



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **56161** (13) **U**
(51) МПК (2011.01)
G01N 33/02

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ

1

(21) u201004830

(22) 22.04.2010

(24) 10.01.2011

(46) 10.01.2011, Бюл.№ 1, 2011 р.

(72) ТЕСЛЮК ОЛЬГА ІВАНІВНА, ЛІВЕНЦОВА
ОЛЕНА ОЛЕГІВНА, БЕЛЪТЮКОВА СВІТЛАНА ВА-
ДИМІВНА

(73) ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ІМ. О.В. БО-
ГАТСЬКОГО НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ, ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ
ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

2

(57) Спосіб кількісного визначення бензойної кислоти, що включає відбір проби, відокремлення бензойної кислоти, взаємодію її з хімічними реагентами та вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що бензойну кислоту відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, піддають її взаємодії з хлоридом европію в присутності 1,10-фенантроліну та уротропіну при рН 6,8-7,2 на хроматографічній пластинці для тонкошарової хроматографії.

Корисна модель відноситься до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення консерванту - бензойної кислоти (БК) (див. Жунгети Г.И. Хранение пищевых продуктов и кормов с применением консервантов. К.: Картя Молдовеняскэ, 1982, с.59) у соках та напоях на їх основі.

Відомий спосіб кількісного визначення бензойної кислоти в напоях, заснований на використанні сенсibilізованої люмінесценції лантаніду (див. M.P.Aguilar-Caballeros, A. Gomez-Heus and D.Perez-Bendito. Simultaneous determination of benzoic acid and saccharin in soft drinks by using lanthanide-sensitized luminescence. Analyst, 1999, V.124, p.1079-1084). Визначення проводять наступним чином: після пробопідготовки у розчин, що аналізують, додають певну кількість розчинів триоктилфосфіноксиду, тритону X-100, хлориду тербію (III) та реєструють величину інтенсивності сенсibilізованої люмінесценції ($I_{\text{люм}}$). Проте, визначенню заважає сахарин, який є у напоях, тому визначення проводиться з розділенням за часом. Використання такого прийому вимагає спеціального спектрофлуориметра, який дозволяє проводити такі вимірювання.

Найбільш близьким до заявленої корисної моделі є спосіб кількісного визначення бензойної кислоти у харчовій сировині, продуктах та напоях (див. Руководство по методам анализа качества пищевых продуктов. Под. ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутельяна. - М.: Брандес, Медицина, 1998. - с.330). Метод заснований на екстракційному вилученні бензойної кислоти органічним розчинником з

напоїв та подальшим хроматографічним розділенням в тонкому шарі сорбенту, елюції і вимірюванні оптичної густини елюату, що отримали.

Визначення проводять наступним чином: заздалегідь виділяють бензойну кислоту з проби. Для цього до 10мл напою додають 10мл 0,5моль/л H_2SO_4 , 10г Na_2SO_4 , ретельно перемішують та тричі проводять екстракцію бензойної кислоти етилацетатом. Екстракт висушують за допомогою безводного Na_2SO_4 , упарюють на ротатійному випарнику або у фарфоровій чашці до кінцевого об'єму 1мл.

Для хроматографічного розділення й отримання градувального графіка готують суміш розчинників: петролейний ефір-хлороформ-діетиловий ефір-мурашину кислоту відносно об'ємів: 20,0:8,0:2,8:1,2 і заливають у камеру для тонкошарової хроматографії. Пластинку для тонкошарової хроматографії марки Silufol UV254 розмічають м'яким простим олівцем, вносять бензойну кислоту, а також 10мкл екстракту. Нанесення проб проводять мікрошприцем або калібрувальним капіляром з постійним піддуванням повітря. Пластинку опускають в камеру і хроматографують до 15см від лінії старту. Потім пластинку виймають, підсушують і розглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 254нм. Наявність темних плям в екстракті по R_f відповідних стандарту - бензойної кислоти свідчить про присутність цього консерванту в продукті. Плями в екстракті порівнюють з плямами стандартів візуально і приблизно оцінюють вміст бензойної кислоти у пробі. Темні плями в екстракті і стандарті обводять олівцем в УФ-світлі.

(19) **UA** (11) **56161** (13) **U**

Підтверджують наявність бензойної кислоти наступним чином. Висушену пластинку розрізають між крапками екстракту. Одну частину обприскують розчином хлорного заліза, а потім - пероксиду водню і нагрівають 2хв при 80-100°C в сушильній шафі. Поява буро-фіолетового забарвлення плям на хроматографічній пластинці та значення R_f бензойної кислоти = 0,56 підтверджує наявність бензойної кислоти в пробі.

Кількісне визначення бензойної кислоти проводять наступним чином. Хроматографічне виділення бензойної кислоти проводять як описано вище. Потім обводять олівцем темні плями бензойної кислоти в дослідній пробі і стандартах і відповідні зони в «холостій» пробі. Обведені зони вирізують і поміщають у пробірки, в які заливають по 3мл етилацетату. Пробірки закривають пробками і струшують, потім елюати зливають у кварцеві кювети і вимірюють оптичну густину дослідної проби і стандартів проти «холостої» проби при $\lambda=270\text{nm}$.

Вміст бензойної кислоти у продукті, що аналізують, розраховують за формулою метода внутрішнього стандарту (див. Пилипенко А.Т., Пятицький І.В. Аналітическая химия. 1990, с.341). Межа визначення бензойної кислоти складає $5 \cdot 10^{-3}\%$.

Цей спосіб обраний прототипом.

Спільним у прототипу і заявленої корисної моделі є наявність таких ознак:

- відбір проби;
- відокремлення бензойної кислоти;
- взаємодія проби з хімічним реагентом;
- реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб, запропонований за прототипом є досить тривалим, оскільки вимагає:

- 1) вилучення бензойної кислоти з проби, що аналізують, шляхом екстракції етилацетатом з подальшим упарюванням органічного розчинника;
- 2) елювання бензойної кислоти і стандарту з пластинки і подальше фотометрирування елюатів. Крім того, спосіб вимагає використання органічного розчинника - етилацетату.

Межа виявлення бензойної кислоти, що передбачається цим методом, недостатньо низька. Вона складає 0,05мг/мл.

В основу корисної моделі поставлена задача створити спосіб, в якому за рахунок застосування реакції взаємодії бензойної кислоти й іону Eu (III), використання твердофазної люмінесценції іону європію (III) на хроматографічній пластинці, забезпечити спрощення і скорочення часу проведення аналізу, зниження межі визначення бензойної кислоти, виключення стадії екстракції.

Поставлену задачу вирішено у способі кількісного визначення бензойної кислоти, що включає відбір проби, відокремлення бензойної кислоти, взаємодію її з хімічним реагентами, та вимірювання аналітичного сигналу, який відрізняється тим, що бензойну кислоту відокремлюють методом тонкошарової хроматографії, піддають її взаємодії з хлоридом європію в присутності 1,10 - фенантроліну та уротропіну при рН 6,8-7,2 на хроматографічній пластинці для тонкошарової хроматографії.

Новим у корисної моделі, що заявляється є використання реакції взаємодії бензойної кислоти з іонами Eu (III), яка проходить у фазі сорбенту - на хроматографічній пластинці, з метою відділення кислоти із розчину і підсилення сенсibiliзованої твердофазної люмінесценції іона Eu (III) у присутності донорно-активної речовини - 1,10 - фенантроліну та уротропіну.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю заявлених ознак і досягненням технічного результату складається в наступному.

Спрощення проведення аналізу, виключення стадії екстракції, зниження часу проведення аналізу та зниження межі виявлення стало можливим завдяки наступним прийомам.

1. Застосуванню реакції взаємодії бензойної кислоти з іонами європію (III).

Застосування такого прийому дозволяє підвищити селективність визначення бензойної кислоти, через те, що ця реакція є для даного реагенту вибіркою в групі інших консервантів, наприклад, сорбінової кислоти, яка не виявляє реакції з іонами Eu (III).

2. Застосуванню сорбції комплексу бензойної кислоти з іонами Eu(III) на хроматографічній пластинці.

Застосування такого прийому дозволяє поєднувати стадію попереднього відокремлення бензойної кислоти з отриманням сорбату комплексу, який проявляє люмінесцентні властивості в твердій фазі сорбенту, що дозволяє проводити визначення бензойної кислоти і вилучає стадію її вимивання з хроматографічної пластинки та скорочує час проведення аналізу, а також виключає використання органічного розчинника.

3. Застосуванню визначення бензойної кислоти у фазі сорбенту за сенсibiliзованою люмінесценцією іону Eu (III), посиленої донорно-активною речовиною - 1,10 - фенантроліном.

Застосування такого прийому веде до дегідратації комплексу у твердій фазі і, відповідно, зменшення безвипромінювальних втрат енергії збудження, що сприяє збільшенню інтенсивності люмінесценції сорбату і зниженню межі визначення бензойної кислоти. Низька межа визначення бензойної кислоти дозволяє виключити стадію попереднього вилучення бензойної кислоти з напів за допомогою етилацетату.

Режими проведення аналізу вибрані експериментально. Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається при використанні проявляючого розчину з концентрацією Eu (III) - $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. При більших концентраціях спостерігається зростання $I_{\text{люм}}$ «холостої» проби.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбату від кількості 1,10 - фенантроліну виявило, що оптимальним є використання 0,05%-вого розчину.

Комплексна сполука Eu (III) з бензойною кислотою та 1,10 - фенантроліном утворюється в інтервалі значень рН від 3,5 до 9,5 з максимумом люмінесценції при рН 6,8-7,2, для створення якого використовували 4%-вий розчин уротропіну.

В якості рухомої фази оптимальним виявилася суміш розчинни-

ків:толуол:ацетонітрил:метанол:мурашина кислота у співвідношенні 15:5:1:1.

Вивчення впливу об'єму проби, що наноситься на пластинку, показало, що найкращий результат досягається при нанесенні проби об'ємом 20мкл.

При менших або більших кількостях проби плями на пластинці набувають витягнутої форми.

Визначення бензойної кислоти проводили в соках і напоях на їх основі.

Приклад

Пробу, що аналізують (напій безалкогольний «Живчик») розбавляють дистильованою водою в співвідношенні 1:10. Потім наносять мікрошприцем 20мкл проби на лінію старту хроматографічної пластинки. Паралельно на пластинку наносять стандартний розчин бензойної кислоти, що містить $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л бензойної кислоти, залежно від вмісту бензойної кислоти в пробі, що передбачається. Пластинку підсушують і поміщають в хроматографічну камеру в рухому фазу (суміш толуол:ацетонітрил:метанол:мурашина кислота (15:5:1:1)). Коли фронт розчинника досягає висоти 70мм, пластинку витягають з камери і відмічають положення фронту розчинника. Отриману хроматограму висушують і рівномірно послідовно оброблюють проявником - розчином хлориду європію ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), а потім розчином 1,10-фенантроліну 0,05%-вим і уротропіном 4%-вим. Після нанесення проявляючого розчину пластинку

висушують і ідентифікують БК згідно положенню плям за появою червоної люмінесценції Eu (III) на хроматографічній пластинці у світлі ультрафіолетової лампи зі світлофільтром УФС-2 ($\lambda_{\text{збудж}}=365\text{nm}$).

Кількісне визначення бензойної кислоти проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого поступали таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину бензойної кислоти і далі проводили хроматографування і прояву хроматограми, як описано вище. Потім з пластинки вирізали плями з БК, вміщували в кювету для твердих зразків і вимірювали $I_{\text{люм}}$ при $\lambda=612\text{nm}$. За отриманими даними будували калібрувальний графік, відкладаючи на осі абсцис концентрацію бензойної кислоти, а на осі ординат - значення інтенсивності люмінесценції.

В безалкогольному напої «Живчик» знайдено 0,8мг/мл бензойної кислоти.

Межа виявлення для бензойної кислоти складає 0,012мкг/мл.

Результати визначення бензойної кислоти в різних напоях і перевірка правильності отриманих результатів методом добавок наведені у таблиці. Точність і достовірність визначення перевірена шляхом статистичної обробки результатів визначення. При $n=5$, $P=0,95$ величина відносного стандартного відхилення складає 0,03-0,08.

Результати визначення бензойної кислоти у напоях методом ТШХ ($n=5$; $P=0,95$)

Об'єкт аналізу	Введено мг/мл	Знайдено в пробі з добавкою мг/мл	Знайдено в пробі мг/мл	S_r , %
Сік яблучний виробник ТМ «Jaffa»	0,1	$0,159 \pm 0,016$	0,059	5,8
-	0,2	$0,260 \pm 0,030$	0,060	4,6
Персиковий нектар виробник ТМ «Rich»	0,1	$0,065 \pm 0,011$	0,065	6,0
-	0,2	$0,260 \pm 0,023$	0,060	4,5
Безалкогольний напій «Живчик» виробник ЗАТ «Оболонь»	0,1	$0,907 \pm 0,084$	0,807	6,1
-	0,2	$1,005 \pm 0,102$	0,805	4,8
Напій «Ice tea» виробник ТМ «Семерка»	0,1	$0,398 \pm 0,036$	0,298	7,7
-	0,2	$0,501 \pm 0,059$	0,301	6,2
Вода фруктова «Ананас» виробник ТМ «Біола»	0,1	$0,701 \pm 0,072$	0,601	8,0
-	0,2	$0,812 \pm 0,056$	0,612	6,8