



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101250** (13) **C2**

(51) МПК (2013.01)

G01N 21/63 (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 10127	(72) Винахідник(и):	Запорожець Ольга Антонівна (UA), Бас Юлія Петрівна (UA), Петрух Мар'яна Василівна (UA)
(22) Дата подання заявки:	16.08.2011	(73) Власник(и):	КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА, вул. Володимирська, 64, м. Київ, 01601 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід:	11.03.2013	(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., V. 50, P.3112-3115 O.A. Zaporozhets, E.A. Krushinskaya, N.A. Lipkovskaya, V.V. Sukhan Solid-phase reagent for analgin and absorbic acid on the bais of a copper(II) complex witch tetrabenzotetraazacyclohexadecine immobilized by absorption on silica gel // Journal of Analytical Chemistry., 2001, Vol.56, No.6, P. 524-529 Grubesiz Jurisiz, Vukoviz J., Kremer D., Vladimir-Knezeviz S. Spectrophotometric method for polyphenols analysis: Prevalidation and application on Plantago L. species // J. Pharm. and Biomed. Anal., 2005., Vol.39, No. 3-4, P. 837-842 Ma Yam-Tak, Cheung Peter C. K. Spectrophotometric determination of phenolic compounds by enzymatic and chemical methods-A comparison of structure-activity relationship // J. Agr. and Food Chem., 2007, Vol.55, No.10, P. 4222-4228 Запорожець О.А., Крушинська О.А. // Магістеріум "Природничі науки". Вип.16. - Київ: видавничий дім "Києво-Могилянська академія", 2005. - С. 63-66 Федосеева А.А., Лебедкова О.С., Каниболоцкая Л.В., Шендрік А.Н. Антиоксидантная активность настоев чая // Химия растительного сырья, 2008, №3, С. 123-127
(41) Публікація відомостей про заявку:	27.02.2012, Бюл.№ 4		
(46) Публікація відомостей про видачу патенту:	11.03.2013, Бюл.№ 5		

UA 101250 C2

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ВМІСТУ ПОЛІФЕНОЛІВ

(57) Реферат:

Спосіб визначення загального вмісту поліфенолів, що включає обробку об'єкту силікагелем, модифікованим реактивом Фоліна та функціоналізованим тетрадециламонію нітратом, в середовищі Na_2CO_3 і наступне твердофазно-спектрофотометричне детектування у тонкому шарі.

Запропонований спосіб належить до аналітичної хімії, зокрема до комбінованих спектрофотометричних методів визначення поліфенолів і може бути використаний при аналізі біодобавок, напоїв та харчових продуктів.

В цій галузі прийнято використовувати такі терміни і скорочення:

- 5 ГПК - гетерополікислота.
- РФ - реактив Фоліна.
- ТДАН - тетрадециламонію нітрат.
- ТДАН-СГ - силікагель, модифікований ТДАН.
- РФ-ТДАН-СГ - силікагель, модифікований ТДАН та РФ.
- 10 ТСФ - твердофазна спектрофотометрія.
- ГГ - градувальний графік.

Відомий спосіб спектрофотометричного визначення загального вмісту поліфенолів, який полягає в тому, що як окисно-відновний реагент застосовують реактив Фоліна-Чокальте [1, 2]. Основним недоліком вказаних способів визначення поліфенолів є незадовільна відтворюваність, що зумовлена псевдоколоїдним станом відновлених форм ГПК у розчині.

Найбільш близьким до запропонованого способу є твердофазно-спектрофотометричний метод який заключається в тому, що закріплений на кремнеземі макроциклічний комплекс Купруму та тетрабензо [b, f, j, n] [1, 5, 9, 13] тетраазоциклогексадецину обробляють розчином поліфенолу в середовищі карбонатного буферного розчину ($\text{pH}=10,5\pm 0,1$) [3, 4]. Градувальний графік для визначення кверцетину запропонованим методом лінійний в межах 40-240 мг/л, а межа виявлення кверцетину розрахована за 3s критерієм становить 15 мг/л. Основним недоліком цього методу є те, що він передбачає попередній синтез модифікатора - комплексу купруму (II).

В основу винаходу поставлена задача підвищити чутливість та вибірковість визначення поліфенолів, які проявляють антиоксидантні властивості у біодобавках та напоях.

Поставлена задача вирішується за рахунок того, що спосіб визначення включає відновлення іммобілізованого на сорбенті РФ розчином поліфенолу у $\geq 0,35$ моль/л розчині Na_2CO_3 з наступним детектуванням світлопоглинання сорбенту у тонкому шарі ($1=1$ см) методом ТСФ. Як сорбент, використовують силікагель марки SG-60, модифікований тетрадециламонію нітратом (ТДАН-СГ).

Градувальний графік, що використовують для визначення загального вмісту поліфенолів, лінійний у діапазоні концентрацій 3-30 мг/л та 25-230 мг/л при використанні як речовини-стандарту кверцетину та таніну відповідно. Рівняння градувальних графіків (ГГ) мають вигляд:

$$A=(0,048\pm 0,002)+(5,4\pm 0,1)C_{\text{кверцетину}} \text{ (г/л)},$$

$$A=(0,47\pm 0,01)+(2,1\pm 0,2)C_{\text{таніну}} \text{ (г/л)}.$$

Використання способу, що заявляється, дає змогу підвищити чутливість визначення поліфенолів (МВ кверцетину (таніну) становить 1 (14) мг/л) та покращити вибірковість визначення відносно аскорбінової кислоти.

Застосування ТСФ методу на основі РФ іммобілізованого на модифікованому ТДАН силікагелі, для визначення суми поліфенолів 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.

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

Приклад 2

Вибір оптимальної довжини хвилі реєстрації аналітичного сигналу.

Для вибору оптимальної довжини хвилі в стакан ємністю 25,0 мл вводять аліквоту стандартного (640 мг/л) водно-етанольного (2:1) розчину кверцетину, 2,5 мл 1 моль/л розчину Na_2CO_3 та водно-етанольну суміш (2:1) до загального об'єму 5 мл; додають 0,1 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою протягом 15 хв. Сорбент відокремлюють, послідовно промивають трьома порціями дистильованої води, переносять у кювету та вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі ($1=0,1$) в діапазоні довжин хвиль 400-996 нм. Максимум світлопоглинання РФ-ТДАН-СГ після обробки розчином кверцетину спостерігається при довжині хвилі 750 нм.

Приклад 3

Вибір оптимального часу взаємодії РФ-ТДАН-СГ з розчином поліфенолу.

В шість хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вносять аліквотні частини стандартного розчину кверцетину (таніну), концентрацією 604,0 (640) мг/л, по 2,5 мл 1 моль/л розчину Na_2CO_3 та доводять до загального об'єму 5 мл; додають по 0,1 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою протягом 1, 2, 5, 10, 15 та 20 хв. Сорбенти відокремлюють, послідовно промивають трьома порціями дистильованої води, переносять у кювету та вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі ($l=0,1$) при довжині хвилі 750 нм. Оптимальний час взаємодії РФ-ТДАН-СГ з таніном становить 1 хв, а з кверцетином - 10 хв.

Приклад 4

Вибір оптимального співвідношення об'єму розчину поліфенолу до маси РФ-ТДАН-СГ.

В п'ять хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вносять по 1 мл стандартного водно-етанольного (2:1) розчину кверцетину, концентрацією 604,0 мг/л, по 2,5 мл 1 моль/л розчину Na_2CO_3 та водно-етанольну суміш до загального об'єму 2, 5, 10, 20 та 50 мл; додають по 0,1 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою протягом 1, 2, 5, 10, 15 та 20 хв. Сорбенти відокремлюють, послідовно промивають трьома порціями дистильованої води, переносять у кювету та вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі ($l=0,1$) при довжині хвилі 750 нм. Аналітичний сигнал залишається сталим при співвідношенні об'єму розчину і маси РФ-ТДАН-СГ ≤ 70 мл/г.

Приклад 5

Встановлення оптимальної концентрації розчину карбонату натрію.

В п'ять хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вносять по 0,25 мл стандартного водно-етанольного (2:1) розчину кверцетину, концентрацією 604,0 мг/л, по 2,5 мл розчину Na_2CO_3 , концентрацією 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,7; 1 моль/л та водно-етанольну суміш до загального об'єму 5 мл; додають по 0,075 г модифікованого сорбенту та перемішують магнітною мішалкою протягом 10 хв. Сорбенти відокремлюють, послідовно промивають трьома порціями дистильованої води, переносять у кювету та вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі ($l=0,1$) при довжині хвилі 750 нм. Аналітичний сигнал залишається сталим при концентрації $\text{Na}_2\text{CO}_3 \geq 0,35$ моль/л.

Приклад 6

Побудова ГГ для визначення кверцетину.

В хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять стандартний водно-етанольний розчин кверцетину (604,0 мг/л) об'ємом 0,25; 0,60; 0,85; 1,00; 1,90 та 2,50 мл, по 0,1 мл $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л розчину флуориду натрію, 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 протягом 10 хв. Сорбент відокремлюють, послідовно промивають трьома порціями дистильованої води, переносять у кювету для ТСФ вимірювань товщиною 0,1 см та вимірюють оптичну густину при 750 та 996 нм. Рівняння градувального графіка, побудованого в координатах $\Delta A = f(C_{\text{кверцетину}})$ і має вигляд:

$$\Delta A = (0,048 \pm 0,002) + (5,4 \pm 0,1) C_{\text{кверцетину}} \text{ (г/л)}, R^2 = 0,999$$

Діапазон лінійності ГГ в межах 3-30 мг/л кверцетину.

Приклад 7

Побудова ГГ для визначення таніну.

В хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять всі розчини, як в прикладі 6, крім розчину кверцетину, замість якого вводять 0,20; 0,30; 0,70; 1,00, 1,40 та 1,80 мл, 640 мг/л водного розчину таніну. Всі операції, як в прикладі 6. Рівняння градувального графіка, побудованого в координатах $\Delta A = f(C_{\text{таніну}})$, має вигляд:

$$\Delta A = (0,47 \pm 0,01) + (2,1 \pm 0,2) C_{\text{таніну}} \text{ (г/л)}, R^2 = 0,992$$

Діапазон лінійності ГГ в межах 25-230 мг/л таніну.

Приклад 8-15

Вплив сторонніх іонів на результати визначення поліфенолів на прикладі таніну.

В 8 хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вводять по 1,0 мл розчину таніну (0,38 ммоль/л), 2,50 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 , 1-1,5 мл стороннього іону, концентрація яких в межах 75 мкмоль/л - 2,5 ммоль/л (Табл. 1) та дистильовану воду до загального об'єму 5 мл. Сорбент (0,1 г) обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та вимірюють світлопоглинання в тонкому шарі $l=0,1$ см при 750 та 996 нм. Концентрацію поліфенолу у розчині визначають за градувальним графіком (приклад 7). Допустимим вважають такий вміст стороннього іону, при якому відносна похибка не перевищує 5 %.

Результати дослідження заважаючого впливу сторонніх іонів наведено у таблиці 1.

Таблиця 1

Допустимі кількості заважаючих іонів при визначення 75 мкмоль/л таніну

Приклад №	Сторонні іони, X	Допустиме співвідношення Танін: X
8	K^+, Na^+	Не заважають
9	Ca^{2+}	Не заважає
10	Лимонна кислоти	1:10
11	Fe^{3+}	1:1
12	Cu^{2+}	1:5
13	Cl^-, CO_3^{2-}, NO_3^-	Не заважають
14	Аскорбінова кислота	1:2
15	Винна кислота	1:10

Приклади 16-17

Визначення поліфенолів у препаратах "Кверцетин. Гранули" та "Вин-Віта".

- 5 Для визначення поліфенолів за способом, наведеним у прикладі 6, у фарфоровій ступці вміст упаковки (~2 г) препарату "Кверцетин. Гранули" розтирають в порошок, відбирають точну наважку 0,0312 г та розчиняють у 25 мл водно-етанольної суміші (2:1).

- 10 В хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять 0,9 мл розчину препарату "Кверцетин. Гранули" (приклад 16), 2,50 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 та водно-етанольну (2:1) суміш до загального об'єму 5 мл. Перемішують 10 хв з 0,075 г РФ-ТДАН-СГ, декантують, промивають сорбент 0,7 моль/л розчином Na_2CO_3 і вимірюють світлопоглинання в тонкому шарі $l=0,1$ см при 750 та 996 нм. Концентрацію поліфенолів визначають за ГГ та перераховували на вміст кверцетину у пробі.

- 15 Для визначення поліфенолів за способом, наведеним у прикладі 7, 1/5 частину препарату "Вин-Віта" центрифугують впродовж 5 хв. для седиментації осаду виноградної сировини, відбирають аліквоту (1 мл) і розбавляють дистильованою водою до загального об'єму 25,0 мл для приготування вихідного розчину препарату.

- 20 В хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять 1,3 мл (приклад 17) вихідного розчину препарату "Вин-Віта", 2,50 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 та дистильовану воду до загального об'єму 5 мл. Перемішують 10 хв з 0,075 г РФ-ТДАН-СГ, декантують, промивають сорбент 0,7 моль/л розчином Na_2CO_3 і вимірювали світлопоглинання в тонкому шарі $l=0,1$ см при 750 та 996 нм. Концентрацію поліфенолів визначають за ГГ та перераховували на вміст таніну у пробі.

- 25 Результати визначення розробленим ТСФ методикою, співставлено з результатами отриманими при визначенні стандартними методиками, що базується на реакціях комплексоутворення Al (III) з поліфенолом [5] та відновлення реактиву Фоліна у розчині [2].

Результати визначення поліфенолів у препаратах "Кверцетин. Гранули" та "Вин-Віта" наведено у таблиці 2.

Таблиця 2

Результати визначення вмісту поліфенолів в 1,0 г або 1,0 мл препарату "Кверцетин. Гранули" (приклад 15) та "Вин-Віта" (приклад 16) за розробленою методикою (I) і СФ методиками з Al (III) (II) та РФ (III) (P=0,95, n=3)

Приклад №	I	II	III
16	36±2	38,9±0,7	37±1
17	1,0±0,2	-	1,0±0,1

- 30 З таблиці видно, що дана методика характеризується задовільною точністю та відтворюваністю (відносне стандартне відхилення не перевищує 10 %).

Приклади 18-20

Визначення загального вмісту поліфенолів у соках ТМ "Sandora".

- 35 Для визначення вмісту поліфенолів за способом, наведеним у прикладі 7, соки "Sandora" фільтрують крізь фільтрувальний папір „синя стрічка" для відокремлення осаду фруктових сировини.

Визначення вмісту поліфенолів у соках проводять наступним чином: у хімічні стакани ємністю 25 мл вводять по 0,1 мл проби гранатового (приклад 18), виноградного (приклад 19) соку та соку з іспанського винограду (приклад 20), 2,5 мл 0,7 моль/л розчину Na_2CO_3 і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5 мл. Сорбент (0,1 г) обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та вимірюють світлопоглинання в тонкому шарі. Концентрацію поліфенолу у розчині визначають за градувальним графіком. Результати визначення загального вмісту поліфенолів у соках 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].

Таблиця 3

Результати визначення вмісту поліфенолів у соках
за розробленою методикою (I) і СФ методиками з РФ у розчині (II) ($P=0,95$, $n=3$)

Приклад №	I, $\Gamma_{\text{таніну}}/\text{л}$	II, $\Gamma_{\text{таніну}}/\text{л}$
18	$1,7 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,1$
19	$1,9 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,1$
20	$4,6 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,3$

Дані таблиці 3 корелюють між собою, що свідчать про придатність заявленого способу для визначення загального вмісту поліфенолів у соках.

Таким чином, запропонований спосіб характеризується задовільними точністю та відтворюваністю. Використання кремнезему модифікованого ТДАН та реактивом Фоліна у вигляді готової аналітичної форми дозволяє, порівняно з аналогом, підвищити чутливість визначення поліфенолів (МВ кверцетину (таніну) становить 1 (14) мг/л) та вибірковість відносно аскорбінової кислоти (фактор селективності 2).

Джерела інформації:

1. Leamsomrong K., Suttajit M., Chantiratikul P. // Asian J. Applied Sci.-2009. - Vol. 2. - P. 184-190.
2. Alonso A., Dominguez C., Guillen D.A., Barroso C. // J. Agric. Food Chem.-2002. - V.50. - P. 3112-3115.
3. Запорожець О.А., Крушинська О.А., Ліпковська Н.А., Сухан В.В. // ЖАХ - 2001. - Т. 56, № 6. - С. 591-596.
4. Запорожець О.А., Крушинська О.А. // Магістеріум "Природничі науки". Вип.16. - Київ: видавничий дім "Києво-Могилянська академія", 2005. - С. 63-66.
5. Беліков В.В., Точкова Т.В. // Фарм. журн.-1973. - № 5. - С. 40-44.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення загального вмісту поліфенолів, який включає обробку сорбенту модифікованого силікагелю розчином поліфенолу в середовищі Na_2CO_3 з наступним детектуванням світлопоглинання сорбенту у тонкому шарі методом твердофазної спектрофотометрії, який **відрізняється** тим, що як сорбент використовують силікагель, функціоналізований тетрадециламонію нітратом, а як модифікатор - реактив Фоліна.

Комп'ютерна верстка Л. Купенко

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