



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **103091** (13) **C2**
(51) МПК

B01D 15/30 (2006.01)

B01D 15/32 (2006.01)

G01N 33/18 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2011 14503**

(22) Дата подання заявки: **07.12.2011**

(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **10.09.2013**

(41) Публікація відомостей про заяву: **25.12.2012, Бюл.№ 24**

(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **10.09.2013, Бюл.№ 17**

(72) Винахідник(и):

**Усенко Олег Михайлович (UA),
Коновець Ігор Миколайович (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
проспект Героїв Сталінграда, буд. 12, м.
Київ, 04210 (UA)**

(74) Представник:

**Сазонов Володимир Вікторович, реєстр.
№183**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:

Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В. Фенольные соединения *Thymus talijevii* Klok. et Schost / Химия растительного сырья. - 2008. - № 4. - С. 65-68

Лукша Е.А., Калинкина Г.И., Коломиец Н.Э. Исследование фенольных соединений урологического сбора методом ВЭЖХ-МС. Химия растительного сырья. - 2009. - №4. - С.139-142.

Гаврилин М.В., Попова О.И., Губанова Е.А. Фенольные соединения надземной части шалфея мускатного (*Salvia Scl*- 2010. - №4. - С.99-104.

Солдатенков С.В., Мазурова Т.А. Анализ органических кислот растений методом ионообменных смол и хроматографии на бумаге // Методика количественной бумажной хроматографии сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. - М-Л.: Изд-во АН СССР. - 1962. - С. 27-42.

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ ФЕНОЛКАРБОНОВИХ КИСЛОТ У БІОМАСІ ВИЩИХ ВОДЯНИХ РОСЛИН ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОФОТОМЕТРА

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі хімічної взаємодії водяних рослин (алелопатії) і призначений для визначення якісного складу фенолкарбонічних кислот у біомасі вищих водяних рослин, екзометаболіти яких є регулятором структури альгоугруповань і боротьби з "цвітінням" води. Заявлено спосіб визначення якісного складу фенолкарбонічних кислот у біомасі вищих водяних рослин, в якому рослини подрібнюють і висушують при 120-130 °С, екстрагують 70 % метанолом, випарюють екстракт при 40-60 °С і пропускають через іонообмінні смоли КУ-2 і ЕДЕ-10п, відбирають фенолкарбонічні кислоти 0,2 н H₂SO₄ з додаванням 0,1 н Ва(ОН)₂ з

UA 103091 C2

подальшим випарюванням розчину при 70-80 °С і пропусканням через іонообмінну смолу КУ-2-8 та ідентифікують оксибензойні та оксикоричні (цис- і транс-ізомери) фенолкарбонових кислот за допомогою хромато-мас-спектрофотометра, використовуючи елюент: вода (фаза А)-ацетонітрил (фаза В)-0,1 % мурашина кислота в градієнті (хвилини: % В) 0-25 20-100), при швидкості подачі елюенту 0,5 мл/хв., а детектування здійснюють при різних довжинах хвиль: 215, 240, 254, 270 та 320 нм, при напрузі на дифрагментаторі для позитивних іонів 70 В та режиму моніторингу іонів: 123, 139, 149, 155, 165, 169, 171, 181, 182, 195, 199, 209 та 225 а.о.м.

Винахід належить до галузі хімічної взаємодії водяних рослин (алелопатії) і призначений для визначення якісного складу фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин, екзометаболіти яких є регулятором структури альгоугруповань і боротьби з „цвітінням” води.

Відомо, що кількість фенольних сполук у вищих водяних рослин на порядок більший, ніж у водоростей. Ці особливості в першу чергу впливають на структуру альгоугруповань у природних водоймах. Але мало відомим залишається факт компонентного вмісту фенольних сполук у вищих водяних рослин.

Одним із методів визначення фенолкарбонових кислот є використання іонообмінних смол з подальшим визначенням на хроматографічній бумазі (Солдатенков С.В., Мазурова Т.А. Анализ органических кислот растений методом ионообменных смол и хроматографии на бумаге // Методика количественной бумажной хроматографии Сахаров, органических кислот и аминокислот у растений. - М; Л.: Изд-во АН СССР, 1962. - С. 27-42.)

Недоліком цього способу є його громіздкість і також постійна перевірка отриманих результатів на якісних реакціях фенолкарбонових кислот.

Саме тому нами був запропонований спрощений метод використання іонообмінних смол з подальшим визначенням фенолкарбонових кислот за допомогою хромато-мас-спектрофотометра.

Був також запропонований метод визначення фенолкарбонових кислот за допомогою високоефективної хроматографії з використанням елюенту вода-ацетонітрил-фосфорна кислота (80:20:0,5 по об'єму) при швидкості елюювання 0,7 мл/хв. і довжиною хвилі $\lambda = 250$ нм (Алексеева Л.И., Тетерюк Л.В. Фенольные соединения *Thymus talijevii* Klok. et Schost / Химия растительного сырья. - 2008. - № 4. - С. 65-68). Недоліком цього методу є те, що в його основу покладено визначення в першу чергу високомолекулярних фенольних сполук (флавоноїдів). При цьому такі умови розгонки екстракту не дають повного спектра отриманих фенольних сполук і продуктів їх руйнування (цис- і транс-ізомерів). Також цей метод не дозволяє визначити бензойну кислоту, яка в тій чи іншій мірі присутня у вищих водяних рослинах і впливає повною мірою на структуру альгоугруповань.

Задача, на вирішення якої направлений патент, полягає у тому, що кількісні співвідношення окремих компонентів екзогенних фенолкарбонових кислот з більшою чи меншою біологічною активністю, є причиною впливу цих речовин на функціональну активність водоростей, що проявляється при різних концентраціях якісного складу цих речовин. При цьому важливе значення у визначенні їх активності є біологічні особливості домінуючих видів вищих водяних рослин, що екскретують ці речовини у зовнішнє середовище і певною мірою можуть впливати на структуру альгоугруповань, а особливо на види що визивають „цвітіння” води. Спрощення методу із зменшення часових затрат, з подальшим тривалим зберіганням і можливістю транспортування в місця знаходження хромато-мас-спектрофотометра.

Суть винаходу полягає у тому, що для визначення якісного складу фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин за допомогою хромато-мас-спектрофотометра використовують запропонований спосіб, який полягає в екстремому висушуванні біомаси, екстракції рослин 70 % метанолом з використанням іонообмінних смол, випарюванням і утворенням стабільної форми екстракту, що дозволяє з найменшими втратами ідентифікувати якісні показники оксibenзойних і оксикоричних (цис- і транс-ізомерів) кислот.

Домінуючими видами на більшій частині мілководних ділянок водосховищ, в ставках, по берегах і у затоках річок є рослини, що містять в своїй біомасі значну кількість фенольних сполук.

Заявлений спосіб полягає в наступному: відбирають рослини у водоймах. Потім відмивають їх від водоростей та інших речовин зосереджених на рослині. Далі подрібнюють і висушують у сушильній шафі при температурі 120-130 °С, так як при повітряному висушуванні йде втрата фенолкарбонових кислот за рахунок участі їх в окисно-відновних реакціях. Після висушування подрібнюють і пропускають через сито з порами № 2. Зважуємо на аналітичних вагах 3-4 г сухої маси рослини. Екстрагуємо її 70 % метанолом. В екстракт добавляємо 30 см³ дистильованої води і варимо на плитці при температурі 40-60 °С протягом 1 години. Отриману суміш переносимо у циліндр і доводимо до 150 см і пропускаємо через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат пропускаємо через колонку з катіонітом КУ-2. Отриману суміш пропускаємо через аніоніт ЕДЕ-10п. Фільтрат не використовуємо, так як кислоти зв'язуються у колонці з аніонітом. Фенолкарбоніві кислоти відбираються 0,2н H₂SO₄ порціями по 100 см³. Перші 3 порції не беруться, так як використовуються на нейтралізацію NaOH, яким заряджаються колонки з аніонітом. В кожен подальшу порцію додається 0,1н Ba(OH)₂ до появи білого молочного осаду (нейтралізація H₂SO₄). Отриманий розчин випарюють на електричній плитці при температурі 70-80 °С, до об'єму 50 см³. Фільтруємо через фільтрувальний папір і

отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2-8. Для хроматографії відбираємо у віалу 1 см³ отриманої речовини. Ця речовина може зберігатися тривалий час в морозильній камері.

Хроматографічний аналіз фенолкарбонових кислот проводимо методом високоефективної рідинної хромато-мас-спектрометрії на приладі Agilent 1200 SL/DAD/FD/MSD 6130 (колонка Zorbax Eclipse XDB-C18, Narrow-Bore 2,1 × 150 mm). Швидкість потоку: 0,5 мл/хв. Елюент А:

вода, 0,1 % мурашиної кислоти,

Елюент В: вода-ацетонітрил-мурашина кислота (50:50:0,1 по об'єму),

Градiєнт

Хвилини	В, %
0	20
5	20
10	40
15	100
25	100

Ін'єкція: 100 мкл.

DAD: 215, 240, 254, 270, 320 нм, MSD = Позитивна іонізація. Фрагментатор: 70В. Режим моніторингу SIM іони: 123, 139, 149, 155, 165, 169, 171, 181, 182, 195, 199, 209, 225 а.о.м.

При розробці методик якісного визначення фенолкарбонових кислот були використані хроматографічно чисті стандарти речовин: бензойна, п-оксибензойна, саліцилова, галова, протокатехова, ванілінова, сіренева, α-резорцилова, β-резорцилова, коричнева, п-кумарова, кофеїна, ферулова, синапова.

Якісний склад фенолкарбонових кислот визначали по результатах порівняння часу утримання піків, отриманих на хроматограмі досліджуваного розчину, і часу утримання піків розчину стандартних зразків.

Приклад конкретного виконання

Вищу водяну рослину *Nuphar lutea* (L.) Smith (Глечики жовті) у вегетаційний період відібрали із водного середовища. Відмили від водоростей та інших речовин, зосереджених на рослині. Далі подрібноли і висушували у сушильній шафі при температурі 120-130 °С. Після висушування подрібноли і пропустили через сито з порами № 2. 3 г сухої маси рослини екстрагували 70 % метанолом. В екстракт добавляли 30 см³ дистильованої води і варили на плитці при температурі 40-60 °С протягом 1 години. Отриману суміш переносили у циліндр і доводили до 150 см³, потім пропускали через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат пропускали через колонку з катіонітом КУ-2. Отриману суміш пропускаємо через аніоніт ЕДЕ-10п. Фенолкарбонові кислоти відбираються 0,2н H₂SO₄ порціями по 100 см³. В кожен порцію додається 0,1н Ва(ОН)₂ до появи білого молочного осаду. Отриманий розчин випарюємо на електричній плитці при температурі 70-80 °С, до об'єму 50 см³. Фільтруємо через фільтрувальний папір і отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2-8. Для хроматографії відбираємо у віалу 1 см³ отриманої речовини. Визначення якісного складу фенолкарбонових кислот проводимо в умовах, наведених раніше.

У складі фенолкарбонових кислот *Nuphar lutea* було ідентифіковано (табл.).

Таблиця

Ідентифіковані фенолкарбонові кислоти *Nuphar lutea*

	RT	Area	Hight	Area %
155 альфа-резорцилова	3,7927	50308,25	2480,42	0,9%
199 сіренева	3,6113	71084,61	5943,36	1,3%
171 галова	1,1437	75443,13	15942,3	1,3%
165 кумарова	6,1426	155406,9	7768,36	2,7%
155 бета-резорцилова	2,7808	164162,9	7316,06	2,9%
139 саліцилова	11,679	177856,2	5892,04	3,1%
149 коричнева	17,101	219714,9	24595,2	3,9%
195 ферулова	8,4115	226764,1	8784,47	4,0%
139 п-оксибензойна	2,6457	266065,5	24499,9	4,7%
123 бензойна	10,152	621385,8	18954,3	11,0%
169 ванілінова	3,2773	951116,4	64987,2	16,8%
181 кофеїна	3,5369	2675836	223909	47,3%

Підтвердженням отриманих результатів є хроматографічні профілі *Nuphar lutea* зі спектрами отриманих фенолкарбонових кислот (графічні матеріали).

Спосіб дозволяє визначати якісний склад (і їх процентне співвідношення) фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин, так як кількісне співвідношення цих компонентів по-різному впливає на життєдіяльність альгоугруповань, а особливо на види що визивають „цвітіння“ води. Запропонований спосіб призводить до скорочення часу отримання екстракту без використання отруйних розчинників і втрат досліджуваної біомаси з ідентифікацією повного спектра фенолкарбонових кислот (включаючи цис- і транс-ізомери) за допомогою хромато-мас-спектрофотометра. Отримана стабільна форма екстракту. Тривале зберігання дозволяє тривале зберігання проб без втрат, з можливістю накопичувати різну кількість проб для аналізу з подальшою можливістю транспортування в місця знаходження хромато-мас-спектрофотометра.

На графічних матеріалах зображено хроматографічні профілі комплексу фенолкарбонових кислот *Nuphar lutea* зі спектрами: Фіг.1 - *p*-оксибензойної і саліцилової; Фіг.2 - ванілінової; Фіг.3 - галової; Фіг.4 - β і α -резорцилової; Фіг.5 - бензойної; Фіг.6 - сіренової; Фіг.7 - комарової; Фіг.8 - кофейної; Фіг.9 - транс- і цис-ферулової; Фіг.10 - коричної кислот.

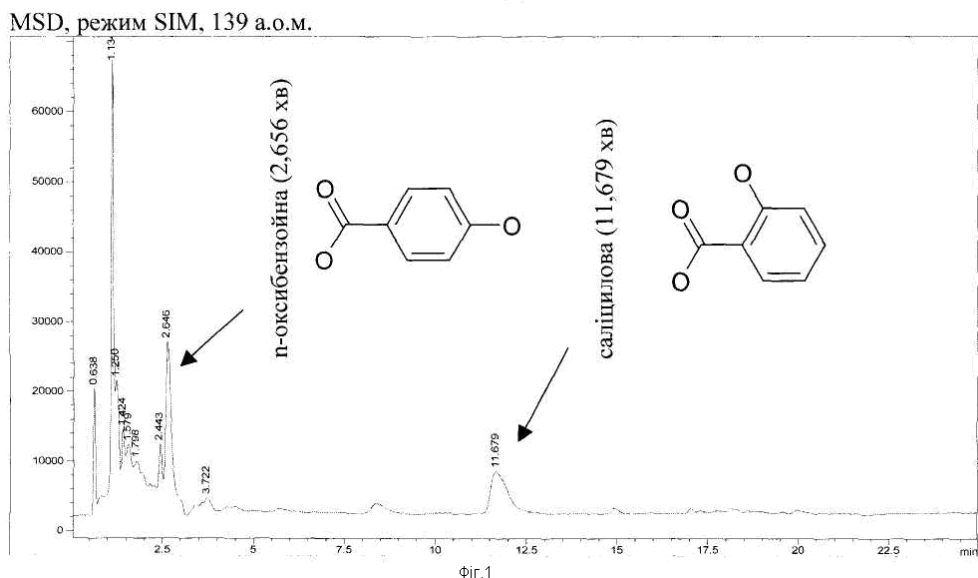
Таким чином нами було вперше встановлено 12 фенолкарбонових кислот (серед яких 8 оксибензойних і 4 оксикоричні) з домінуванням кофейної кислоти (47,3%).

20

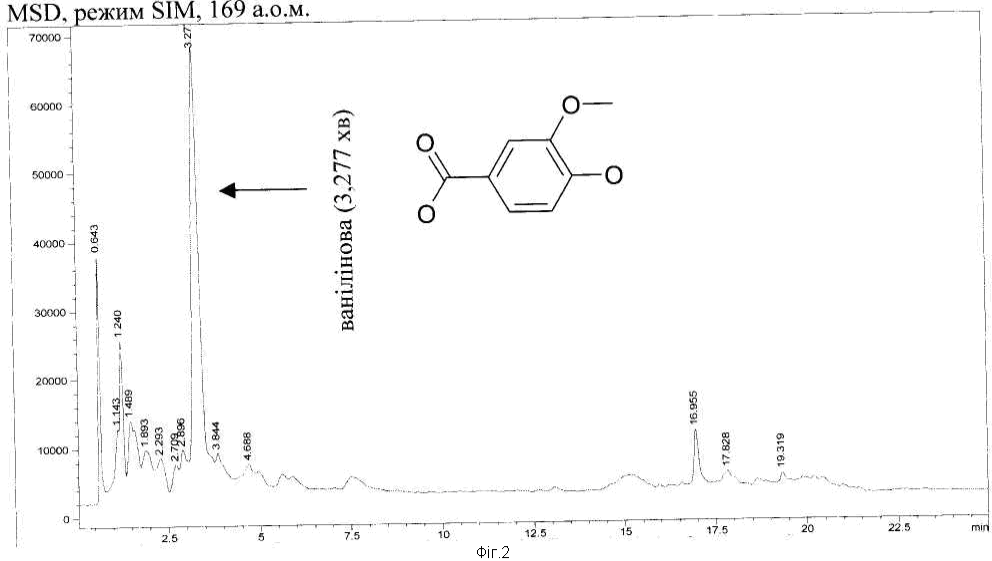
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення якісного складу фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин, який **відрізняється** тим, що рослини подрібнюють і висушують при 120-130 °С, екстрагують 70 % метанолом, випарюють екстракт при 40-60 °С і пропускають через іонообмінні смоли КУ-2 і ЕДЕ-10п, відбирають фенолкарбонові кислоти 0,2 н H_2SO_4 з додаванням 0,1 н $Ba(OH)_2$ з подальшим випарюванням розчину при 70-80 °С і пропусканням через іонообмінну смолу КУ-2-8 та ідентифікують оксибензойні та оксикоричні (цис- і транс-ізомери) фенолкарбонових кислот за допомогою хромато-мас-спектрофотометра, використовуючи елюент: вода (фаза А)-ацетонітрил (фаза В)-0,1 % мурашина кислота в градієнті (хвилини: % В) 0-25:20-100), при швидкості подачі елюента 0,5 мл/хв., а детектування здійснюють при різних довжинах хвиль: 215, 240, 254, 270 та 320 нм, при напрузі на дифрагментаторі для позитивних іонів 70 В та режиму моніторингу іонів: 123, 139, 149, 155, 165, 169, 171, 181, 182, 195, 199, 209 та 225 а.о.м.

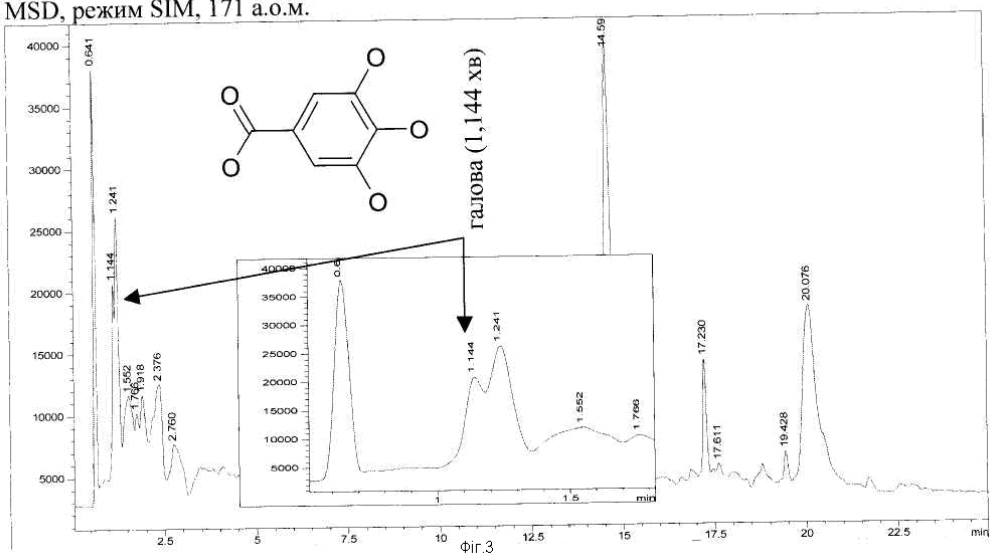
30



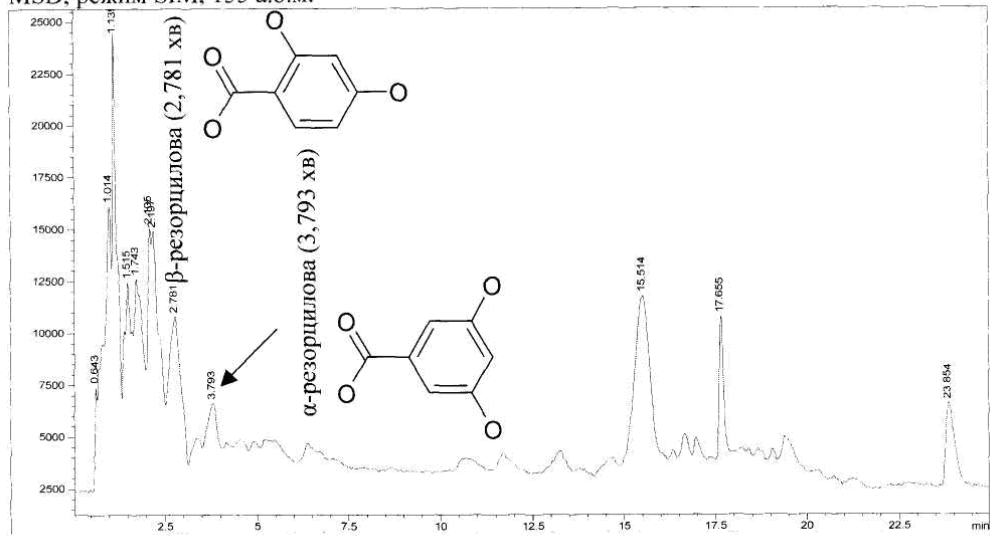
MSD, режим SIM, 169 а.о.м.



MSD, режим SIM, 171 а.о.м.

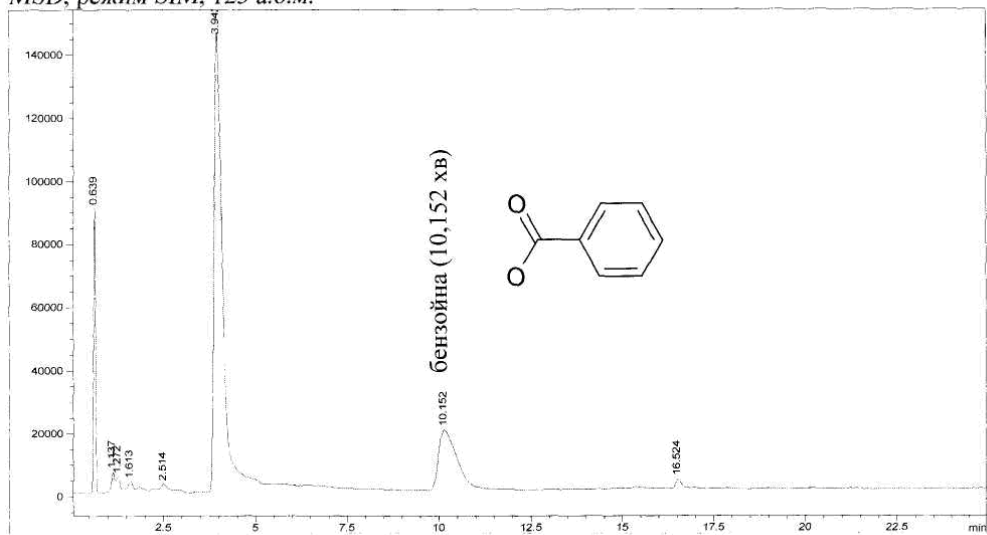


MSD, режим SIM, 155 а.о.м.



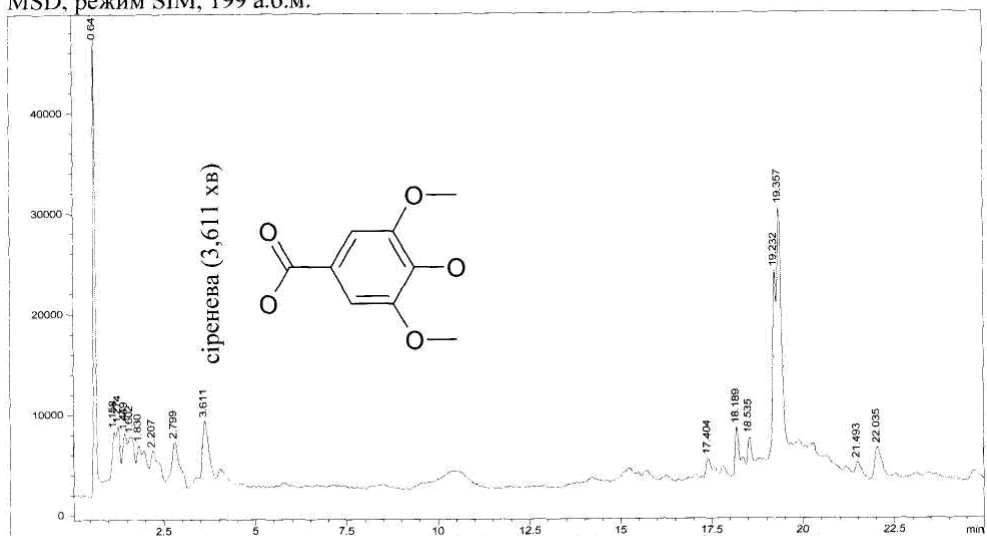
Фиг.4

MSD, режим SIM, 123 а.о.м.



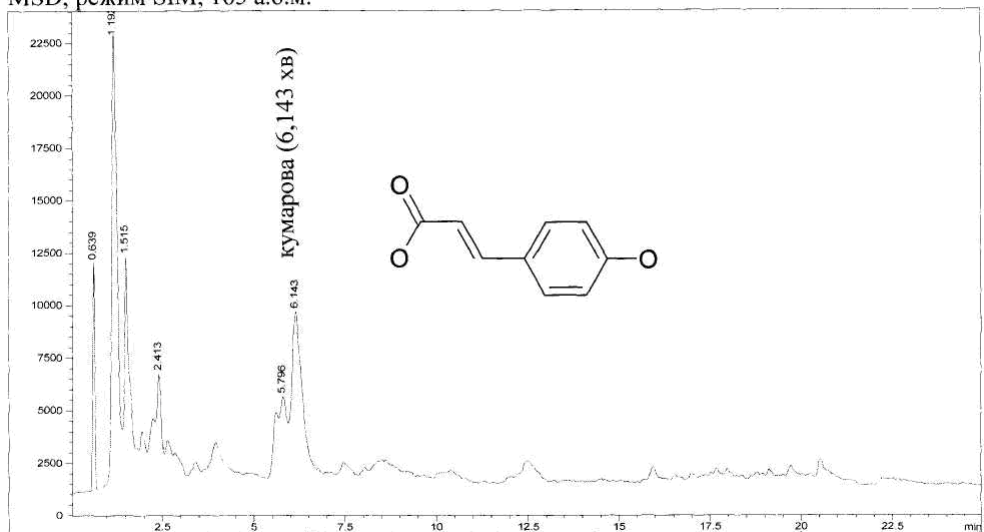
Фиг.5

MSD, режим SIM, 199 а.о.м.



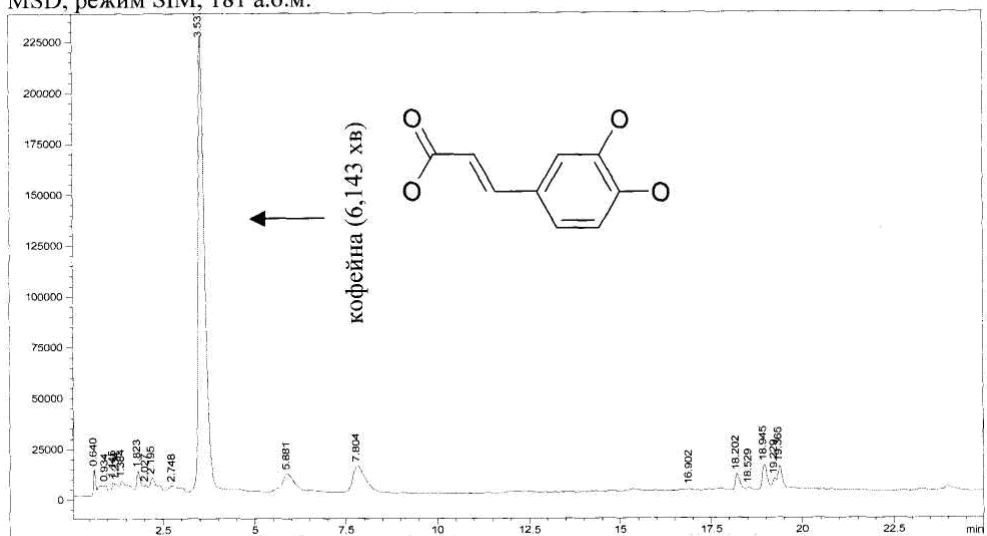
Фиг.6

MSD, режим SIM, 165 а.о.м.



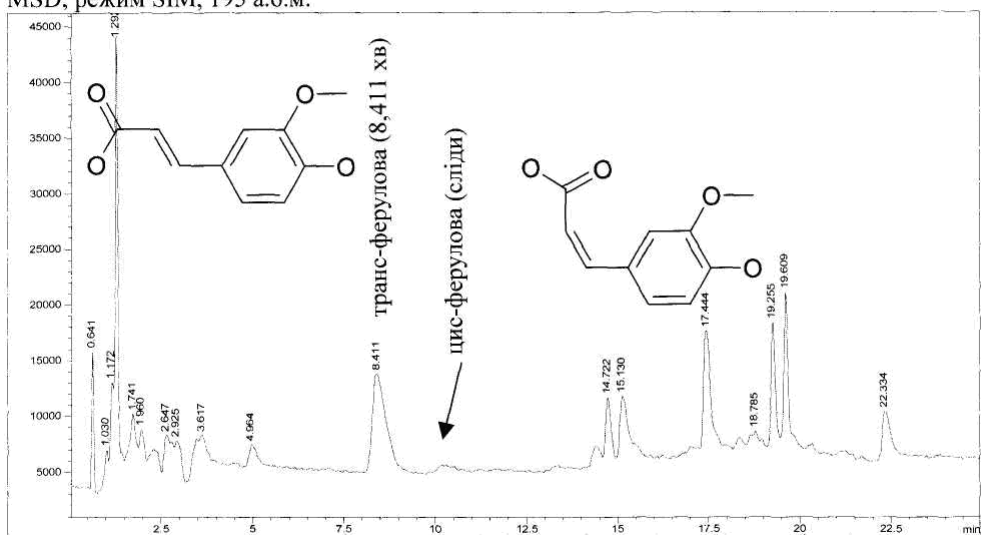
Фиг.7

MSD, режим SIM, 181 а.о.м.



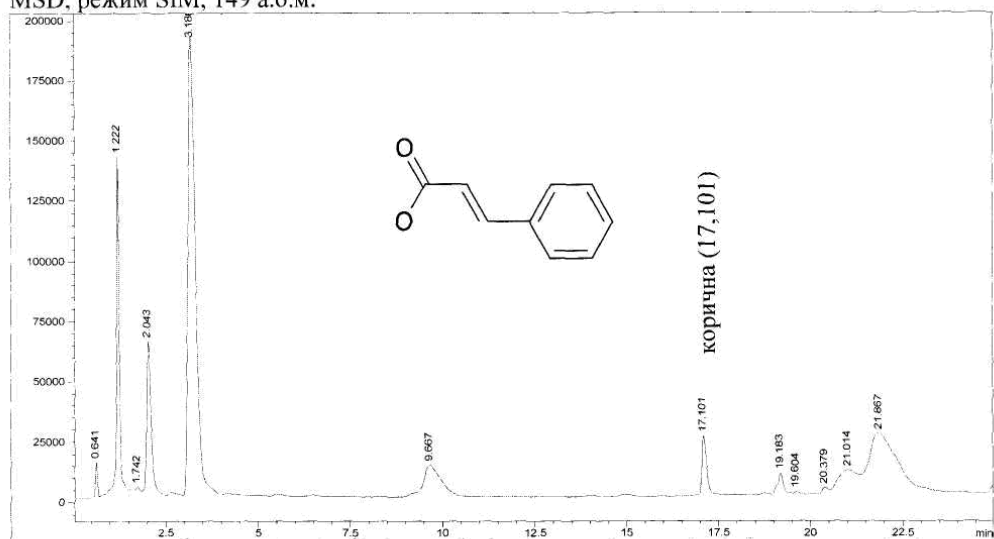
Фіг.8

MSD, режим SIM, 195 а.о.м.



Фіг.9

MSD, режим SIM, 149 а.о.м.



Фіг.10

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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