



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101251** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

G01N 21/25 (2006.01)

C07C 39/00

C07C 39/12 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 10128**

(22) Дата подання заявки: **16.08.2011**

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: **11.03.2013**

(41) Публікація відомостей
про заявку: **27.02.2012, Бюл.№ 4**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **11.03.2013, Бюл.№ 5**

(72) Винахідник(и):

**Запорожець Ольга Антонівна (UA),
Бас Юлія Петрівна (UA),
Петрух Мар'яна Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА
ШЕВЧЕНКА,**

вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01601 (UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

K. Leamsomrong, M. Suttajit, P. Chantiratikul // Asian J. Applied Sci., 2009., Vol. 2, P. 184-190
A. Alonso, C. Dominguez, D. A. Guillen, C. Barroso // J. Agric. Food Chem., 2002., Vol. 50, P.3112-3115
Wengerl Vesna, Strlic Matija, Kocar Drago Comparison of methods for determination of polyphenols in wine by HPLC-UV/VIS, LC/MS/MS and spectrophotometry // Acta chim. sloven., 2009., Vol.56, No.3, C. 698-703
Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрик А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья, 2008.№0.3. - С. 123-127

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ ПОЛІФЕНОЛІВ ТЕСТ-МЕТОДОМ

(57) Реферат:

Спосіб оцінки загального вмісту поліфенолів тест-методом включає попередню обробку реактиву Фоліна, іммобілізованого на функціоналізованому тетрадециламоній нітратом силікагелі, та наступне візуальне тест-визначення шляхом порівняння кольору сорбенту із стандартною кольоровою шкалою.

UA 101251 C2

Запропонований спосіб належить до аналітичної хімії, зокрема до візуальних тест-методів визначення полі фенолів, і може бути використаний при аналізі біодобавок, напоїв та харчових продуктів.

В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

5 ГПК - гетерополікіслота.

РФ - реактив Фоліна.

ТДАН - тетрадециламонію нітрат.

ТДАН-СГ - силікагель, модифікований ТДАН.

РФ-ТДАН-СГ - силікагель, модифікований ТДАН та РФ.

10 ВТ - візуально-тестове визначення.

Відомий спосіб оцінки антиоксидантної активності візуально-тестовим методом, який полягає в тому, що наважку силікагелю, модифікованого макроциклічним комплексом тетрабензотетраазоциклогексадецину купруму, послідовно обробляють карбонатним буферним розчином ($\text{pH} = 10,5 \pm 0,1$) та розчином проби з наступним візуальним порівнянням кольору сорбенту зі стандартною кольоровою шкалою [1]. Межа виявлення (МВ) поліфенолів становить 15 мг/л. Основним недоліком цього методу є те, що він передбачає попередній синтез модифікатора - комплексу купруму (II).

В основу винаходу поставлена задача розробити простий та експресний спосіб оцінки загального вмісту поліфенолів, які проявляють антиоксидантні властивості, у біодобавках та напоях.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що спосіб визначення включає проведення гетерофазної реакції відновлення іммобілізованого на сорбенті реактиву Фоліна поліфенолами у середовищі $\geq 0,35$ моль/л Na_2CO_3 , та наступним візуальним детектуванням аналітичного сигналу. Як сорбент, використовують силікагель марки SG-60, модифікований тетрадециламонію нітратом (ТДАН-СГ) з ємністю за ТДАН 25 мкмоль/г.

Використання способу, що заявляється, дає змогу напівкількісно оцінити вміст поліфенолів в об'єкті аналізу, та у порівнянні з прототипом спростити процедуру отримання модифікованого сорбенту, завдяки використанню комерційно доступнішого реагенту.

Застосування іммобілізованого іонного асоціату ТДАН та РФ на силікагелі, для оцінки загального вмісту поліфенолів ВТ методу у літературі не відомо, що дозволяє вважати запропонований спосіб таким, що відповідає критеріям "новизна" та "винахідницький рівень". Винахід ілюструється наступними прикладами, які не обмежують обсяг правової охорони:

Приклад 1.

Модифікація ТДАН-СГ реактивом Фоліна.

35 До 1,000 г модифікованого ТДАН силікагелю додають 5 мл водного розчину реактиву Фоліна, перемішують магнітною мішалкою впродовж 10 хв., відокремлюють, сорбент тричі промивають дистильованою водою і висушують на повітрі при кімнатній температурі. Ємність одержаного у такий спосіб сорбенту відносно РФ становить 8,3 мкмоль/г.

Приклад 2.

40 Побудова кольорової шкали для ВТ визначення кверцетину.

В 10 хімічних стаканів ємністю по 25,0 мл вводять аліквотну частину стандартного розчину кверцетину (60,40 мг/л) так, щоб його концентрація в кінцевому об'ємі становила (мг/л): 0; 1; 3; 5; 7; 10; 13; 22; 27; 36; 2,5 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5 мл; додають 0,075 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою впродовж 10 хв. Сорбент відокремлюють декантацією та послідовно промивають трьома порціями дистильованої води. Діапазон кольорової шкали становить 1-36 мг_{кверцетину}/л.

Приклад 3.

Побудова кольорової шкали для ВТ визначення таніну.

50 В 9 хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вводять аліквотну частину стандартного розчину таніну (0,64 мг/л) так, щоб його концентрації в кінцевому об'ємі становила (мг/л): 0; 5; 14; 19; 26; 39; 80; 130; 179; 2,5 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 і дистильовану воду до загального об'єму 5 мл. Модифікований сорбент (0,1 г) обробляють 0,1 мл отриманого розчину та висушують на повітрі при кімнатній температурі. Діапазон кольорової шкали становить 5-179 мг_{таніну}/л.

Приклад 4.

55 Вплив сторонніх іонів на результати визначення поліфенолів.

При розробці методики тест-визначення поліфенолів, заважаючий вплив сторонніх іонів вивчали методом твердофазної спектrophотометрії.

60 В 11 хімічних стаканів ємністю 25 мл вводять по 1,0 мл розчину таніну (0,38 ммоль/л), 2,50 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 , різні кількості стороннього іону (Табл. 2) та дистильовану воду до загального об'єму 5,0 мл. Сорбент (0,1 мг) обробляли 0,1 мл отриманого розчину,

висушували на повітрі при кімнатній температурі, вміщали у кювету товщиною 1 см та вимірювали поглинання сорбенту у тонкому шарі при 750 нм. Концентрацію поліфенолу у розчині визначають за градувальним графіком. Допустимим вважають такий вміст сторонніх іонів, при якому відносна похибка не перевищує 5 %.

5 Результати дослідження заважаючого впливу сторонніх іонів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Допустимі кількості заважаючих іонів при визначенні 75 мкмоль/л таніну у розчині

Сторонні іони, X	Допустиме співвідношення Танін: X
K ⁺ , Na ⁺	Не заважають
Ca ²⁺	Не заважає
Лимонна кислоти	1:10
Fe ³⁺	1:1
Cu ²⁺	1:5
Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻	Не заважають
Аскорбінова кислота	1:2
Винна кислота	1:10

Приклад 5-7

Оцінка загального вмісту поліфенолів тест-методом у стандартних розчинах.

10 Для оцінки вмісту поліфенолів за способом, наведеним у прикладі 2 у хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять по 0,5 мл(приклад 5), 1 мл (приклад 6) та 2 мл (приклад 7) проби, по 2,5 мл 0,7 моль/л розчину Na₂CO₃ і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл, додають 0,075 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою впродовж 10 хв. Сорбент відокремлюють декантацією, послідовно промивають трьома порціями дистильованої

15 води та за кольоровою тест-шкалою визначають вміст аналіту.

Результати оцінки загального вмісту поліфенолів у стандартних розчинах в перерахунку на вміст кверцетину наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати оцінки вмісту поліфенолів у стандартних розчинах (P=0,95, n=3)

Приклад №	Введено, мг _{кверцетину} /л	Знайдено, мг _{кверцетину} /л	Sr
5	6	6±2	0,3
6	12	12±3	0,25
7	24	25±7	0,28

20 Видно, що відносне стандартне відхилення не перевищує 30 %, що є прийнятним для візуальних тест-методів.

Приклади 8-10.

Оцінка загального вмісту поліфенолів тест-методом у соках ТМ "Sandora".

25 Для оцінки вмісту поліфенолів за способом, наведеним у прикладі 3, соки ТМ "Sandora" фільтрують крізь фільтрувальний папір „синя стрічка” для відокремлення осаду фруктові сировини.

30 Оцінку вмісту поліфенолів у соках проводять наступним чином: у хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять по 0,1 мл проби гранатового (приклад 8), виноградного (приклад 9) соку та соку з іспанського винограду (приклад 10), по 2,5 мл 0,7 моль/л розчину Na₂CO₃ і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. Сорбент (0,1 г) обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та за кольоровою тест-шкалою визначають вміст аналіту.

35 Результати оцінки загального вмісту поліфенолів у соках в перерахунку на вміст таніну наведено у таблиці 3. Результати визначення розробленим ТСФ методикою співставлено з результатами отриманими при визначенні стандартною методикою, що базується на реакції відновлення реактиву Фоліна у розчині [2, 3].

Таблиця 3

Результати оцінки загального вмісту поліфенолів у соках за розробленою (I) та СФ методиками із використанням РФ (II) ($P=0,95$, $n=3$)

Приклад №	I, г _{таніну} /л	II, г _{таніну} /л
8	1,6±0,3	1,5±0,1
9	2,0±0,4	1,4±0,2
10	5±1	5,2±0,3

Дані отримані за розробленою методикою корелюють з даними, отриманими за СФ методикою із використанням РФ у розчині. Занижений результат при аналізі СФ методикою із використанням Ад (III) може свідчити про наявність в соках органічних відновників іншої природи. Отримані результати свідчать про придатність заявленого способу для оцінки загального вмісту поліфенолів у соках та їх антиоксидантної активності.

Таким чином, запропонований спосіб є простим та експресним для напівкількісного визначення поліфенолів та оцінки антиоксидантних властивостей досліджуваних об'єктів. Порівняно з аналогом підвищено чутливість визначення поліфенолів в перерахунку на речовину-стандарт (МВ кверцетину (таніну) становить 1 (5) мг/л), використання комерційно доступного реактиву Фоліна, як модифікатора, дозволяє уникнути процедур синтезу реагенту, завдяки чому спростити процес створення готової аналітичної форми.

Джерела інформації:

1. O. A. Zaporozhets, E. A. Krushinskaya, N. A. Lipkovskaya, V. N. Barvinchenko // J. Agric. Food Chem. -2004. - Vol. 52. - P. 21-25.
2. K. Leamsomrong, M. Suttajit, P. Chantiratikul // Asian J. Applied Sci.-2009. - Vol. 2. - P. 184-190.
3. A. Alonso, C. Dominguez, D. A. Guillen, C. Barroso // J. Agric. Food Chem.-2002... V. 50. - P. 3112-3115.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб оцінки загального вмісту поліфенолів тест-методом, у якому проводять обробку об'єкта, що їх містить, модифікованим сорбентом, який попередньо обробляють стандартним розчином таніну або кверцетину і порівнюють колір сорбенту, що містить об'єкт, із одержаною стандартною кольоровою шкалою, який **відрізняється** тим, що як сорбент використовують силікагель SG-60, функціоналізований тетрадециламонію нітратом, а як модифікатор сорбенту використовують реактив Фоліна.

Комп'ютерна верстка С. Чулій

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

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