



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96074 (13) C2

(51) МПК

G01N 21/75 (2006.01)

G01N 33/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХІНІВ

1

(21) а201005405

(22) 05.05.2010

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

(72) БЕЛЬТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, БИЧКОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА

(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

(56) US 6333199 В1 25.12.2001

Шафигулин Р.В., Буланова А.В. ВЭЖХ частично ферментированных сортов чая. Вестник СамГУ - Естественнонаучная серия. 2007, №2 (52), С. 134-139

2

Бельтюкова С.В., Бычкова А.А. Определение антиоксидантов фенольного типа в растительном сырье. Харчова наука і технологія. №3 (8), 2009, С. 60-63

(57) Спосіб визначення катехінів, що включає відбір проби, виділення катехінів, взаємодію їх з хімічним 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 рН=4,3-4,5.

Винахід належить 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, Р. 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 високоефективної рідинної хроматографії [див. Шафигулин Р.В., Буланова А.В. ВЭЖХ частично ферментативних сортов чая. 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 °С протягом 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 RP C18. Елюювання 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

(13) C2

(11) 96074

(19) UA

хвилин концентрація ацетонітрилу 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 концентрацією 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 вибране прототипом.

Прототип і винахід, 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 прототипом 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 дорогої апаратури. Усе це значно ускладнює виконання аналізу.

В основу винаходу 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 винаході, 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 цитрат-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 утворюють комплексну сполуку з катехінами на поверхні сорбенту. Застосування такого прийому дозволяє проводити визначення катехінів шляхом порівняння I люм. проби з I 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 опромінюванні 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 разу 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 (I люм.) катехінів посилюється у 2 рази за рахунок того, що зростає жорсткість молекули й зменшуються внутрішньо молекулярні 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 I 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 вибраний 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 сор-

бенту (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 інтенсивності 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 разу 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 ± 5 °С. 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), поміщують у пробірку, перемі-

шують 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) й 0,3 мл ацетатного буферного розчину з pH=4,3 й перемішують протягом 15 хвилин. Осад відфільтровують і висушують протягом 120 хвилин при 100 °С. Далі розтирають до порошкоподібного стану і реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на сорбенті при $\lambda_{\text{изл.}} = 516$ нм, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб}} = 365$ 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

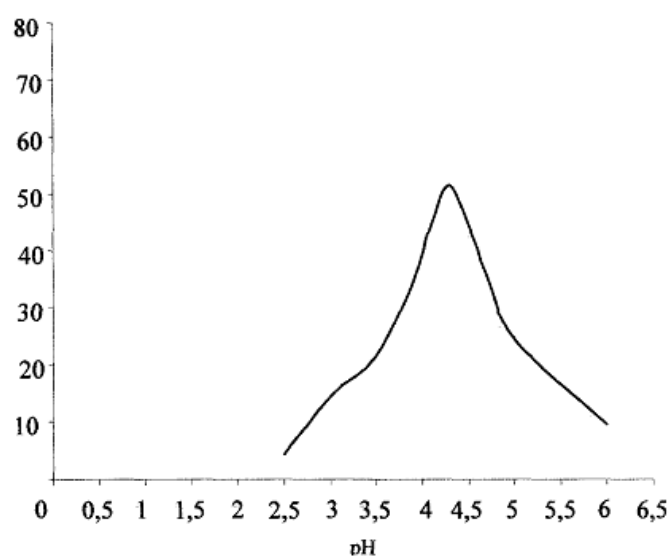
№	Чай	Вміст катехінів, мг/г сухого чаю
1.	«Майский черный среднелистовой «Золотые лепестки», Цейлонская коллекция»	6,75
2.	«Майский черный крупнолистовой байховый «Царська корона»	8,25
3.	«Майский зеленый крупнолистовой «Китайский дракон», Китайская коллекция»	45
4.	«Майский черный среднелистовой байховый, Цейлонская коллекция»	12,8
5.	«Lipton», Yellow label tea, листовый»	27,3
6.	«Lipton», Orange Jaiyug»	15
7.	«Элегия», Китайский зеленый листовый 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»

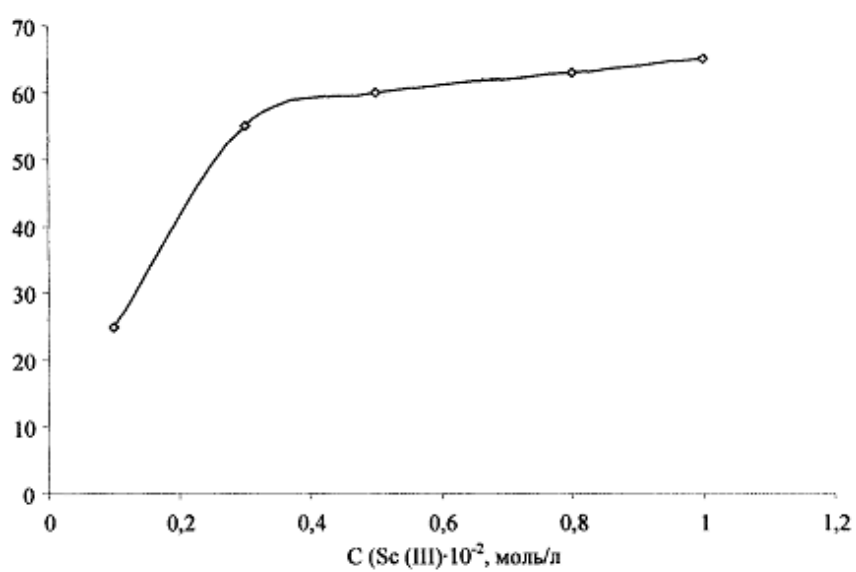
Добавка мг	Знайдено в пробі з добавкою, мг	Знайдено в пробі, мг	Sr
0,150	0,361	$0,21 \pm 0,02$	0,048
0,20	0,44	$0,24 \pm 0,01$	0,052

I люм., відн.од.

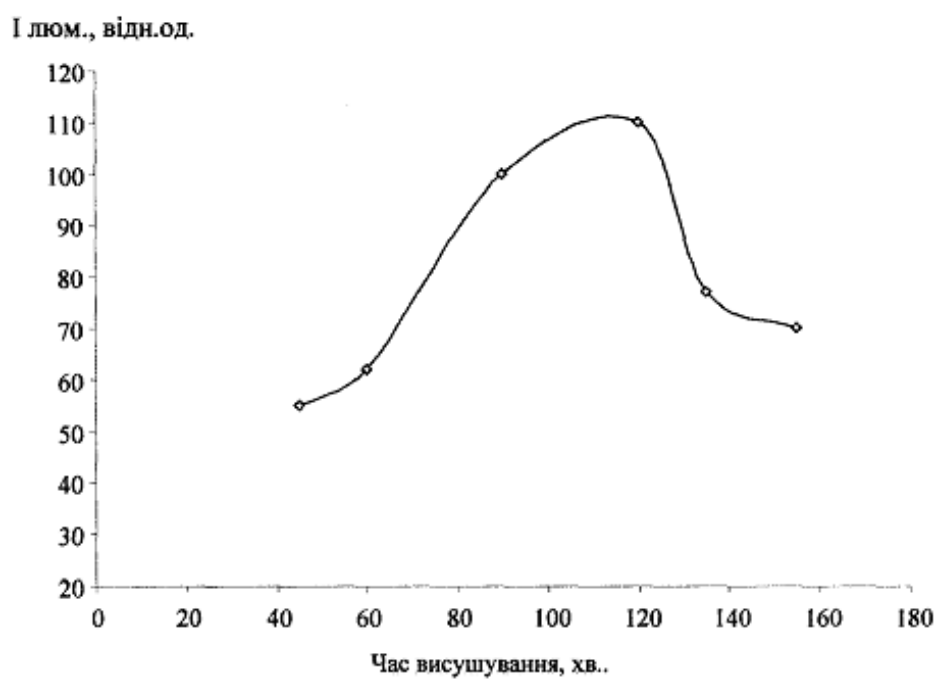


Фиг. 1

I люм., відн.од.



Фиг. 2



Фіг. 3