



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) UA (11) 96078 (13) C2  
(51) МПК  
G01N 33/02 (2006.01)

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

### (54) СПОСІБ КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ БЕНЗОЙНОЇ КИСЛОТИ

1

(21) а201005941

(22) 17.05.2010

(24) 26.09.2011

(46) 26.09.2011, Бюл.№ 18, 2011 р.

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

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

(56) 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.

Методические указания к выполнению лаборатор-  
ного практикума по курсу "Пищевая химия" для  
студентов пищевых специальностей. Министерст-  
во образования РФ, ВОСТОЧНО-СИБИРСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИ-  
ВЕРСИТЕТ. Составители: Т.Ф.Чиркина  
Э.Б.Битуева. Улан-Удэ, 2000 г. [он-лайн], [знайде-  
но 2011-06-23]. Знайдено в Интернет: <URL:  
[http://window.edu.ru/window/library/pdf2txt?p\\_id=307  
&p\\_page=3](http://window.edu.ru/window/library/pdf2txt?p_id=307&p_page=3)

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СОРБИНОВОЙ И БЕНЗОЙНОЙ  
КИСЛОТ В ПРОДУКТАХ ПЕРЕРАБОТКИ ПЛОДОВ  
И ОВОЩЕЙ. ГОСТ Р 52052-2003. Практические

2

рекомендации ПУ 23-2009. [он-лайн], [знайдено  
2011-06-23]. Знайдено в Интернет: <URL:  
<http://www.lumex.ru/metodics/09AR02.12.02-1.pdf>

Е.В. Дулина, В.В. Литинская ОПРЕДЕЛЕНИЕ  
КОНСЕРВАНТОВ В ПИЩЕВЫХ ПРОДУКТАХ И  
ПРОДОВОЛЬСТВЕННОМ СЫРЬЕ МЕТОДОМ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРО-  
МАТОГРАФИИ. Вісник Харківського національного  
університету. 2005. №669. Хімія. Вип.13(36),  
С.134-138.

RU 2084871 C1, 20.07.1997.

RU 2350938 C1, 03.27.2009.

CS 273699 B1, 24.03.1992.

JP 63167800 A, 11.07.1988.

Теслюк О.І. Комплекси Eu(III) та Tb(III) з похідними  
хінолонкарбонової кислоти та застосування їх в  
аналізі. Автореферат дисертації на здобуття нау-  
кового ступеня кандидата хімічних наук. Одеса –  
2001.

(57) Спосіб кількісного визначення бензойної кис-  
лоти, що включає відбір проби, відокремлення  
бензойної кислоти, взаємодію її з хімічними реаге-  
нтами та вимірювання аналітичного сигналу, який  
відрізняється тим, що бензойну кислоту відокре-  
млюють методом тонкошарової хроматографії,  
піддають її взаємодії з хлоридом европію в прису-  
тності 1,10-фенантроліну та уротропіну при рН 6,8-  
7,2 на хроматографічній пластинці для тонкоша-  
рової хроматографії.

Винахід належить до аналітичної хімії, зокрема  
до способу визначення консерванту - бензойної  
кислоти (БК) (див. Жунгіету Г.І. Хранение пище-  
вых продуктов и кормов с применением консерва-  
нтов. К.: Картя Молдовеняскэ, 1982, с. 59) у соках  
та напоях на їх основі.

Відомий спосіб кількісного визначення бензой-  
ної 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 чи-  
ном: після пробіпідготовки у розчин, що аналізу-  
ють, додають певну кількість розчинів триоктилфо-

сфіноксиду, тритону X-100, хлориду тербію (III) та  
реєструють величину інтенсивності сенсibilізова-  
ної люмінесценції ( $I_{\text{люм}}$ ). Проте, визначенню зава-  
жає сахарин, який є у напоях, тому визначення  
проводиться з розділенням за часом. Використан-  
ня такого прийому вимагає спеціального спектро-  
флуориметра, який дозволяє проводити такі вимі-  
рювання.

Найбільш близьким до заявленого винаходу є  
спосіб кількісного визначення бензойної кислоти у  
харчовій сировині, продуктах та напоях (див. Руко-  
водство по методам анализа качества пищевых  
продуктов. Под. ред. И.М. Скурихина, В.А. Тутель-  
яна. - М.:Брандес, Медицина, 1998.- с.330.). Метод  
заснований на екстракційному вилученні бензой-  
ної кислоти органічним розчинником з напоїв та

(13) C2

(11) 96078

(19) UA

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

Визначення проводять наступним чином: заздалегідь виділяють бензойну кислоту з проби. Для цього до 10 мл напою додають 10 мл 0,5 моль/л  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 10 г  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , ретельно перемішують та тричі проводять екстракцію бензойної кислоти етилацетатом. Екстракт висушують за допомогою безводного  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , упарюють на ротайційному випарнику або у фарфоровій чашці до кінцевого об'єму 1 мл.

Для хроматографічного розділення й отримання градуального графіка готують суміш розчинників: петролейний ефір-хлороформ-діетиловий ефір - мурашину кислоту у співвідношенні 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 10 мкл екстракту. Нанесення проб проводять мікрошприцем або калібрувальним капіляром з постійним піддуванням повітря. Пластинку опускають в камеру і хроматографують до 15 см від лінії старту. Потім пластинку виймають, підсушують і розглядають в УФ-світлі з довжиною хвилі 254 нм. 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.

Підтверджують наявність бензойної кислоти наступним чином. Висушену пластинку розрізають між крапками екстракту. Одну частину обприскують розчином хлорного заліза, а потім - перексиду водню і нагрівають 2 хв 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 вирізають і поміщають у пробірки, в які заливають по 3 мл етилацетату. Пробірки закривають пробками і струшують, потім елюати зливають у кварцеві кювети і вимірюють оптичну густину дослідної проби і стандартів проти «холостої» проби при  $\lambda = 270$  нм.

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

Цей спосіб вибраний за прототип.

Спільним для прототипу і заявленого винаходу 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 фотометричне дослідження елюатів. Крім того, спосіб вимагає використання органічного розчинника - етилацетату.

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

В основу винаходу поставлена задача створити спосіб, в якому за рахунок застосування реакції взаємодії бензойної кислоти й іону  $\text{Eu (III)}$ , використання твердофазної люмінесценції іону європію (III) на хроматографічній пластинці, забезпечують 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 реагентом, 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 pH 6,8-7,2 на хроматографічній пластинці для тонкошарової хроматографії.

Новим у винаході, що заявляється є використання реакції взаємодії бензойної кислоти з іонами  $\text{Eu (III)}$ , яка проходить у фазі сорбенту - на хроматографічній пластинці, з метою відділення кислоти із розчину і підсилення сенсibilізованої твердофазної люмінесценції іона  $\text{Eu (III)}$  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  $\text{Eu (III)}$ .

2. Застосуванню сорбції комплексу бензойної кислоти з іонами  $\text{Eu (III)}$  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), посиленою 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 напоїв 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 розчинників: толуол:ацетонітрil: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 20 мкл.

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 20 мкл 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 вивчається. Пластинку підсушують і поміщають в хроматографічну камеру в рухому фазу (суміш толуол :ацетонітрil: метанол:мурашина кислота (15:5:1:1)). Коли фронт розчинника досягає висоти 70 мм, 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 уротропіну 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 ( $\lambda_{\text{збудж}} = 365$  нм).

Кількісне визначення бензойної кислоти проводили за калібрувальним графіком, для побудови якого діяли таким чином. На пластинку наносили різні кількості стандартного розчину бензойної кислоти і далі проводили хроматографію 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  $\lambda_{\text{випр}} = 612$  нм. 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 0,8 мг/мл бензойної кислоти.

Межа виявлення для бензойної кислоти складає 0,012 мкг/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

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±0,016	0,059	5,8
-	0,2	0,260±0,030	0,060	4,6
Персиковий нектар виробник ТМ «Rich»	0,1	0,165±0,011	0,065	6,0
-	0,2	0,260±0,023	0,060	4,5
Безалкогольний напій «Живчик» виробник ЗАТ «Оболонь»	0,1	0,907±0,084	0,807	6,1
-	0,2	1,005±0,102	0,805	4,8
Напій «Ice tea» виробник ТМ «Семерка»	0,1	0,398±0,036	0,298	7,7
-	0,2	0,501±0,059	0,301	6,2
Вода фруктована «Ананас» виробник ТМ «Біола»	0,1	0,701±0,072	0,601	8,0
-	0,2	0,812±0,056	0,612	6,8

