



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **109838** (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

<p>(21) Номер заявки: а 2014 05410</p> <p>(22) Дата подання заявки: 21.05.2014</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 12.10.2015</p> <p>(41) Публікація відомостей про заявку: 25.06.2015, Бюл.№ 12</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 12.10.2015, Бюл.№ 19</p>	<p>(72) Винахідник(и): Усенко Олег Михайлович (UA), Коновець Ігор Миколайович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ГІДРОБІОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, пр. Героїв Сталінграда, 12, м. Київ, 04210 (UA)</p> <p>(74) Представник: Сазонов Володимир Вікторович, реєстр. №183</p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 103091 C2, 10.09.2013 RU 2364864 C1, 20.08.2009 Курейшевич А.В., Потрохов А.С., Зиньковский Р.Г., Калиновская А.В., Незбрицкая И.Н. Антиоксидантная активность некоторых видов Chlorophyta и Суапрокарауота как фактор их устойчивости к фенолкарбоновым кислотам//Гидробиол. ж. - 2012. - 48, № 5. - С. 66-81 Усенко О.М., Кирпенко Н.И., Коновец И.Н., Грахов В.П. Компонентный состав растворенных фенолкарбоновых кислот в зарослях высших водных растений//Современные проблемы водохранилищ и их водосборов. Б.м. - 2013. - С. 186-191</p>
---	---

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ЯКІСНОГО ТА КІЛЬКІСНОГО СКЛАДУ ФЕНОЛКАРБОНОВИХ КИСЛОТ У ВОДІ ЗА ДОПОМОГОЮ ХРОМАТО-МАС-СПЕКТРОФОТОМЕТРА

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі хімічної взаємодії водяних рослин (алелопатії) і призначений для визначення якісного і кількісного складу фенолкарбонових кислот у воді, екзометаболіти вищих водяних рослин яких є регулятором структури альгоугруповань і боротьби з цвітінням води. Заявлено спосіб визначення якісного та кількісного складу фенолкарбонових кислот у воді, в якому пропускають через фільтрувальний папір проби з використанням іонообмінних смол, випарювання і утворення стабільної форми екстракту з подальшою ідентифікацією фенолкарбонових кислот, використовуючи мас-спектрометр та здійснюючи математичні розрахунки.

UA 109838 C2

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

5 Водорості швидко реагують на зміну екологічних умов, їх продукція визначається трофічним рівнем водойм, а структура і величина характеризує його стан. Одним із важливих моментів у формуванні якісного і кількісного складу фітопланктону є відмінність реакції окремих видів водоростей на певні зміни в компонентному складі фенолкарбонових кислот.

10 Одним із методів визначення кількісного і якісного складу фенолкарбонових кислот з використанням методом високоефективної рідинної хроматографії - мас-спектрометрії з використанням елюенту метанол-вода-фосфорна кислота (40:60:0,5 по об'єму) при швидкості елюювання 0,8 мл/хв. і довжиною хвилі $\lambda = 254$ нм (Гаврилин М.В., Попова О.И., Губанова Е.А. Фенольные соединения надземной части шалфея мускатного (*Salvia sclarea* L.), культивируемого в Ставропольском крае // Химия растительного сырья. - 2010. - № 4. - С. 99-104)

15 Недоліком цього способу є його громіздкість, а також постійна перевірка отриманих результатів за допомогою паперової та тонкошарової хроматографії. Метод розроблений для фітомаси рослин, де цих речовин міститься на 1-2 порядки більше, ніж у воді, що суттєво залежить від розгонки на хромато-мас-спектрофотометрі. Крім того, він розроблений більшою мірою під флавоноїди, тому деякі фенолкарбонові кислоти не визначає, а кількісний склад 20 рахується лише по галовій кислоті. При цьому такі умови розгонки екстракту не дають повного спектра отриманих фенольних сполук і продуктів їх руйнування (цис- і транс- ізомерів).

Був також запропонований наш метод визначення фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин (Патент № 103091, Україна. Спосіб визначення якісного складу фенолкарбонових кислот у біомасі вищих водяних рослин за допомогою хромато-мас-спектрофотометра / Усенко О.М., Коновець І.М., заявник та патентовласник Інститут гідробіології НАН України; опубл. 10.09.2013, Бюл. № 17). Недоліком цього методу є те, що в його основу закладено визначення цих речовин, у першу чергу, в біомасі вищих водяних рослин 25 яких міститься на 1-2 порядки більше ніж у воді, що впливає на умови розгонки. Крім того цей метод дозволяє лише визначення якісного складу фенолкарбонових кислот, а як відомо на структуру альгоугруповань впливає на тільки компонентний, а й кількісний склад, що виділяється в навколишнє середовище, тим самим дозволяючи контролювати "цвітіння" води.

Задача, на вирішення якої направлений патент, полягає в розробці способу визначення якісного і кількісного складу повного спектра фенолкарбонових кислот у воді без використання отруйних розчинників, зі зменшенням часових затрат, без втрат цих речовин, з можливістю 35 тривалого зберігання отриманого екстракту, що дозволяє його транспортування в місця знаходження хромато-мас-спектрометра.

Суть винаходу полягає у тому, що для визначення якісного і кількісного складу фенолкарбонових кислот у воді за допомогою хромато-мас-спектрометра використовується запропонований спосіб, який полягає в попередньому пропусканні через фільтрувальний папір проби об'ємом 1-2 дм³, з використанням іонообмінних смол, випарюванням й утворенням стабільної форми екстракту, що дозволяє з найменшими втратами ідентифікувати якісні і кількісні показники оксибензойних і оксикоричних (цис- і транс- ізомерів) кислот, запропонованої формули для спрощення в статистичних розрахунках.

Відбирають проби у водоймах (в заростях вищих водяних рослин, на чистоводі або місцях 45 необхідних для визначення цих показників) об'ємом 1-2 дм³. Потім у випадку знаходження у пробі осаду або мулу пропускаємо через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат об'ємом 1-2 дм³ 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. Фенолкарбонові кислоти відбираються 0,2н H₂SO₄ порціями по 100 см³. Перші три порції не беруться, так як використовуються на нейтралізацію NaOH, яким заряджаються колонки з аніонітом. З метою нейтралізації в елюаті H₂SO₄ в кожен наступну порцію додається 0,1н гідроксиду барію II Ва(OH)₂ до появи білого молочного осаду. Отриманий розчин випарюють на електричній плитці при температурі 70-80 °С, до об'єму 40-60 см³. Фільтруємо через фільтрувальний папір і отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2-8. Для хроматографії 50 відбираємо у віалу 1,5 см³ отриманого фільтрату. Для аналізу використовуємо свіжий фільтрат, проте він може зберігатися тривалий час в морозильній камері.

Хроматографічний аналіз вмісту фенолкарбонових кислот проводимо методом високоефективної рідинної хроматографії - мас-спектрометрії на приладі Agilent 1200 MSD 6130 виробництва Agilent Technologies. Умови розділення такі: об'єм ін'єкції 0,1 см³; колонка Zorbax Eclipse XDB-C18, Narrow-Bore 2,1 × 150 mm, температура колонки 30 °С; швидкість потоку 60

мобільної фази 1,0 см³/хв, яка складається з суміші вода: ацетонітрил з додаванням 0,1 % мурашиної кислоти у градієнті (табл. 1).

Таблиця 1

Градієнт для хроматографічного аналізу вмісту фенолкарбонових кислот

Хвилини	Ацетонітрил з 0,1 % мурашиної кислоти, % об.	Вода з 0,1 % мурашиної кислоти, % об.
0,0	10	90
2,5	10	90
5,0	20	80
7,5	50	50
20,0	50	50

5 Визначення концентрації сполук проводимо на одноквадрупальному мас-детекторі у такому режимі: джерело іонізації електроспрей (ESI); іонізація позитивна; напруга на фрагментаторі 70В, потік газу (азот) 12 дм³/хв., температура газу 350 °С; напруга на голці розпилення 300 В; детекція в режимі моніторингу окремих йонів (SIM) маса/заряд: 123,1 139,1; 149,1; 155,1; 165,1; 169,1; 171,1; 181,1; 182,1; 195,1; 199,1; 209,1; 225,1.

10 При розробці методик якісного і кількісного визначення фенолкарбонових кислот були використані хроматографічно чисті стандарти речовин: бензойна, п-оксибензойна, саліцилова, галова, протокатехова, ванілінова, сиренева, α-резорцилова, β-резорцилова, корична, п-кумарова, кофейна, ферулова, синапова.

15 Якісний і кількісний 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.

Приклад 1. Встановлення параметрів градувального графіку для визначення концентрації фенолкарбонових кислот у воді

20 Стандартні розчини готували наступним чином: біля 10 мг (точна наважка) речовини поміщали у мірну колбу ємністю 100 см³, додавали 50 см³ 25 % метилового спирту, речовину розчиняли і доводили об'єм тим же розчинником до мітки; після цього 1 см³ отриманого розчину поміщали у мірну колбу ємністю 100 см³ і доводили тим же розчинником до мітки. Отримана концентрація маточного розчину відповідає 1 мкг/см³.

25 Для побудови градувального графіку готують серію розчинів з вмістом стандартних речовин 0; 0,01; 0,03; 0,08; 0,20; 0,51; 1,28; 3,2; 8,0 і 20,0 мкг/дм³.

30 Отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2, потім аніоніт ЕДЕ-10п. Фільтрат не використовуємо, так як кислоти зв'язуються у колонці з аніонітом. Фенолкарбонові кислоти відбираються 0,2 н H₂SO₄ порціями по 100 см³. Перші 3 порції не беруться, так як використовуються на нейтралізацію NaOH, яким заряджаються колонки з аніонітом. З метою нейтралізації в елюаті H₂SO₄ в кожну наступну порцію додається 0,1 н гідроксиду барію II Ва(ОН)₂ до появи білого молочного осаду. Отриманий розчин випарюють на електричній плитці при температурі 70-80 °С, до об'єму 40-60 см³ і стабільної форми рН 0,5-1,0. Фільтруємо через фільтрувальний папір і отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2-8. Для хроматографії відбираємо у віалу 1,5 см³ отриманого фільтрату. Хроматографічний аналіз виконуємо відповідно до методу, описаного вище.

35 Будуємо градувальний графік у координатах "концентрація ФКК (у мкг/дм³) - площа піку мас-детектора при конкретній величині m/z (x, кількість імпульсів). Встановлено, що в даному діапазоні концентрацій спостерігається лінійний зв'язок. Рівняння градувального графіку наведено у табл. 2.

40 Приклад 2. Визначення концентрації фенолкарбонових кислот у воді заростей вищої водяної рослини *Ceratophyllum demersum*.

45 А) Воду відбираємо у водоймі (в заростях вищої водяної рослини *Ceratophyllum demersum*) об'ємом 2 дм³. Потім у випадку знаходження у пробі осаду або мулу пропускаємо через фільтрувальний папір. Отриманий фільтрат об'ємом 2 дм³ 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. Фенолкарбонові кислоти відбираються 0,2 н H₂SO₄ порціями по 100 см³. Перші 3 порції не беруться, так як використовуються на нейтралізацію NaOH, яким заряджаються колонки з аніонітом. З метою

нейтралізації в елюаті H_2SO_4 в кожну наступну порцію додається 0,1 н гідроксиду барію $Ba(OH)_2$ до появи білого молочного осаду. Отриманий розчин випарюють на електричній плитці при температурі 70-80 °С, до об'єму 50 см³ і стабільної форми рН 0,5-1,0. Фільтруємо через фільтрувальний папір і отриману суміш пропускаємо через катіоніт КУ-2-8. Для хроматографії відбираємо у віалу 1,5 см³ отриманого фільтрату. Для аналізу використовуємо свіжий фільтрат, проте він може зберігатися тривалий час в морозильній камері.

Б) Паралельно готуємо розчин стандартів об'ємом 2 дм³ з концентрацією речовин 1,28 мкг/дм³ (порівняльний розчин). Обробку цієї проби проводимо аналогічно вищеописаному методу.

В складі фенолкарбонових кислот в заростях вищої водної рослини *Ceratophyllum demersum* було ідентифіковано і встановлено концентрації (табл. 3).

Підтвердженням отриманих результатів є хроматографічні профілі *Ceratophyllum demersum* зі спектрами отриманих фенолкарбонових кислот (фіг.)

Фіг. Хроматографічні профілі комплексу фенолкарбонових кислот *Ceratophyllum demersum*: 1 - галова, 2 - протокатехова, 3 - α -резорцилова; 4-п-оксibenзойна, 5 - ванілінова; 6 - β -резорцилова; 7 - бузкова; 8 - кумарова; 9 - синапова; 10 - транс-ферулова; 11 - цис-ферулова; 12 - бензойна; 13 - саліцилова; 14 - корична.

Концентрацію ФКК у зразках води розраховували за наступною формулою:

$$C = \frac{S \cdot C_{CP}}{S_{CP}}, \text{ де}$$

S - площа піку речовини у розчині, що досліджується;

S_{CP} - площа піку речовини у стандартному розчині;

C_{CP} - концентрація стандартної речовини у порівняльному розчині.

Таким чином нами було вперше встановлено якісний і кількісний склад 14 фенолкарбонових кислот (серед яких 9 оксibenзойних і 5 оксикоричні (одна серед яких з цис- і транс- ізомерами) з домінуванням бензойної кислоти (8,65 мкг/дм³).

Спосіб дозволяє визначати якісний і кількісний склад фенолкарбонових кислот у воді, так як в залежності від гідробіонтів виділяється різна кількість і компонентний склад цих речовин в навколишнє середовище, що впливає на життєдіяльність альгогрупвань, а особливо на види, що визивають "цвітіння" води, тим самим дозволяючи регулювання цих процесів. Запропонований спосіб призводить до скорочення часу отримання екстракту без використання отруйних розчинників і втрат досліджуваної проби води з ідентифікацією повного спектру і концентрації фенолкарбонових кислот (включаючи цис- і транс- ізомери) за допомогою хромато-мас-спектрофотометра. Запропонована формула спрощує процеси підрахунку результатів. Отримана стабільна форма екстракту дозволяє тривале зберігання проб без втрат, з можливістю накопичувати різну кількість проб для аналізу з подальшим транспортуванням в місця знаходження хромато-мас-спектрометра.

Таблиця 2

Параметри градувального графіку для визначення концентрації фенолкарбонових кислот у воді
($y=a+b \cdot c$, нг/дм³)

m/z	Назва ФКК	Час виходу, хв	Коефіцієнти рівняння		R	Межа виявлення, нг/дм ³
			a	b		
123	Бензойна	15,87	0,305	0,0018	0,92	45,4
139	n-Оксибензойна	12,19	0,231	0,0020	0,89	6,4
139	Саліцилова	16,49	0,323	0,0018	0,91	9,6
149	Корична	19,52	0,207	0,0006	0,89	3,0
155	Протокатехова	7,78	0,087	0,0004	0,87	4,8
155	α-Резорцилова	12,02	0,326	0,0008	0,92	18,4
155	β-Резорцилова	13,32	0,533	0,0006	0,90	11,0
165	Кумарова	14,35	0,138	0,0005	0,95	5,4
169	Ванілінова	13,32	0,175	0,0006	0,88	2,9
171	Галова	3,74	0,295	0,0024	0,90	51,2
195	транс-Ферулова	14,62	0,228	0,0011	0,96	6,5
195	цис-Ферулова	14,96	0,081	0,0004	0,86	5,2
199	Бузкова	13,67	0,337	0,0012	0,92	7,6
225	Синапова	14,60	0,099	0,0005	0,93	9,1

Таблиця 3

Концентрація ідентифікованих фенолкарбових кислот у воді заростей вищої водяної рослини
Ceratophyllum demersum, мкг/дм³

m/z	Назва ФКК	Час виходу, хв	Площа піку	Концентрація, мкг/дм ³
123	Бензойна	15,87	19155	8,650
139	n-Оксибензойна	12,19	5356	2,749
139	Саліцилова	16,49	6359	2,951
149	Корична	19,52	9935	1,309
155	Протокатехова	7,78	421	0,034
155	α-Резорцилова	12,02	978	0,224
155	β-Резорцилова	13,32	453	0,153
165	Кумарова	14,35	568	0,079
169	Ванілінова	13,32	14344	2,169
171	Галова	3,74	9148	5,518
195	транс-Ферулова	14,62	498	0,157
195	цис-Ферулова	14,96	499	0,052
199	Бузкова	13,67	4220	1,299
225	Синапова	14,60	571	0,094
Загальна сума			25,438	

5

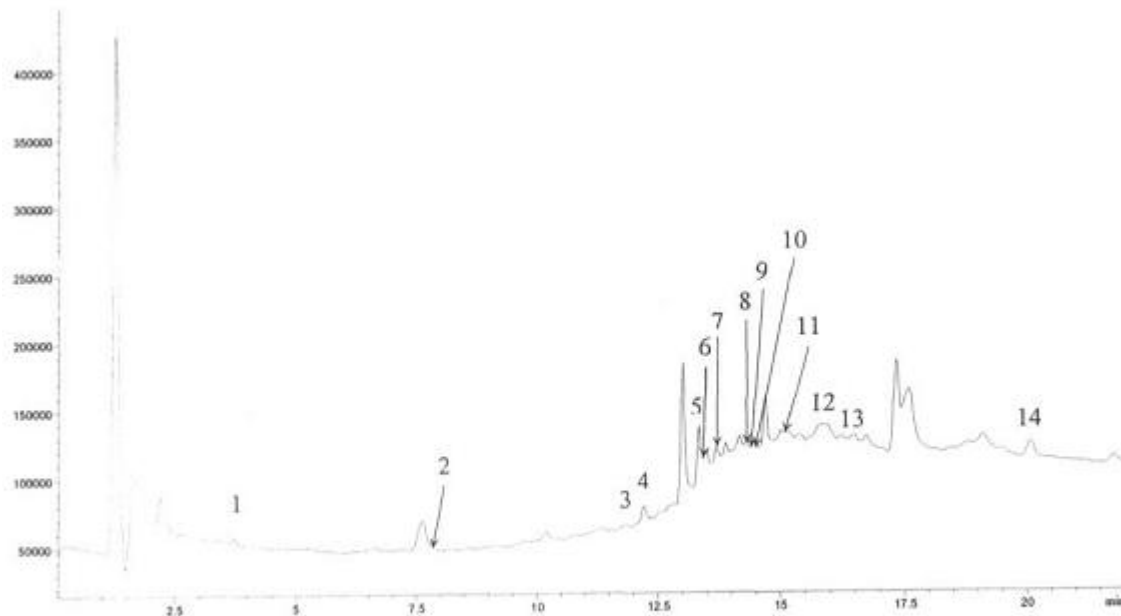
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб визначення якісного та кількісного складу фенолкарбонових кислот у воді, який **відрізняється** тим, що виділяють із води пробу об'ємом 1-2 дм³, попередньо фільтрують її через фільтрувальний папір, пропускають через іонообмінні смоли КУ-2 і ЕДЕ-10п, причому відбирають фенолкарбонові кислоти 0,2 н H₂SO₄ з додаванням 0,1 н Ва(ОН)₂ та подальшим випарюванням одержаного розчину при температурі 70-80 °С, доводячи до об'єму 40-60 см³ в стабільній формі рН 0,5-1,0, фільтрують та пропускають отриманий розчин через катіоніт КУ-2-8 та ідентифікують цис- і транс- ізомери оксибензойних та оксикоричних фенолкарбонових кислот за допомогою хромато-мас-спектрофотометра, використовуючи елюент: вода з 0,1 % мурашиною кислотою - ацетонітрил з 0,1 % мурашиною кислотою, при швидкості подачі елюента 1,0 см³/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., при цьому концентрацію фенолкарбонових кислот розраховують за наступною формулою:

$$C = S \cdot C_{CP} / S_{CP}$$

- 5 де S - площа піку речовини у розчині, що досліджують, S_{CP} - площа піку речовини у стандартному розчині, C_{CP} - концентрація стандартної речовини у порівняльному розчині.



Фіг.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

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