



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 121009

(13) C2

(51) МПК

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 30/90 (2006.01)

G01N 30/94 (2006.01)

G01N 33/14 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО РОЗВИТКУ
ЕКОНОМІКИ, ТОРГІВЛІ ТА
СІЛЬСЬКОГО ГОСПОДАРСТВА
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

- (21) Номер заявки: **а 2019 02683**
- (22) Дата подання заявки: **19.03.2019**
- (24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.03.2020**
- (41) Публікація відомостей про заявку: **12.08.2019, Бюл.№ 15**
- (46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.03.2020, Бюл.№ 5**
- (72) Винахідник(и):
**Бельтюкова Світлана Вадимівна (UA),
Теслюк Ольга Іванівна (UA),
Лівенцова Олена Олегівна (UA)**
- (73) Власник(и):
**ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ,
вул. Канатна, 112, м. Одеса, 65039 (UA),
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В.
БОГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ
НАУК УКРАЇНИ,
вул. Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса,
65080 (UA)**

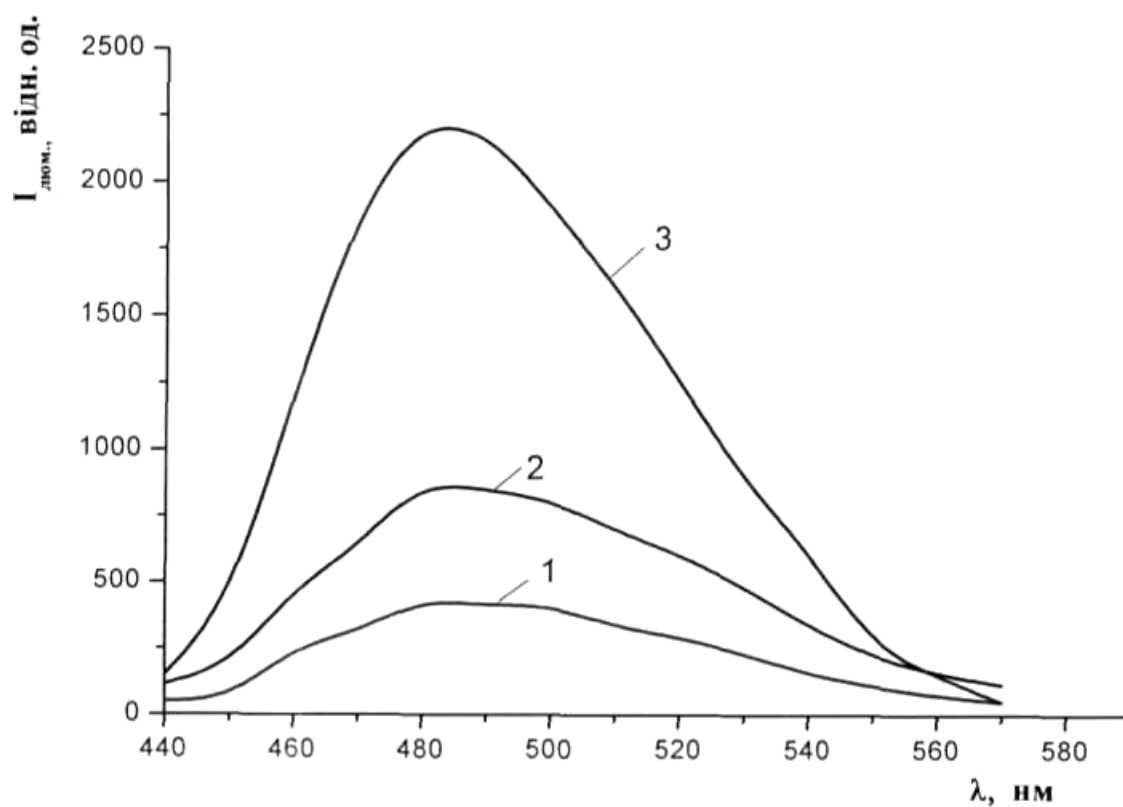
- (56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
- Anli R. E. An alternative method for the determination of some of the antioxidant phenolics in varietal turkish red wines / R. E. Anli, N. Vural, E. Kizilet // Journal of the Institute of Brewing. – 2008. – Vol. 114. – №. 3. – P. 239-245
- Wang J. P. Chemiluminescence determination of ferulic acid by flow-injection analysis using cerium (IV) sensitized by rhodamine 6G / J. P. Wang, N. B. Li, H. Q. Luo // Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. – 2008. – Vol. 71. – №. 1. – P. 204-208
- Li L. N. Permanganate-based chemiluminescence analysis of ferulic acid using flow injection / L. N. Li, N. B. Li, H. Q. Luo // Analytical sciences. – 2005. – Vol. 21. – №. 8. – P. 963-966
- Mabinya L. V. Determination of ferulic acid and related compounds by thin layer chromatography / L. V. Mabinya, T. Mafunga, J. M. Brand // African journal of Biotechnology. – 2006. – Vol. 5. – №. 13. – P. 1271-1273
- Ван С. Г. определение феруловой кислоты в китайской патентованной медицине с помощью сенсора на основе пленки полиглутаминовой кислоты / С. Г. Ван, Д. Ли, Я. Д. Фан, С. Жан // Электрохимия. – 2012. – Т. 48. – №. 12. – С. 1272-1272
- Стасевич О. В. Анализ феруловой кислоты в растениях, содержащих фенолпропаноиды / О. В. Стасевич, Е. С. Лихтарович, С. Н. Шемет // Труды БГТУ. Серия 2: Химические технологии, биотехнология, геоэкология. – 2014. – №. 4. – С. 200-203

UA 121009 C2

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ФЕРУЛОВОЇ КИСЛОТИ У ВИНАХ**(57) Реферат:**

Винахід стосується способу кількісного визначення ферулової кислоти у винах, що включає відбір проби, відокремлення ферулової кислоти, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, в якому ферулову кислоту відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, піддають взаємодії на пластинці з розчином хлориду ітрію (III) та

неіоногенною поверхнево-активною речовиною Неонол 9-12 при рН 6,5-6,7 і вимірюють інтенсивність люмінесценції ферулової кислоти при $\lambda_{\text{випр.}}=485$ нм.



Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема до способу кількісного визначення біологічно-активної речовини поліфенольного типу - ферулової кислоти (ФК), яка належить до оксикорічних кислот, у виноградних винах.

Відомий спосіб визначення ферулової кислоти за допомогою сенсора на основі плівки з поліглутаміновою кислотою [див. Ван С.Г., Ли Дж., Я-Дж. Фан., Жан С. Определение феруловой кислоты в китайской патентованной медицине с помощью сенсора на основе пленки полиглутаминовой кислоты. Электрохимия, 2012, т.48, № 12, с. 1272-1278.], оснований на використанні електрохімічного сенсора, модифікованого поліглутаміновою кислотою. На поверхні скловуглецевого електрода, яка модифікована поліглутаміновою кислотою, відбувається окиснення ферулової кислоти, внаслідок чого спостерігається зростання електрохімічного струму. Однак цей метод має суттєвий недолік. Він потребує виготовлення скловуглецевого електрода, модифікованого глютаміновою кислотою. Розчини, які використовуються, повинні визволятися від кисню методом продувки нітрогеном та зберігатися в атмосфері нітрогену.

Найбільш близьким до винаходу, що заявляється, є спосіб визначення ферулової кислоти в винах, [див. R. Ertan Anh, Nilufer Vural, Ebru Kizilet. J. Institute of Brewing, 2008, V.114, № 3. P. 239-245.], оснований на виділенні ферулової кислоти методом газової хроматографії та детектуванні її мас-спектрометричним детектором.

Визначення проводили наступним чином. Відміряли аліквоту проби об'ємом 400 мл, створювали рН 2, тричі проводили екстракцію діетиловим ефіром (100 мл), потім етилацетатом (100 мл) тричі. Водний залишок сушили в середовищі азоту. Органічну фазу концентрували, висушували та розчиняли у воді (100 мл) при рН 7,0. Потім тричі проводили екстракцію діетиловим ефіром (100 мл) і тричі етилацетатом (100 мл).

Органічні фази об'єднували, сушили безводним сульфатом натрію, фільтрували, концентрували до сухого залишку, знову розчиняли у невеликому об'ємі дистильованої води та метанолу (1: 1) і сушили за допомогою потоку азоту (флавоноїдна фракція вина). Водний залишок з цієї екстракції доводили до рН 2,0 і знову екстрагували діетиловим ефіром (100 мл) три рази і потім три рази етилацетатом (100 мл).

Органічну фазу висушували безводним сульфатом натрію, фільтрували та повторно розчиняли у невеликому об'ємі дистильованої води та метанолу (1:1), і сушили потоком азоту (фракції фенольних кислот вина). Визначення фенольних компонентів, у тому числі і ферулової кислоти, проводили методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором на хроматографі Shimadzu Model OP 5000 GC-MS. Газохроматографічне розділення проводили на капілярній колонці 30 м TC5 з внутрішнім діаметром 0,25 мм і товщиною плівки 0,25 мкм. Як рухому фазу використовували гелій з швидкістю потоку 1,5 мл/хв. Визначення проводили за стандартними зразками. Це рішення вибрано прототипом. Прототип і винахід, що заявляється, мають такі спільні операції:

- відбір та приготування проби;
- відокремлення ферулової кислоти;
- взаємодія ферулової кислоти з хімічними реагентами;
- реєстрація аналітичного сигналу.

Однак спосіб за прототипом має суттєві недоліки. Він передбачає проведення дуже тривалої у часі та складної пробопідготовки, використання спеціальної апаратури, спеціальних капілярних колонок, різноманітних розчинників високого ступеня очищення, деякі з котрих є прекурсорами, наявність стандартних зразків ферулової кислоти для газової хроматографії.

В основу винаходу поставлено задачу розробити спосіб кількісного визначення ферулової кислоти у винах, в якому, за рахунок виділення ферулової кислоти методом тонкошарової хроматографії, проявлення пластинки розчином хлориду ітрію (III) та неіонної поверхнево-активної речовини Неонол 9-12, використання твердофазної люмінесценції ферулової кислоти у твердому шарі сорбенту, забезпечити спрощення визначення і скорочення часу проведення аналізу.

Поставлену задачу вирішено у способі визначення ферулової кислоти у винах, який включає відбір та приготування проби, відокремлення ферулової кислоти, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, тим, що ферулову кислоту відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, після чого піддають взаємодії її з розчином хлориду ітрію (III) та неіоногенною поверхнево-активною речовиною Неонол 9-12 при рН 6,5-6,7 і вимірюють інтенсивність люмінесценції ферулової кислоти при $\lambda_{\text{випр.}}=485 \text{ нм}$.

Новим у винаході, що заявляється, є використання реакції взаємодії ферулової кислоти з іонами Y(III) та поверхнево-активною речовиною Неонол 9-12 після виділення ферулової кислоти з розчину на хроматографічній пластинці з тонким шаром сорбенту - силікагелем і

утворенням комплексної сполуки ферулової кислоти з іонами $Y(III)$ безпосередньо у твердій фазі сорбенту.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляється, і досягнутим результатом можна пояснити наступним. Спрощення та скорочення часу проведення аналізу, виключення складної екстракції стало можливим завдяки наступним прийомам.

1. Використання попереднього вилучення ферулової кислоти на пластинках для ТШХ. Застосування цього прийому дозволяє виключити стадію попередньої екстракції поліфенольних сполук, в тому числі і ферулової кислоти, яка необхідна при використанні газової хроматографії з капілярними колонками.

2. Використання реакції взаємодії ферулової кислоти з іонами $Y(III)$ та поверхнево-активною речовиною Неонол 9-12 безпосередньо у тонкому шарі сорбенту на пластинках для ТШХ після виділення кислоти. Використання ТШХ для виділення ферулової кислоти дозволяє застосовувати для її проявлення як проявний розчин хлориду ітрію (III), з яким ферулова кислота утворює комплексну сполуку, яка має люмінесцентні властивості у тонкому шарі сорбенту. Для посилення люмінесценції використовують поверхнево-активну речовину Неонол 9-12, яка сприяє витісненню молекул води з внутрішньої координаційної сфери комплексу, внаслідок чого зменшується безвипромінювальна втрата енергії випромінювання та зростає інтенсивність люмінесценції (Фіг. 1).

Режими проведення аналізу вибрані експериментально. Найбільша інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу спостерігається при використанні проявного розчину з концентрацією іонів $Y(III)$ $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбату комплексу від кількості Неонол 9-12 виявило, що оптимальним є використання концентрації $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу залежить від рН проявного розчину. Ця величина становить рН 6,5-6,7. Для створення цього значення рН використовували розчин уротропіну 4 %-ного.

Як рухома фаза оптимальною виявилася суміш н-бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2). Як нерухому фазу використовували хроматографічні пластинки Merck TLC Aluminium Plates.

При виборі об'єму проби на пластинку наносили 0,2-6 мкл проби. Найкращий результат був досягнений при нанесенні проби об'ємом 2 мкл. При меншому або більшому об'ємі проби плями набувають витягнутої форми і непридатні для ідентифікації.

Визначення ферулової кислоти проводили у винах різних виробників.

Спосіб пояснюється кресленням, де:

зображені спектри люмінесценції сорбатів ФК (1) у присутності іонів $Y(III)$ (2) та Неонол 9-12 (3)

Приклад 1.

Пластинки Merck TLC Aluminium Plates перед використанням активували в сушильній шафі при 100-105 °C протягом 1 години. Пробу, що аналізували (вино Кінзмараулі, Грузія) розбавляли етанолом у співвідношенні 1:10. На лінію старту пластинки наносили мікропіпеткою 2 мкл досліджуваного зразка та стандартного розчину ферулової кислоти $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Хроматографічну пластинку поміщали у хроматографічну камеру з рухомою фазою, яку попередньо насичили 15 хвилин сумішшю розчинників (н-бутанол-оцтова кислота-вода у співвідношенні 4:1:2). Хроматографування проводили висхідним способом. Коли фронт розчинника досягав висоти 70 мм, пластинку витягали із камери й визначали положення фронту розчинників. Отриману хроматограму висушували у сушильній шафі при температурі 40 °C протягом 2 хв або на повітрі при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Для проявлення плям ферулової кислоти пластинку рівномірно і послідовно обробляли розчинами хлориду $Y(III)$ з концентрацією $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, Неонол 9-12 та 4 %-ним розчином уротропіну. Ідентифікацію ФК на пластинці проводили за появою люмінесценції в УФ світлі з $\lambda_{збуд.} = 365$ нм візуально порівнюючи $I_{люм.}$ проби і стандарту. Проявлені плями, що відповідають феруловій кислоті ($R_f = 0,52$), вирізали з пластинки і реєстрували $I_{люм.}$ при $\lambda_{випр.} = 485$ нм на спектрометрі СДЛ-1 у кюветі для твердих зразків.

Кількісне визначення ферулової кислоти проводили за градуїрувальним графіком, для побудови якого надходили таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину ферулової кислоти і далі проводили хроматографування і проявлення хроматограми як описано вище. Потім із пластинки вирізали плями з феруловою кислотою, поміщали у кювету для твердих зразків, інтенсивність люмінесценції вимірювали при $\lambda_{випр.} = 485$ нм. За отриманими даними будували градуїрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію ФК, а на осі ординат значення інтенсивності люмінесценції. Межа виявлення ферулової кислоти становить 0,03 мкг/мл.

- За аналогією проводили визначення ферулової кислоти у винах інших виробників. Результати визначення ферулової кислоти у винах різних виробників та перевірка правильності визначення отриманих результатів методом добавок наведені у таблиці. Точність та достовірність визначення ФК перевірена методом статистичної обробки результатів аналізу.
- 5 При $n=5$, $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення S_r складає 4,5-7,8 %.

Таблиця

Результати визначення ферулової кислоти в винах.

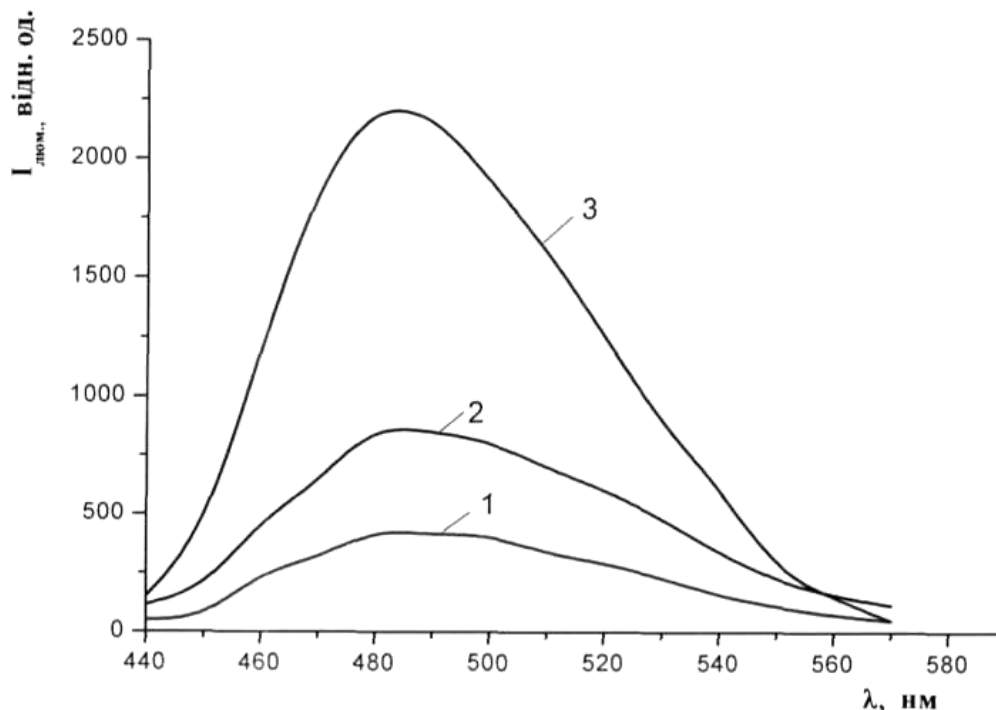
Об'єкт аналізу	Введено мг/л	Знайдено в пробі з добавкою мг/л	Знайдено в пробі мг/л	S_r , %
Вино "Кінзмараулі", Грузія	0,5	$3,925 \pm 0,056$	3,425	5,2
	1,0	$4,432 \pm 0,085$	3,432	4,5
Вино "Ашан" "Лопез Моренас" Іспанія	0,5	$1,114 \pm 0,034$	0,614	6,3
	1,0	$1,616 \pm 0,057$	0,616	5,5
Сухе червоне вино "Мерло" ТМ "Французский бульвар", Україна	0,5	$0,898 \pm 0,023$	0,398	6,9
	1,0	$1,400 \pm 0,056$	0,400	7,8
Десертне вино "Кагор" ТМ "Вина Комрата", Молдова	0,5	$2,755 \pm 0,061$	2,255	5,6
	1,0	$3,258 \pm 0,082$	2,258	4,8

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

10

Спосіб кількісного визначення ферулової кислоти у винах, що включає відбір проби, відокремлення ферулової кислоти, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що ферулову кислоту відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, піддають взаємодії на пластинці з розчином хлориду ітрію (III) та неіоногенною поверхнево-активною речовиною Неонол 9-12 при рН 6,5-6,7 і вимірюють інтенсивність люмінесценції ферулової кислоти при $\lambda_{\text{випр.}}=485$ нм.

15



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Міністерство розвитку економіки, торгівлі та сільського господарства України,
вул. М. Грушевського, 12/2, м. Київ, 01008, Україна

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