



УКРАЇНА

(19) UA (11) 48978 (13) U  
(51) МПК (2009)  
G01N 21/75МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ХЛОРОГЕНОВОЇ КИСЛОТИ

1

2

(21) u200911103

(22) 02.11.2009

(24) 12.04.2010

(46) 12.04.2010, Бюл.№ 7, 2010 р.

(72) БЕЛЬТЮКОВА СВІТЛАНА ВАДИМІВНА, БИЧ-  
КОВА ГАННА ОЛЕКСІВНА(73) ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАР-  
ЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ(57) Спосіб визначення хлорогенової кислоти, що  
включає відбір проби, розчинення її в органічному

розчиннику, взаємодію хлорогенової кислоти з хімічним реагентом і вимірювання аналітичного сигналу, який **відрізняється** тим, що хлорогенову кислоту піддають взаємодії з іонами ітрію (III), модифікованими на поверхні сорбенту фосфату алюмінію в присутності донорно-активної добавки - триоктилфосфіноксиду й неіонної поверхнево-активної речовини - Тритон X-100 при pH=5,7-6,3.

Корисна модель відноситься до аналітичної хімії, зокрема до способу визначення біологічно активної речовини поліфенольного типу - хлорогенової кислоти 3-О-кофеїл-D-хіної, яка відноситься до групи флавонолів, у каві.

Відомий спектрофотометричний метод визначення флавонолів [див. Правдивцева О.Е., Куркин В.А. Исследования по обоснованию новых подходов к стандартизации сырья и препаратов зверобоя продырявленного. // Химия растительного сырья. - 2008. - №1. - С.81-86], заснований на реакції комплексоутворення флавоноїдів з хлоридом алюмінію і подальшому виміру оптичної густини комплексної сполуки при  $\lambda=412\text{nm}$ . Вміст суми флавоноїдів визначають в перерахунку на рутин. Однак цей метод має суттєвий недолік. Він дозволяє визначити тільки суміш флавонолів.

Найбільш близьким є спосіб визначення флавонолів, у тому числі хлорогенової кислоти в рослинній сировині методом вискоєфективної рідинної хроматографії [див. Бубенчиков Р.А. Фенольные соединения и полисахариды фиалки собачьей. // Вестник ВГУ, 2004. - №1. - С.156-159.]

Визначення хлорогенової кислоти проводили у такий спосіб. Для виділення поліфенольних сполук повітряно-суху сировину фіалки собачої подрібнювали до розміру часток, які проходять крізь сито з діаметром отворів 2мм. 100г сировини екстрагували 70%-м спиртом етиловим при співвідношенні сировина-екстрагент (1:5) шляхом нагрівання на киплячій водяній бані у колбі зі зворотним холодильником. Об'єднані витяги упарювали під вакуумом до водного залишку, охолоджували, відфільт-

ровували (для відокремлення хлорофілу й смол). Фільтрат використовували для поетапної рідинної екстракції органічними розчинниками: хлороформом, етилацетатом. Водний залишок спиртово-водного витягу обробляли 7-8 разів у ділильній воронці рівним об'ємом хлороформу. Об'єднані хлороформні витяги упарювали (хлороформна фракція). Водні залишки після екстракції хлороформом нагрівали на водяній бані для видалення хлороформу, охолоджували й обробляли етилацетатом. Паралельно готували серію 0,05%-них розчинів порівняння у спирті метиловому. Аналіз проводили на вискоєфективному рідинному хроматографі фірми "GILSTON" з наступною комп'ютерною обробкою результатів дослідження за допомогою програми "Мультихром" для "Windows". В якості нерухомої фази використовували металеву колонку PLATINUM EPS C18 100A. Як рухома фаза була використана суміш: ацетонітрил-вода-концентрована фосфорна кислота в співвідношенні 4:6:0,05. Аналіз проводили при кімнатній температурі. Об'єм проби елюата й розчинів порівняння, що вводили в хроматограф становив 1мкл. Швидкість подачі елюенту 0,8мл/хв. Тривалість аналізу 109,22хв. Детектування проводилося за допомогою Уф-детектора при  $\lambda=254\text{nm}$ . Ідентифікацію різних флавонолів проводили шляхом зіставлення часу утримання компонентів суміші й розчинів порівняння. Методом нормування встановлено, що в рослинній сировині (трави фіалки собачої), що аналізується, міститься 3,09% хлорогенової кислоти у сумі виділених сполук.

Це рішення обране прототипом.

(13) U  
(11) 48978  
(19) UA

Прототип і корисна модель, що заявляється мають такі спільні операції:

1. відбір проби;
2. розчинення в органічному розчиннику;
3. взаємодія проби з реагентом;
4. реєстрація аналітичного сигналу.

Однак, спосіб за прототипом вимагає при попередній пробі підготовці нагрівання зі зворотним холодильником, що ускладнює цей етап роботи. Для аналізу використовується дорогий хроматограф фірми "GILSTON" з наступною обробкою результатів дослідження за допомогою програми "Мультихром" для "Windows". При використанні метода нормування для розрахунку вмісту хлорогенової кислоти у зразку, що аналізується, на хроматограмі необхідно отримати піки усіх компонентів, які містяться у зразку. Крім того, у прототипі для приготування розчинів порівняння використовують токсичний розчинник - метанол.

В основу корисної моделі поставлена задача розробити спосіб визначення хлорогенової кислоти, в якому за рахунок використання спектроскопічних властивостей хлорогенової кислоти забезпечити спрощення проведення аналізу та апаратного оформлення.

Поставлена задача вирішена в способі визначення хлорогенової кислоти, що включає відбір проби, розчинення її в органічному розчиннику, взаємодію хлорогенової кислоти з хімічним реагентом і вимір аналітичного сигналу тим, що хлорогенову кислоту піддають взаємодії з іонами ітрію (III), модифікованими на поверхні сорбенту фосфату алюмінію в присутності донорно-активної добавки - триоктилфосфіноксиду й неіонної поверхнево-активної речовини - Тритон X-100 при  $pH=5,7-6,3$ .

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, і досягненням технічного результату полягає в наступному.

Спрощення виконання аналізу стало можливим завдяки наступним прийомам:

1. Виділення хлорогенової кислоти з рослинної сировини в етилацетат при кімнатній температурі, що виключає кип'ятіння розчинів органічних розчинників зі зворотним холодильником.
2. Використання твердофазної люмінесценції хлорогенової кислоти в присутності іонів ітрію (III), які утворюють комплексну сполуку з хлорогеновою кислотою і збільшують її інтенсивність люмінесценції.

Розчин хлорогенової кислоти при опроміненні УФ-світлом ртутної лампи з  $\lambda_{\text{макс.}}=365\text{nm}$  проявляє люмінесцентні властивості ( $\lambda_{\text{изл.}}=508\text{nm}$ ), але інтенсивність її люмінесценції невелика. При комплексотворенні з іонами ітрію (III) інтенсивність люмінесценції (1 люм.) хлорогенової кислоти зростає за рахунок того, що зростає жорсткість молекули й зменшуються внутрішньомолекулярні втрати енергії збудження. Максимум люмінесценції при цьому зрушується в область довгих хвиль й складає 515nm. Інтенсивність люмінесценції комплексу значно посилюється на сорбентах.

Вплив різних чинників на інтенсивність люмінесценції комплексу хлорогенової кислоти з іонами ітрію (III) наведено на графіках, де:

Фіг.1 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу хлорогенової кислоти з іонами ітрію (III) від  $pH$  розчину;

Фіг.2 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу хлорогенової кислоти з іонами ітрію (III) від температури висушування сорбенту;

Фіг.3 - залежність інтенсивності люмінесценції комплексу хлорогенової кислоти з іонами ітрію (III) від часу висушування сорбенту.

Експериментально були обрані сорбенти, на яких 1 люм. хлорогенової кислоти найбільша. Досліджена сорбція комплексу на різних сорбентах: на силікагелі 100/160, 100/400, фосфаті алюмінію, Sephadex G-50, G-75, G-150, а також на пінополіуретані, цеолітах (CaA, NaA). Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається на фосфаті алюмінію, іммобілізованим іонами ітрію (III), який був обраний для подальшого аналізу.

Час сорбції хлорогенової кислоти становить 20-25 хвилин. Інтенсивність люмінесценції хлорогенової кислоти залежить від  $pH$  розчину, з якого проводиться сорбція. Ця величина становить  $pH=5,8-6,2$  (Фіг.1). Для створення цього значення  $pH$  в розчині використовували розчин гексаметилентетраміну 4%-го. 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  $100^{\circ}\text{C}$  протягом 45 хвилин.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції хлорогенової кислоти від кількості ітрію (III) на фосфаті алюмінію показало, що інтенсивність люмінесценції збільшується зі збільшенням концентрації ітрію (III). Нами обрана концентрація ітрію (III) -  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л. Лінійна межа залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації хлорогенової кислоти спостерігається у діапазоні концентрацій хлорогенової кислоти  $(1-70) \cdot 10^{-3}$  мг/мл. Інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу збільшується у 2 рази у присутності донорно-активної добавки - триоктилфосфіноксиду й у 2,5 рази у присутності неіонної поверхнево-активної речовини - Тритон X-100.

Сорбційно-люмінесцентне визначення хлорогенової кислоти проводили у каві: Espresso (Італія), Carte Noir Espresso (Франція), Elite Fort (Польща), Jacobs (Польща), Espresso Originale Paulig (Фінляндія), Melitta Bella Crema (Німеччина), Carte Noir Arabica Exclusive (Франція), сирих зернах кави сорту "Робуста". Визначення проводили за методом добавок.

Приклад . Визначення хлорогенової кислоти у сирих зернах кави сорту "Робуста".

Наважку 2г помелених на млинару зерен кави переносять у колбу, додають 10мл хлороформу для знежирення кави й перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хвилин при кімнатній температурі. Отриманий екстракт відфільтровують на фільтрі "синя стрічка" і викидають. Екстракцію проводять двічі. Висушують осад кави на повітрі протягом однієї години, потім у сушильній шафі протягом 60 хвилин при  $50^{\circ}\text{C}$ . Висушену та знежирену каву поміщають у колбу, обробляють 10мл етилацетатом, перемішують 30 хвилин. Екстракцію

проводять двічі для витягу в екстракт хлорогенової кислоти.

Фосфат алюмінію отримують з медичного препарату "Фосфалюгель", що попередньо відмивають дистильованою водою, відфільтровують й висушують. У три пробірки поміщають 50мг фосфату алюмінію, додають 0,5мл етилацетатного екстракту із зерен кави, у дві з них додають по 0,2мл стандартного розчину хлорогенової кислоти з вмістом  $1 \cdot 10^{-4}$  моль/л, перемішують протягом 20 хвилин, висушують при  $100^{\circ}\text{C}$  протягом 15 хвилин. Далі додають у кожну пробірку по 0,4мл водного розчину хлориду ітрію (III) ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л), 0,1мл розчину триоктилфосфіноксиду ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л), 0,1мл розчину Тритон Х-100 (0,1%-го) й 0,1мл буферного розчину гексаметилентетраміну 4%-го з  $\text{pH}=6,0$  й перемішують протягом 30 хвилин. Осад

відфільтровують та висушують протягом 45 хвилин при  $100^{\circ}\text{C}$ . Далі розтирають до порошкоподібного стану й реєструють інтенсивність люмінесценції комплексу, іммобілізованого на сорбенті при  $\lambda_{\text{изл.}}=515\text{nm}$ , при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ( $\lambda_{\text{возб.}}=365\text{nm}$ ).

Аналогічно готують проби з другою добавкою по змісту у два рази перевищуючої першу.

В екстракті сирих зерен кави сорту "Робуста" знайдено 85мг хлорогенової кислоти на 1г мелених сирих зерен кави. На основі розробленої методики визначено вміст хлорогенової кислоти у зернах кави різних виробників (Табл.1). Результати визначення хлорогенової кислоти перевірені методом "введено-знайдено" і показана правильність розробленої методики (Табл.2).

Таблиця 1

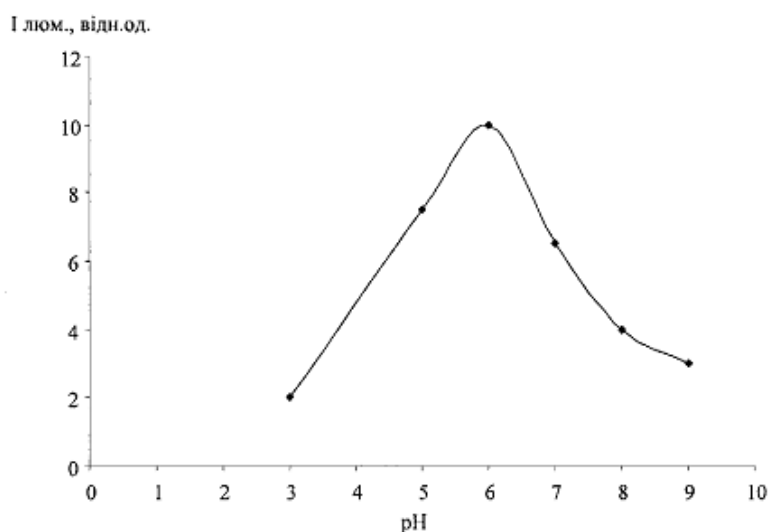
Вміст хлорогенової кислоти в каві

Кава	Вміст хлорогенової кислоти, мг/г зерен кави
Espresso (Італія)	12,4
Carte Noir Espresso (Франція)	13,4
Elite Fort (Польща)	28,0
Jacobs (Польща)	16,8
Espresso Originale Paulig (Фінляндія)	9,5
Melitta Bella Crema (Німеччина)	20,8
Carte Noir Arabica Exclusive (Франція)	16,0
Зерна сирі кави сорту "Робуста"	85,0

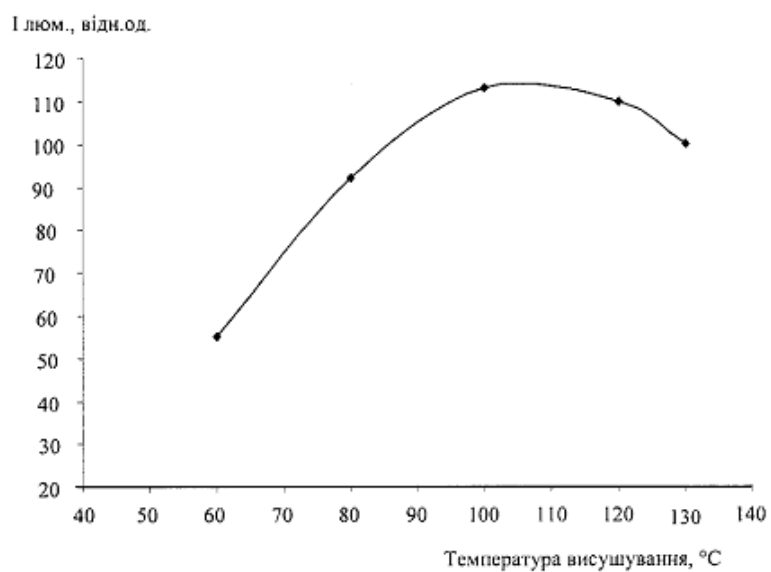
Таблиця 2

Результати визначення хлорогенової кислоти в каві методом "введено-знайдено"

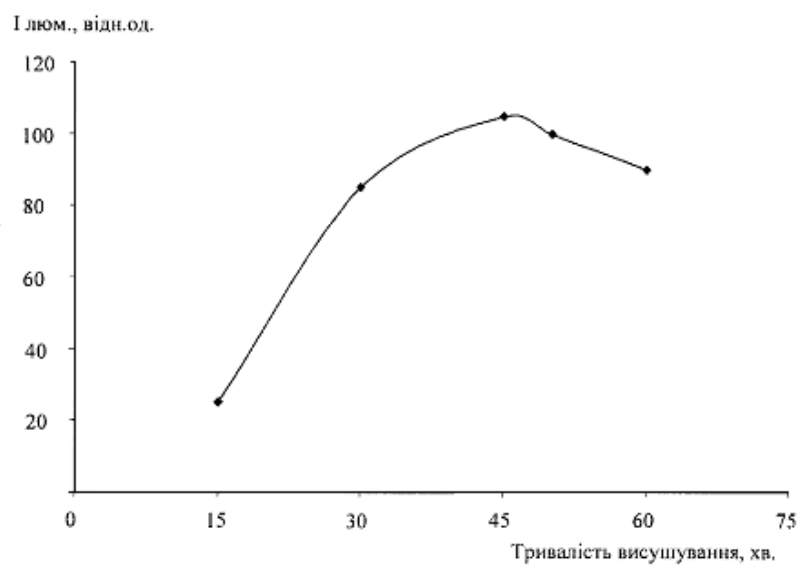
Добавка, мг/мл	Знайдено в пробі з добавкою, мг/мл	Знайдено в пробі, мг/мл	Sr
3,0	11,45	$8,45 \pm 0,3$	0,034
5,0	13,60	$8,60 \pm 0,4$	0,042



Фіг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3