



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **63016** (13) **U**  
(51) МПК  
**G01N 21/78 (2006.01)**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК В РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ

1

(21) u201102185

(22) 24.02.2011

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) БЕЛІТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, БИЧ-КОВА ГАННА ОЛЕКСІЇВНА

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(57) Спосіб тест-визначення суми фенольних сполук в рослинній сировині, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику з відо-

2

кремленням фенольних сполук, взаємодію фенольних сполук з хімічними реагентами і реєстрацію аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що фенольні сполуки відокремлюють сорбцією на сорбенті Sephadex G-75 і піддають взаємодії з іонами тербію(Ш), модифікованими на поверхні сорбенту, в присутності триоктилфосфіноксиду та ацетатного буферного розчину при рН=4,2-4,4 і вимірюють аналітичний сигнал сенсibilізованої люмінесценції іонів Tb(III).

Корисна модель належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення суми фенольних сполук у рослинній сировині.

Відомий спосіб кількісного визначення фенольних сполук у лікарській сировині методом високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) [див. Бенетис Р., Радусене І., Якштас В. Количественное определение фенольных соединений в лекарственном сырье тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ. // Химико-фармацевтический ж. - 2008. - Т.42. - Вып.3. - С. 51-54]. Метод передбачає використання хроматографічної системи Waters2690Alliance з УФ/ВИД детектуванням і детектором на діодній матриці. Хроматографічне розділення проводять на колонці Ascentis RP-Amide, крім цього, використовують попередню колонку. Розділення проводять методом зворотнотазової ВЕРХ. Ідентифікацію піків проводять, порівнюючи часи утримання піків досліджуваних й стандартних зразків. Кількісне визначення проводять з використанням методу зовнішнього стандарту, використовуючи градувальні графіки.

Однак, цей метод потребує складного апаратурного оформлення і наявності дорогих стандартних зразків складу.

Найбільш близьким до корисної моделі, що заявляється, є спосіб кількісного визначення суми фенольних сполук у листі суниці методом спектрофотометрії з використанням реактиву Фоліна-Деніса (ФД). Спосіб передбачає використання реакції поліфенольних сполук з реактивом Фоліна-Деніса. В процесі реакції утворюються блакитні

продукти окиснення фенольних сполук вольфрамовою кислотою у лужному середовищі, яке створюють за допомогою насиченого розчину натрію карбонату [див. Мечикова Г.Я., Степанова Т.А., Загузова Е.В. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники. // Химико-фармацевтический ж. - 2007. - Т. 41. - Вып.2. - С. 38-41].

Визначення проводять у такий спосіб: пробу сировини подрібнюють до розміру часток, що проходять крізь сито з отворами діаметром 2 мм. Близько 1,0 г (точна наважка) подрібненої сировини поміщають у колбу місткістю 250 мл і додають 100 мл спирту етилового 70 %. Колбу приєднують до зворотного холодильника й нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв з моменту закипання екстрагенту, періодично струшуючи колбу для змивання часток сировини зі стінок. Колбу з вмістом охолоджують до кімнатної температури. Потім витяжку фільтрують через паперовий фільтр, змочений спиртом етиловим 70 %, у мірну колбу місткістю 200 мл. Фільтр поміщають у колбу для екстрагування й екстракцію повторюють ще раз протягом 15 хв, використовуючи 50 мл спирту етилового 70 %. Витяжку охолоджують до кімнатної температури й фільтрують у ту ж мірну колбу. Потім сировину й фільтр промивають 50 мл спирту етилового 70 %, приєднують його до загальної витяжки, при необхідності доводять об'єм витяжки до мітки цим же розчинником і перемішують. У мірну колбу місткістю 50 мл поміщають 0,1 мл витяжки, додають 20 мл реактиву Фоліна-Деніса й

(13) U

(11) 63016

(19) UA

10 мл 20 % розчину натрію карбонату, ретельно збовтують протягом 3-5 хв до припинення виділення пухирців газу, доводять об'єм розчину водою до мітки й перемішують. Колбу закривають і витримують на водяній бані при температурі 80 °C протягом 30 хв. Потім колбу з вмістом охолоджують до кімнатної температури й вимірюють оптичну густину отриманого розчину на спектрофотометрі в максимумі поглинання при довжині хвилі 765 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовують розчин, що містить 20 мл реактиву Фоліна-Деніса й 10 мл 20 % розчину натрію карбонату, доведеного водою до мітки в мірній колбі місткістю 50 мл.

Паралельно вимірюють оптичну густину розчину стандартного зразка галової кислоти, приготовленого аналогічно випробуваному розчину.

Вміст суми фенольних сполук у відсотках обчислюють у перерахуванні на галову кислоту.

Це рішення вибрано прототипом.

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

- відбір проби;
- розчинення проби в органічному розчиннику з відокремлюванням фенольних сполук;
- взаємодія фенольних сполук з хімічним реагентом;
- реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб за прототипом має суттєві недоліки.

1. Реакція протікає у вузькому інтервалі значень рН від 7,0 до 8,0. При  $\text{pH} \leq 7,0$  оптична густина не досягає максимального значення, внаслідок неповноти протікання реакції. При  $\text{pH} \geq 8,0$  у реакційній суміші випадає осад.

2. Реактив Фоліна-Деніса готується шляхом кип'ятіння вихідних реагентів протягом 4-5 годин і зберігається у темному місці не більше 5 діб.

3. Для проведення реакції необхідне нагрівання реакційної суміші у термостаті при температурі 80 °C протягом 30 хвилин.

4. Визначенню можуть заважати й інші компоненти суміші, які вступають у реакцію з реактивом ФД й мають окислювально-відновні властивості, такі як антоціани, антиоксидантні ферменти й інші.

В основу корисної моделі поставлено задачу розробити спосіб, в якому за рахунок застосування реакції взаємодії фенольних сполук з іонами тербію (III), використання твердофазної люмінесценції тербію на поверхні сорбенту Sephadex G-75, забезпечити спрощення аналізу, скорочення часу проведення аналізу й зниження межі визначення фенольних сполук.

Поставлена задача вирішена в способі тест-визначення суми фенольних сполук в рослинній сировині, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику з відокремлюванням фенольних сполук, взаємодію фенольних сполук з хімічними реагентами і реєстрацію аналітичного сигналу, згідно з корисною моделлю, фенольні сполуки відокремлюють сорбцією на сорбенті Sephadex G-75 і піддають взаємодії з іонами тербію (III), модифікованими на поверхні сорбенту, в присутності триоктилфосфіноксиду (ТОФО) та ацетатного буферного розчину при  $\text{pH}=4,2-4,4$  і

вимірюють аналітичний сигнал сенсibilізованої люмінесценції іонів Tb(III).

Новим в корисній моделі, що заявляється, є використання реакції взаємодії фенольних сполук з іонами Tb(III), яка проходить у фазі сорбенту - Sephadex G-75, з метою відділення фенольних сполук із розчину і підсилення сенсibilізованої твердофазної люмінесценції іона Tb(III) у присутності донорно-активної речовини - триоктилфосфіноксиду та ацетатного буферного розчину при  $\text{pH}=4,2-4,4$ .

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

Підвищення селективності визначення, спрощення виконання аналізу, зниження часу проведення аналізу, зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Застосування реакції взаємодії фенольних сполук з іонами тербію (III).

Застосування такого прийому дозволяє підвищити селективність визначення фенольних сполук через те, що реакція є для даного класу сполук вибіркою у групі інших антиоксидантів (токоферолі, антоціани, антиоксидантні ферменти), які не виявляють реакції з іонами тербію (III).

2. Застосування сорбції фенольних сполук на сорбенті Sephadex G-75.

Застосування такого прийому дозволяє поєднувати стадію попереднього відокремлення фенолів з отриманням сорбатів комплексів, які мають люмінесцентні ознаки у твердій фазі сорбенту, що дозволяє проводити тест-визначення фенольних сполук, що спрощує апаратне оформлення.

3. Застосування тест-визначення фенольних сполук у фазі сорбенту.

Застосування такого прийому дозволяє виключити приготування розчинів для побудови градуального графіку для кожного визначення, що скорочує час проведення аналізу.

4. Застосування сорбції фенольних сполук на сорбенті сприяє збільшенню інтенсивності люмінесценції сорбатів комплексів внаслідок зменшення без випромінюваних втрат енергії збудження, що веде до зниження межі визначення фенольних сполук.

Сенсibilізована люмінесценція іонів Tb(III) на сорбенті посилюється у присутності донорно-активної речовини - триоктилфосфіноксиду, який сприяє дегідратації утвореного комплексу і тим самим зменшенням безвипромінюваних втрат енергії збудження.

Вплив різних чинників на інтенсивність люмінесценції комплексів фенольних сполук з іонами тербію (III) наведено на кресленнях, де:

фіг.1 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів фенольних сполук з тербієм (III) від типу сорбенту;

фіг.2 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів фенольних сполук з тербієм (III) від температури висушування сорбенту;

фіг.3 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексів фенольних сполук з тербієм (III) від часу висушування сорбенту.

Експериментально були вибрані сорбенти, на яких І люм. фенольних сполук найбільша. Досліджена сорбція комплексів на різних сорбентах (фіг.1): на силікагелях 100/160 (1), 100/400 (2), фосфаті алюмінію (3) й на Sephadex G-50 (4), G-75(5), G-150 (6), а також на пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA). Як видно з фіг.1 максимальна інтенсивність люмінесценції комплексів спостерігається на Sephadex G-75, іммобілізованому іонами тербію (III). Для подальшого аналізу був вибраний сорбент Sephadex G-75.

Час сорбції фенольних сполук становить 10-15 хвилин. Інтенсивність люмінесценції комплексів залежить від рН розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить рН=4,2-4,4. Для створення оптимального значення рН розчину використовували ацетатний буферний розчин з рН=4,3. Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від температури (фіг.2) і часу висушування сорбенту (фіг.3). Як видно з рисунка максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається при висушуванні сорбату при 80 °С протягом 60 хвилин.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбату комплексу від кількості іонів тербію (III) на Sephadex G-75 показало, що інтенсивність люмінесценції збільшується зі збільшенням концентрації іонів тербію (III). Вибрана концентрація тербію (III) -  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. І люм. сорбату комплексів фенольних сполук з тербієм (III) значно збільшується в присутності ТОФО. Експериментально визначено, що максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається при концентрації ТОФО  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л. Як поліфенольний стандарт використовували розчин галової кислоти. Лінійна область залежності Інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації галової кислоти спостерігається у діапазоні концентрацій галової кислоти 0,045-1,7 мкг/мл.

Приклад 1. Визначення суми фенольних сполук у квітках ромашки аптечної.

Наважку 1 г сухого подрібненого листа ромашки аптечної переносять у колбу, додають 50 мл 70 % етанолу й перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хвилин при 70 °С. Колбу з вмістом охолоджують до кімнатної температури. Отриманий екстракт відфільтровують на фільтрі "синя стрічка" у мірну колбу. Доводять об'єм екстракту до 50 мл 70 % етанолом.

Приготування стандартного розчину галової кислоти: 0,05 г (точна наважка) стандартного зразка галової кислоти, висушеної при температурі

115 °С до постійної маси, розчиняють у мірній колбі місткістю 250 мл у невеликій кількості спирту етилового 70 %, доводять об'єм розчину спиртом етиловим 70 % до мітки й перемішують.

Наважку 100 мг Sephadex G-75, обробленої 1мл водного розчину хлориду тербію (III) ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л), поміщають у пробірку, перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану. Потім в пробірки додають по 0,5 мл екстракту квітів ромашки аптечної, у дві з них додають по 0,5 мл стандартного розчину галової кислоти з вмістом  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Далі додають у кожну пробірку по 0,2 мл ацетатного буферного розчину з рН = 4,3, по 0,2 мл розчину триоктилфосфіноксиду ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л), й перемішують протягом 15 хвилин. Якщо інтенсивність люмінесценції отриманого екстракту велика, то розчин розбавляють 70 % етанолом так, щоб не спостерігалася гасіння люмінесценції.

Осад відфільтровують й висушують протягом 60 хвилин при 80 °С. Потім розтирають в ступці до порошкоподібного стану й реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на сорбенті, при  $\lambda_{\text{изл.}} = 545\text{nm}$ , при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ( $\lambda_{\text{возб.}} = 365\text{nm}$ ).

Аналогічно готують проби з другою добавкою по вмісту, у два рази перевищуючою першу. Розраховують вміст фенольних сполук за методом добавок. Результати визначення наведені у таблиці 1.

У 1 г листів ромашки знайдено 33,5 мг фенольних сполук в перерахунку на галову кислоту (табл.1).

Правильність методики підтверджена методом "введено-знайдено" (табл.1), та задовільним збігом результатів, отриманих люмінесцентним методом, який пропонується і спектрофотометричним методом Фоліна-Деніса [Бенетис Р., Радужене И., Якштас В. Количественное определение фенольных соединений в лекарственном сырье тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ. Химико-фармацевтический ж.-2008. - Т. 42. - Вып.3. - С. 51-54] (табл.2.).

Приклади 2,3 ілюструють здійснення способу з використанням різної рослинної сировини. Дані наведені в таблиці №2.

Спосіб тест-визначення суми фенольних сполук у рослинній сировині

Таблиця 1

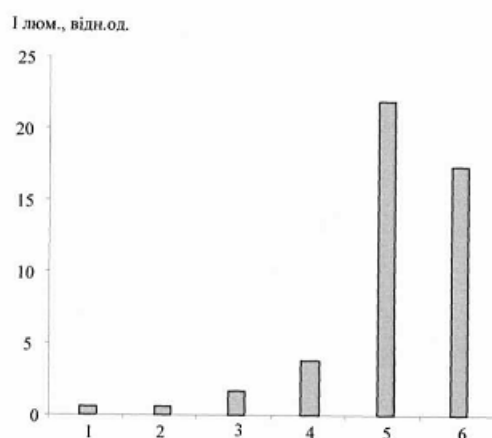
Результати визначення фенольних сполук у квітках ромашки аптечної методом "введено-знайдено"

| Введено, мг/мл | Знайдено, мг/мл | Sr    |
|----------------|-----------------|-------|
| 0,0            | 0,67            |       |
| 0,10           | 0,76            | 0,042 |
| 0,20           | 0,85            | 0,038 |

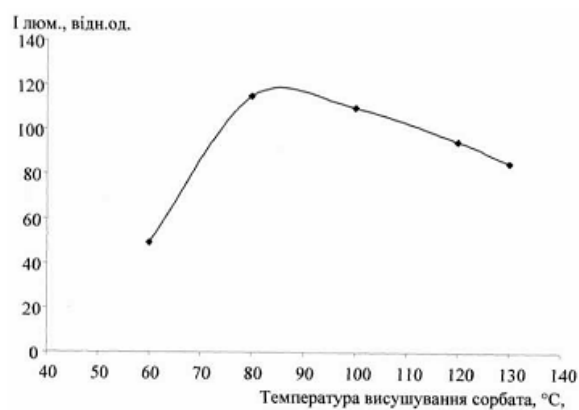
Таблиця 2

Результати визначення фенольних сполук у рослинній сировині (мг/мл),  $n=5,0$ ;  $P=0,95$ 

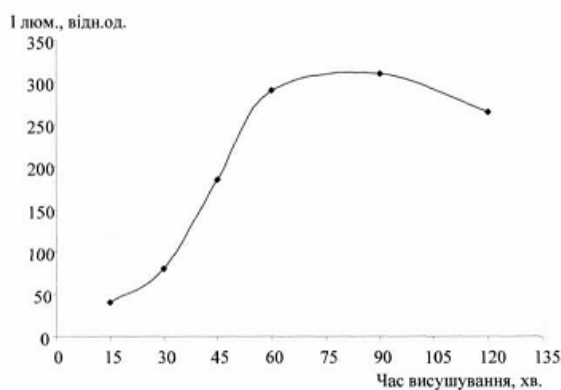
| № прикладу | Рослинна сировина | Люмінесцентний метод, який пропонується |       | Спектрофотометричний метод |       |
|------------|-------------------|---|-------|----------------------------|-------|
|            |                   | Вміст фенольних сполук                  | Sr    | Вміст фенольних сполук     | Sr    |
| 1.         | Ромашка           | 0,56                                    | 0,035 | 0,67                       | 0,037 |
| 2.         | Шишки хмелю       | 0,30                                    | 0,028 | 0,34                       | 0,036 |
| 3.         | Чистотіл          | 0,54                                    | 0,040 | 0,468                      | 0,029 |



Фіг. 1



Фіг. 2



Фіг. 3