



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 102108

(13) C2

(51) МПК

G01N 21/75 (2006.01)

G01N 21/78 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(21) Номер заявки: а 2011 02699

(22) Дата подання заявки: 09.03.2011

(24) Дата, з якої є чинними
права на винахід: 10.06.2013

(41) Публікація відомостей
про заявку: 25.04.2012, Бюл.№ 8

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: 10.06.2013, Бюл.№ 11

(72) Винахідник(и):

Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA),
Бичкова Ганна Олексіївна (UA)

(73) Власник(и):

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039, Україна
(UA)

(56) Перелік документів, взятих до уваги
експертизою:

DE 102005029920 A, 04.01.2007
Бенетис Р., Радушене И., Якштас В.
Количественное определение фенольных
соединений в лекарственном сырье
тысячелистника обыкновенного методом
ВЭЖХ.- Химико-фармацевтический
журнал.- 2008.- Т. 42.- вып. 3.- С. 51-54
Мечикова Г.Я., Степанова Т.А., Загузова
Е.В. Количественное определение суммы
фенольных соединений в листьях
земляники.- Химико-фармацевтический
журнал.- 2007.- т. 41.- вып. 2.- с. 38-41
Теслюк О.І. Комплекси Eu(III) та Tb(III) з
похідними хінолонкарбонової кислоти та
застосування їх в аналізі. Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук Одеса - 2001. - С.
1-18

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

(57) Реферат:

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення суми фенольних сполук у рослинній сировині. Запропонований спосіб люмінесцентного визначення суми фенольних сполук в рослинній сировині заснований на використанні сенсibiliзованої люмінесценції іонів тербію, яка реєструється у фазі сорбенту, причому як сорбент використовують Sephadex G-75, при цьому інтенсивність люмінесценції сорбату зростає у присутності донорно-активної добавки триоктилфосфіноксиду, а сорбцію поліфенольних сполук здійснюють при рН 4,2-4,4 в присутності ацетатного буферного розчину.

UA 102108 C2

Винахід стосується аналітичної хімії, зокрема 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., Радущене 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 Waters 2690 Alliance 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 зворотно-фазової 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 винаходу, 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 загального 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 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 °С 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 зразку галової кислоти, приготовленого аналогічно випробуваному розчину.

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

Це рішення вибрано прототипом.

Прототип і винахід, 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 рН $\leq 7,0$ оптична густина не досягає максимального значення, у наслідок неповноти протікання реакції. При рН $\geq 8,0$ у реакційній суміші випадає осад.

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

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

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

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб, в якому за рахунок застосування реакції взаємодії фенольних сполук з іонами Tb(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 тим, що 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 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 pH=4,2-4,4.

Причинно-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 виборчою у групі інших антиоксидантів (токоферолі, антоціани, антиоксидантні ферменти), які не виявляють реакції з іонами Tb(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 володіють люмінесцентними ознаками 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 градувального 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 графіках, 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 обрані 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, іммобілізованом іонами тербію (III). Для подальшого аналізу був обраний сорбент Sephadex G-75.

Час сорбції фенольних сполук становить 10-15 хвилин. Інтенсивність люмінесценції комплексів залежить від pH розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить pH=4,2-4,4. Для створення оптимального значення pH розчину використовували ацетатний буферний розчин з pH=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). Обрана 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 галоїї кислоти. Лінійна область залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації галоїї кислоти спостерігається у діапазоні концентрацій галоїї кислоти 0,045-1,7мкг/мл.

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

Наважку 1 г сухого подрібненого листа ромашки аптечної переносять у колбу, додають 50мл 70 %-ого 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 %-им етанолом.

Приготування стандартного розчину галоїї кислоти: 0,05 г (точна наважка) стандартного зразку галоїї 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 1 мл водного розчину хлориду тербію (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), поміщують у пробірку, перемішують протягом 5 хвилин до гелеподібного стану. Потім в пробірку додають по 0,5 мл екстракту квіток ромашки аптечної, у дві з них додають по 0,5 мл стандартного розчину галоїї 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 %-им 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 $\lambda_{\text{изл}}=545$ нм, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб.}} = 365$ нм).

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., Радущене 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.

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

5

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб тест-визначення суми фенольних сполук в рослинній сировині, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику з відокремленням 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 (III), модифікованими на поверхні сорбенту, в присутності триоктилфосфіноксиду та ацетатного буферного розчину при рН=4,2-4,4 і вимірюють аналітичний сигнал сенсibiлізованої люмінесценції іонів Tb (III).

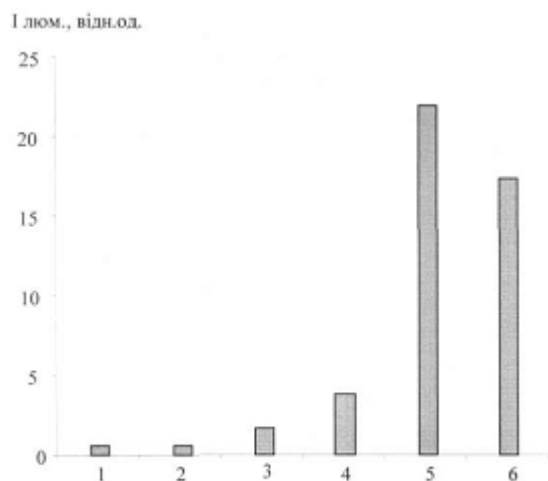


Fig. 1

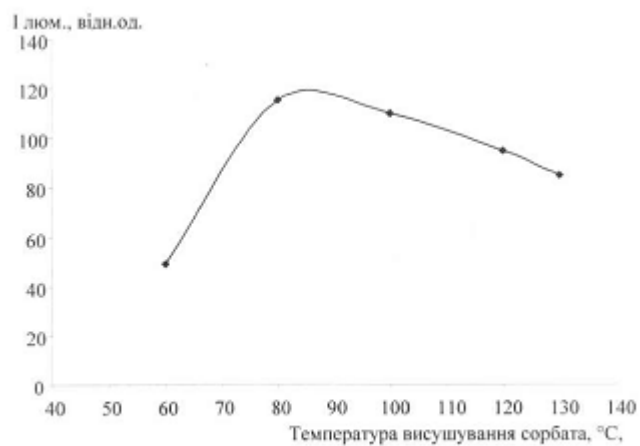


Fig. 2

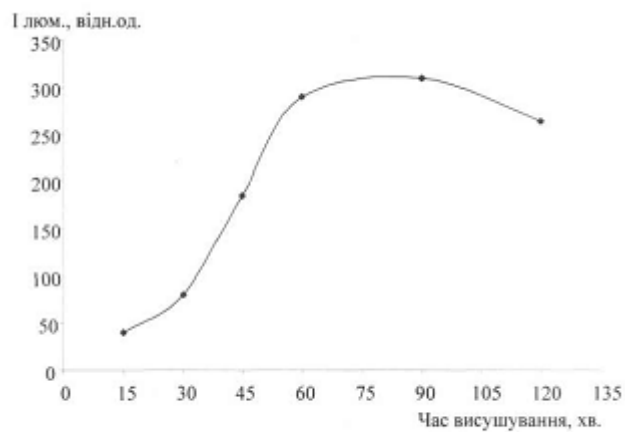


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

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