взаємодії катехінів з іонами скандію (III), реєстрації аналітичного сигналу у фазі сорбенту, забезпечити спрощення проведення аналізу та апаратного оформлення аналізу, виключити токсичні розчинники.

Поставлена задача вирішена в способі визначення катехінів, що включає відбір проби, виділення катехінів, взаємодію їх з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу тим, що відокремлення катехінів здійснюється сорбцією на сорбенті й катехіни піддають взаємодії з іонами скандію (III), модифікованими на поверхні сорбенту, а вимір аналітичного сигналу здійснюється в присутності цитрату калію й аніонної поверхнево-активної речовини - лаурилсульфату натрію при pH=4,3-4,5.

Новим у корисної моделі, що заявляється, є використання реакції взаємодії катехінів з іонами Sc (III), яка проходить у фазі сорбенту - Sephadex G-75, з метою виділення катехінів з розчину й підсилення власної люмінесценції катехінів з іонами Sc (III) у присутності цитрату іонів та аніонної поверхнево-активної речовини - лаурилсульфату натрію при pH=4,3-4,5.

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

Спрощення виконання аналізу та апаратного оформлення, виключення токсичних розчинників стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Застосуванню сорбції комплексів катехінів з іонами Sc (III) на сорбенті Sephadex G-75. Застосування такого прийому дозволяє поєднувати стадію попереднього відокремлення катехінів з отриманням сорбатів комплексів, які володіють люмінесцентними властивостями у твердій фазі сорбенту, що дозволяє проводити тест-визначення катехінів, що виключає стадію їх очищення хлороформом з наступною екстракцією етилацетатом. Це виключає використання токсичних розчинників - хлороформу й етилацетату, й, відповідно, спрощує виконання аналізу.

2. Використання твердофазної люмінесценції катехінів в присутності іонів скандію (III), які утво-

рюють комплексну сполуку з катехінами на поверхні сорбенту. Застосування такого прийому дозволяє проводити визначення катехінів шляхом порівняння І люм. проби з І люм. стандартних зразків безпосередньо у фазі сорбенту, що виключає використання дорогого хроматографа. При цьому люмінесценцію збуджують ртутно-кварцовою лампою СВД-120А з світлофільтром УФС-2.

Розчин катехінів при опромінуванні Уф-світлом ртутної лампи з $\lambda_{\text{макс}}=365$ нм проявляє люмінесцентні властивості ($\lambda_{\text{изл.}}=471$ нм), але інтенсивність її люмінесценції невелика. Власна люмінесценція катехінів зростає у 12,5 рази на сорбентах, зрушується при цьому максимум люмінесценції на 17 нм й складає $\lambda_{\text{изл.}}=488$ нм. При комплексоутворенні з іонами скандію (III) інтенсивність люмінесценції (І люм.) катехінів посилюється у 2 рази за рахунок того, що зростає жорсткість молекули й зменшуються внутрішньомолекулярні втрати енергії збудження. Максимум люмінесценції сорбату комплексу катехінів зі скандієм при цьому зрушується в область довгих хвиль й складає $\lambda=507$ нм. У присутності цитрату калію й аніонної поверхнево-активної речовини - лаурилсульфату натрію максимум зрушується в область довгих хвиль й складає $\lambda=516$ нм.

Вплив різних чинників на інтенсивність люмінесценції комплексу катехінів з іонами скандію (III) наведено на графіках, де:

Фіг.1 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів катехінів з іонами скандію (III) від pH розчину;

Фіг.2 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів катехінів з іонами скандію (III) від концентрації іонів скандію (III);

Фіг.3 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів катехінів з іонами скандію (III) від часу висушування сорбенту.

Експериментально були підібрані сорбенти, на яких І люм. катехінів найбільша. Досліджена сорбція комплексу на різних сорбентах: на силікагелі 100/160, 100/400, фосфаті алюмінію, Sephadex G-50, G-75, G-150, а також на пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA). Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається на Sephadex G-75, який іммобілізований іонами скандію (III), саме тому він був обраний для подальшого аналізу.

Час сорбції катехінів становить 15-20 хвилин. Інтенсивність люмінесценції катехінів залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить pH=4,3-4,5 (Фіг.1). Для створення цього значення pH в розчині використовували ацетатний буферний розчин з pH=4,3. Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від концентрації іонів скандію (III) (Фіг.2) і часу висушування сорбенту (Фіг.3). Як видно з рисунка максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається при висушуванні протягом 120 хвилин.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції катехінів від кількості скандію (III) на Sephadex G-75 показало, що інтенсивність люмінесценції збільшується зі збільшенням концентрації скандію (III). Нами обрана концентрація скандію (III) - $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Лінійна межа залежності інтен-

сивності люмінесценції комплексу від концентрації катехінів спостерігається у діапазоні концентрацій (0,01-0,5) мг/мл. Інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу збільшується у 2 рази у присутності цитрату калію й у 1,5 рази у присутності аніонної поверхнево-активної речовини - лаурилсульфату натрію.

Приклад . Визначення катехінів у зеленому чаї "Аскольд".

Наважку 2 г повітряно-сухої сировини - листя чаю переносять у колбу, додають 150 мл дистильованої води й перемішують на магнітній мішалці протягом 120 хвилин при температурі $50 \pm 5^\circ\text{C}$. Отриманий екстракт відфільтровують на фільтрі "синя стрічка" і видаляють листя чаю.

Наважку 100 мг Sephadex G-75, попередньо обробленої 1 мл водного розчину хлориду скандію (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), поміщають у пробірку, перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану. Потім додають 1 мл водного екстракту чаю й 0,2 мл розчину цитрату калію ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), 0,2 мл лаурилсульфату натрію ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) й

0,3 мл ацетатного буферного розчину з $\text{pH}=4,3$ й перемішують на протязі 15 хвилин. Осад відфільтровують і висушують протягом 120 хвилин при 100°C . Далі розтирають до порошкоподібного стану і реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, імобілізованого на сорбенті при $\lambda_{\text{изл.}} = 516 \text{ нм}$, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$). Інтенсивність люмінесценції проби порівнюють з інтенсивністю люмінесценції стандартних зразків, що містять різні кількості катехінів (0,005-2,5) мг/мл і підготовлених так, як описано вище. На підставі порівняльної оцінки роблять висновок про вміст катехінів в зразку.

В екстракті зеленого чаю "Аскольд" знайдено 93 мг катехінів у 1 г повітряно-сухого чаю. На основі розробленої методики визначено вміст катехінів у чорних й зелених чаях різних виробників (Табл.1). Результати визначення катехінів перевірені методом "введено-знайдено" і показана правильність розробленої методики (Табл. 2).

Таблица 1

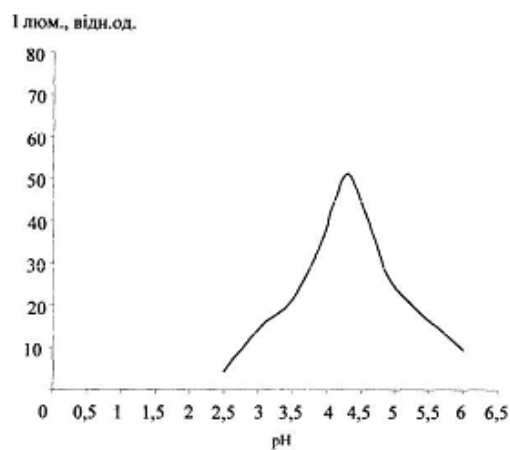
Вміст катехінів у чаї

№	Чай	Вміст катехінів, мг/г сухого чаю
1.	Майский черный среднелистовой "Золотые лепестки", Цейлонская коллекция	6,75
2.	Майский черный крупнолистовой байховый "Царська корона"	8,25
3.	Майский зеленый крупнолистовой "Китайский дракон", Китайская коллекция	45
4.	Майский черный среднелистовой байховый, Цейлонская коллекция	12,8
5.	"Lipton", Yellow label tea ₅ листовой	27,3
6.	"Lipton", Orange Jaipur	15
7.	"Элегия", Китайский зеленый листовой байховый	52,2
8.	"Ahmad Tea", Green Tea	20,7
9.	"Ahmad Tea", Ceylon Tea	17,6
10.	"Аскольд", Зеленый GP китайский - Ганн Паудер	93
11.	"Хэйлис", крупнолистовой цейлонский черный	36
12.	"Принцесса Ява", китайский зеленый байховый	262,5
13.	Майский "Deluxe Quality Riston tea", Selected Premium Leaf	10,8
14.	"Лисма", зеленый китайский крупнолистовой	84

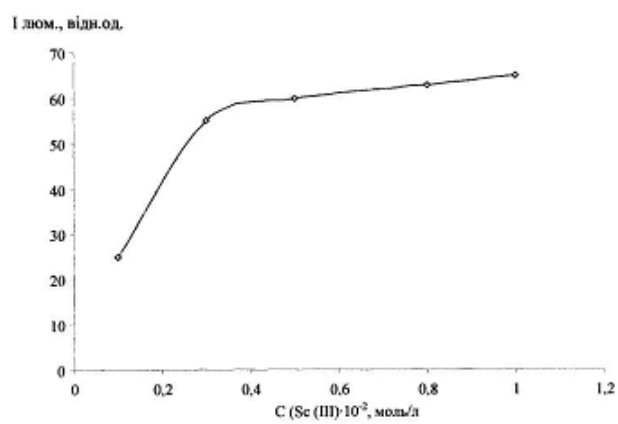
Таблица 2

Результати визначення катехінів у чаї методом "введено-знайдено"

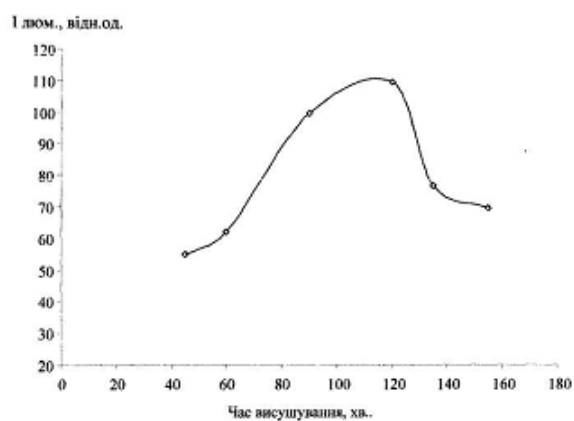
Добавка мг	Знайденно в пробі з добавкою, мг	Знайденно в пробі, мг	Sr
0,150	0,361	$0,21 \pm 0,02$	0,048
0,20	0,44	$0,24 \pm 0,01$	0,052



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3