

## RRLC МЕТОД ЗА ОПРЕДЕЛУВАЊЕ НА ХЛОРОГЕНА КИСЕЛИНА ВО ПРОИЗВОДОТ CIRKON

Теодор Јакимоски\*, Биљана Петановска-Илиевска, Мирјана С. Јанкуловска, Ленче Велкоска-Марковска

Факултет за земјоделски науки и храна, Скопје

Насока: Квалитет и безбедност на храна

e-mail: [teodor.jakimoski@yahoo.com](mailto:teodor.jakimoski@yahoo.com)

### Апстракт

Во овој труд истражувањето е насочено кон пронаоѓање на нов аналитички метод за идентификација и квантификација на активната компонента хлорогена киселина во препаратот Cirkon. Cirkon е претставник на новата генерација агрохемиските препарати, којшто претставува природен растителен биостимулатор. Според хемискиот состав претставува смеса од хлорогена, кофеинска и цикорична киселина, екстрахирани од лековитото растение *Echinacea purpurea* L. Moench, од кои доминанта е хлорогена киселина. За воспоставување на реверзно-фазните хроматографски методи се користени три аналитички колони со различни димензии и големина на честички (Purospher STAR RP-18e (30 mm × 4 mm; 3 μm), LiChrospher 60 RP-select B (125 mm × 4 mm; 5 μm) и Poroshell 120 EC-18 (50 mm × 3 mm; 2,7 μm)) и мобилни фази составени од метанол/вода, метанол/(0,5 % мравска киселина во вода), метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) и ацетонитрил/(0,05 % мравска киселина во вода) со различни волуменски односи. Оптималните услови за квалитативно и квантитативно определување на хлорогената киселина се добиени со употреба на аналитичката колона Poroshell 120 EC-18 (50 mm × 3 mm; 2,7 μm), изократско елуирање со мобилна фаза составена од ацетонитрил/1% фосфорна киселина растворена во вода (10/90, V/V), проток на мобилната фаза од 1 mL/min, константна температура на колоната од 25 °C и UV детекција на 220 nm, при што се добиени добро раздвоени, тесни и симетрични хроматографски пикови.

Предложениот RRLC метод со употреба на ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV-DAD) е реалтивно брз и едноставен метод, којшто овозможува идентификација и квантитативно определување на активната компонента хлорогена киселина во препаратот Cirkon. Добиената средна вредност за концентрацијата на хлорогена киселина во препаратот Cirkon изнесува 0,1 g/L, којашто одговара на декларираната вредност од производителот.

**Клучни зборови:** хлорогена киселина, Cirkon, RP-RRLC, UV-DAD

### Вовед

Глобалните климатски промени влијаат и врз растителното производство. Од аспект на целокупниот раст и развој на растенијата, комплексот од биотски и абиотски фактори имаат големо значење за квантитетот и квалитетот на плодот.

Биостимулаторите во растителното производство претставуваат супстанции (фитохормони, витамини, алгински киселини, органски материи, микроелементи во хелатна форма, корисни елементи како на пример титанот, аминокиселини и др.) коишто го стимулираат растот и развојот на растението, а ги намалуваат и последиците од стресот кај растенијата (<http://tomatoland.mk>).

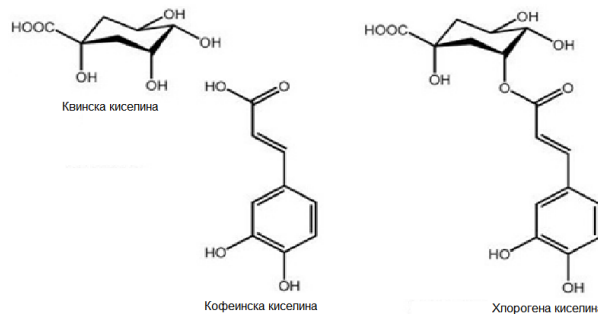
Со создавањето на нови хибриди, а паралелно со тоа и со зголемувањето на генетскиот потенцијал на културата, постепено, конвенционалниот метод на производство се заменува со современ, во којшто квалитетот на производот е на прво место. Со цел добивање на квалитетен и исклучително здрав производ, стресните состојби на растението мора значително да се намалат. Во намалувањето на стресот, активна улога игра апликацијата на биостимулаторите.

Биостимулаторите имаат директна улога во развивањето и функционирањето на растителниот организам. Тие го забрзуваат ртењето, го подобруваат растот и развитокот на кореновиот систем, го стимулираат развивањето на генеративните

органи и го продолжуваат животниот век на плодот. Овие супстанции при услови на суша го намалуваат коефициентот на транспирација на растението, а со тоа се намалува и потрошувачката на вода од страна на растението (<http://ffrm.org.mk>).

Еден од биостимулаторите што се регистрирани во Р. Македонија е производот Сirkon.

Сirkon претставува природен растителен фитохормон, којшто е патентиран и произведен во Руска научна компанија од авторот Natalia Malevannaya (<https://toptropicals.com>). Тој е претставник на новата генерација агрохемиски препарати. Производот Сirkon е раствор со жолто-зелена боја и карактеристичен мирис на етанол. Според хемискиот состав претставува смеса од хлорогена, кофеинска и цикорична киселина, екстрахирани од лековитото растение *Echinacea purpurea* L.



Сл. 1. Структурна формула на хинска, кофеинска и хлорогена киселина

Хлорогената киселина може да се сретне во различни видови кафе (1 литар кафе содржи од 500 до 800 mg) и грав, како и во помали дози во компири, домати, јаболка, круши, јагоди и др.

Молекулската формула на хлорогената киселина е  $C_{16}H_{18}O_9$ . Нејзината моларна маса изнесува  $354,30872 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , а густината  $1,28 \text{ g}/\text{cm}^3$ . Температурата на топење е  $207 \text{ }^\circ\text{C}$ . Добро се раствара во етанол, ацетон, вода, ацетонитрил. Внесена во човековиот организам има улога како силен антиоксиданс, а покажува и антибактериско, антивирусно и антиканцерогено својство.

Сirkon се употребува во подоцнежните фази на равој на растенијата (за време на цветање, созревање на плодови) и при повисоки температури, бидејќи делува и како „анти-стрес“ во период на сушни

Мoench, од кои доминанта е хлорогена киселина.

Хлорогената киселина и покрај „хлор“ во името, не содржи хлор. Наместо тоа, името доаѓа од грчкиот збор  $\chi\lambda\omega\rho\acute{o}\varsigma$  („хлорос“), што значи светло зелена и  $\gamma\acute{\epsilon}\nu\omicron\varsigma$  („генос“), што значи „кои доведуваат до“, поради зелената боја којашто ја добива кога ќе оксидира

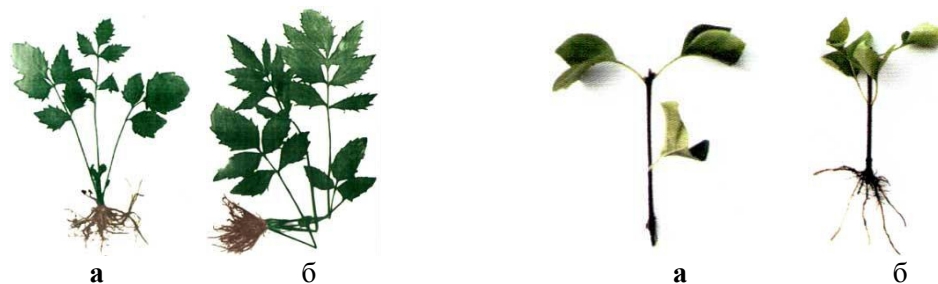
(<https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic>).

Според својата структурна формула, хлорогената киселина претставува естер на кофеинска киселина и хинска киселина. Хлорогената и кофеинската киселина се сметаат за силни антиоксиданси. Постојат повеќе изомери на хлорогената киселина како што се: нео-хлорогена киселина, *p*-хлорогена киселина, крипто-хлорогена киселина, и други изомери, наречени изо-хлорогена киселина (Naegele, 2013).

денови. Може да се користи и како поединечен препарат, но може и во комбинација со пестициди и ѓубрива. Треба да се напомене дека биостимулаторите не се ѓубрива, туку се соединенија коишто може да ги создаде и самото растение, но во ограничени количини (<https://toptropicals.com>).

Сirkon влијае врз растението на повеќе начини:

- доведува до зголемување на кореновиот систем
- го зголемува на интензитетот на цветањето
- заштитува од болести и штетници
- ја зголемува стапката на раст
- ја подобрува циркулацијата на кислородот низ самото растение.



Сл. 2. Влијание на Cirkon врз развојот на растенијата

На Слика 2 може да се види влијанието на Cirkon врз развојот на растенијата, каде што растението не е третирано (а) и растението е третирано (б) со Cirkon.

Во литературата нема податоци за определување на хлорогената киселина во препаратот Cirkon со течна хроматографија. Во најголем број на трудови, хлорогената киселина најчесто е испитувана во примероци од кафе, чај, тутун, а за нејзино квалитативно и квантитативно определување најчесто се користени аналитички методи со помош на високо ефикасна течна хроматографија (Naegele, 2013; Mullen, Freeke, Barattini, 2012; Chen et al., 2012; Binti, 2008; Brown et al., 2008).

Целта на овој труд е да се воспостави аналитички метод за квалитативно и квантитативно определување на активната компонента хлорогена киселина во производот Cirkon со помош на високоефикасна течна хроматографија со висока резолуција (RRLC, Rapid Resolution Liquid Chromatography) и ултравиолетов детектор со низа од диоди (UV-DAD, ultraviolet-diode array detector).

## Материјал и методи

### Реагенси

За подготовка на мобилните фази се користени растворувачи со HPLC чистота (HPLC grade) како што се: ацетонитрил ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) произведен од „Fluka“, метанол ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ), ултра чиста вода, произведени од Sigma Aldrich (Германија), фосфорна киселина ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) и мравска киселина ( $\text{HCOOH}$ ).

Аналитичкиот стандард од хлорогена киселина е производство на Sigma Aldrich (Германија), а биостимулаторот Cirkon е произведен од NNPP „Nest-M“, Русија и е подарок од застапникот за Р. Македонија „Хеомак пестициди“ од Велес.

### RRLC анализа

Хроматографското раздвојување и определување на хлорогена киселина во производот Cirkon е извршено во лабораторијата по хемија на Факултетот за земјоделски науки и храна – Скопје, со помош на течен хроматограф со висока резолуција Agilent 1260 Infinity Rapid Resolution Liquid Chromatography (RRLC), опремен со бинарна пумпа (G1312B), вакуум дегазер (G1322A), автосемплер (G1329B), термостатиран дел за колоната (G1316A), UV-VIS детектор со низа од диоди (DAD) (G1316B) и ChemStation софтвер (version C.01.02).

При хроматографското определување се користени повеќе типови аналитички колони со различни димензии и големина на честички. Имено, употребени се кратки колони од типот: Purospher STAR RP-18e ( $30 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ;  $3 \mu\text{m}$ ), произведена од Merck, Poroshell 120 EC-18 ( $50 \text{ mm} \times 3 \text{ mm}$ ;  $2,7 \mu\text{m}$ ) од Agilent Technologies, како и долгата колона од типот: LiChrospher 60 RP-select B ( $125 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$ ;  $5 \mu\text{m}$ ), произведена од Merck.

Основниот стандарден раствор од хлорогена киселина, како и растворите од Cirkon се растворени со помош на ултразвучна бања од типот „Elma“.

*Подготовка на основен и работен стандарден раствор од активната компонента*

Основниот стандарден раствор што е користен при разработка на методите за реверзно-фазна хроматографија е приготвен со растворање на  $0,0026 \text{ g}$  од аналитичкиот стандард хлорогена киселина со метанол/( $0,05 \%$  мравска киселина во вода), со волуменски однос 50/50 во одмерна тиквичка од  $10 \text{ mL}$  ( $10 \text{ cm}^3$ ). За да се изврши подобро растворање на активната компонента, подготвениот стандарден раствор е ултрасонифициран во

ултразвучна бања во времетраење од 15 минути.

Работниот стандарден раствор е приготвен со разредување на основниот стандарден раствор. Имено, 1 mL од основниот стандарден раствор е земен и префрлен во одмерна тиквичка од 10 mL, дополнета до марката со смеса од метанол и 0,05 % мравска киселина во вода, со волуменски однос 50/50.

*Подготовка на раствор од производот Cirkon*

Во одмерна тиквичка од 10 mL е измерена маса од 2,4710 g од производот Cirkon и растворена со метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) со волуменски однос 50/50. Вака подготвениот раствор е ултрасонифициран во времетраење од 15 минути.

### Резултати и дискусија

*Разработка на RP-RRLC методи за квантитативно определување на хлорогена киселина во производот Cirkon*

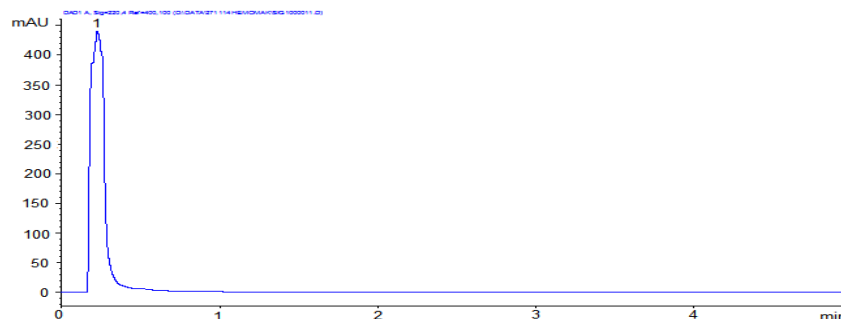
При испитување на можностите за воспоставување на реверзно-фазни RRLC методи со коишто ќе се изврши определување на концентрацијата на хлорогена киселина во производот Cirkon се употребени три аналитички колони со различни димензии и различна големина на честички.

Хроматографскиот процес е воден со примена на изократско елуирање, односно со употреба на константен состав на мобилната фаза, а е следен на бранова должина од 220 nm.

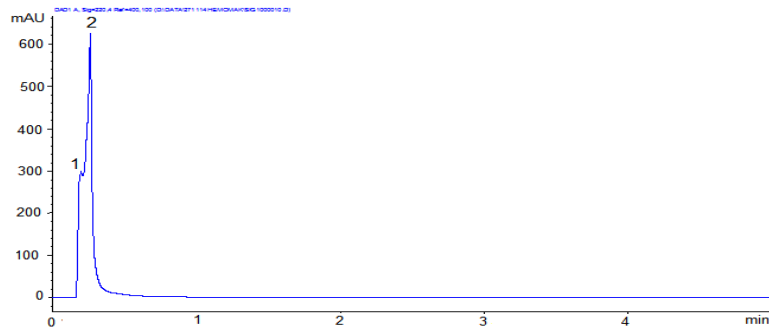
*Колона Purospher STAR RP-18e (30 mm × 4 mm; 3 μm)*

Хроматографската колона од типот Purospher STAR RP-18e (endcapped) (30 mm × 4 mm; 3 μm) е изградена од извонредно чист силика гел, чијашто површина е целосно прекриена со C-18 радикали. Погодна е за ефикасно раздвојување на базни, неутрални и хелатни соединенија со примена на едноставни мобилни фази. Благодарение на извонредната стабилност во широк интервал на рН вредности од 1,5 до 10,5 овозможува раздвојување на комплексни примероци со употреба на различни мобилни фази, при различни температурни услови (ChromBook., 2011 a). Со цел да се добијат оптимални услови за раздвојување се изведени серија од прелиминарни испитувања со менување на составот на мобилната фаза. Имено, се користени мобилни фази составени од метанол/вода, метанол/(0,5 % мравска киселина во вода), метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) и ацетонитрил/(0,05 % мравска киселина во вода) со различни волуменски односи.

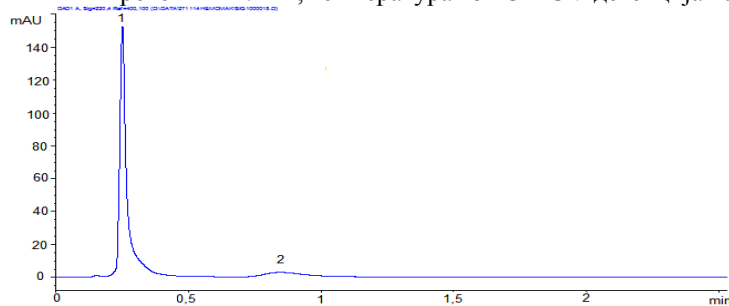
Познато е дека хлорогената киселина се јавува во повеќе изомерни форми, од кои четири се застапени во поголеми количества (Naegele, 2013). Според тоа, во хроматограмите добиени од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина очекуваме најмалку четири хроматографски пикови. На следните слики (Сл. 3 – Сл. 7) се прикажани хроматограми од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, добиени со примена на различни мобилни фази и колона од типот Purospher STAR RP-18e (30 mm × 4 mm; 3 μm).



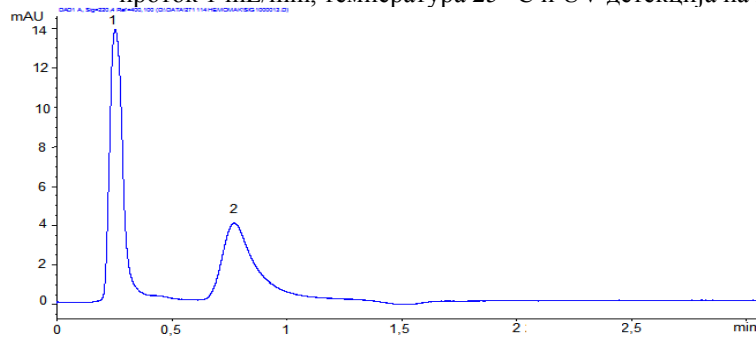
Сл. 3. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, со примена на мобилна фаза составена од метанол/(0,05 % мравска киселина во вода), (70/30, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm



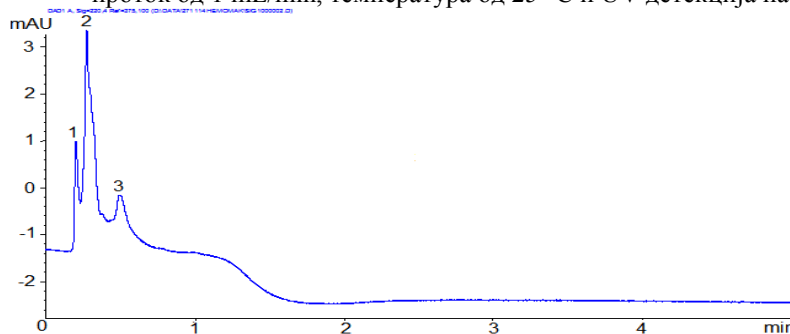
Сл. 4. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, со примена на мобилна фаза составена од метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) (60/40, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm



Сл. 5. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, со примена на мобилна фаза составена од метанол/(0,05 % мравска киселина во вода), (30/70, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm



Сл. 6. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, добиен со примена на мобилна фаза составена од метанол/(0,05 % мравска киселина во вода), (40/60, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25 °C и UV детекција на 220 nm



Сл. 7. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард на хлорогена киселина, добиен со примена на мобилна фаза составена од ацетонитрил/(0,05 % мравска киселина во вода), (30/70, V/V), проток од 1 mL/min, температура од 25 °C и UV детекција на 220 nm

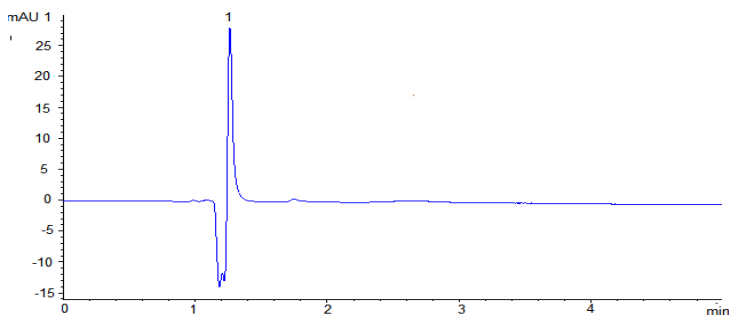
Од добиените хроматограми може да се заклучи дека оваа колона не е доволно ефикасна за одделување на изомерите од хлорогена киселина. Имено, неколкуте

очекувани хроматографски пикови, се споени во еден пик (Сл. 3), во еден „расцепен“ пик (Сл. 4.), или пак, недоволно раздвоени (Сл. 5-7).

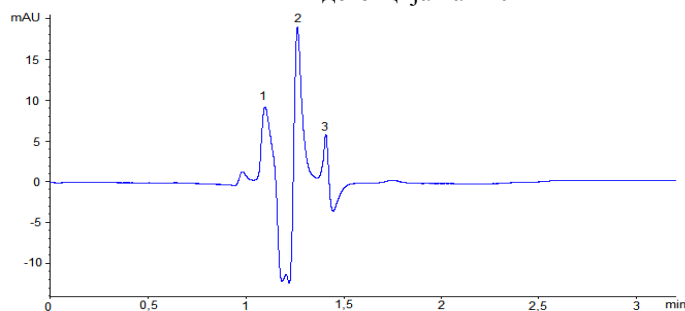
Колона LiChrospher 60 RP-select B (125 mm × 4 mm; 5 μm)

Стационарната фаза LiChrospher 60 RP-select B е изградена од сосема порозен силика гел со големина на пори од 6 nm. Прекриена е со хидрофобни октил (C-8) радикали, заради што е погодна за употреба во реверзно-фазна течна хроматографија. Оваа стационарна фаза нуди одлични можности за определување на базни супстанции, но таа е доста добра и за

определување на неутрални и кисели компоненти. Оваа колона се применува со цел да се добијат високо репродукцибилни резултати, односно да се елиминираат варијациите помеѓу различните повторувања. Честичките имаат сферна форма, а нивната големина може да биде 5 μm или 10 μm. Погодна е за работа при pH вредност од 2 до 7,5 (ChromBook, 2011; 2006/07; 2004).



Сл. 8. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард, мобилна фаза составена од метанол/(0,05 % мравска киселина во вода), (20/80, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm



Сл. 9. Хроматограм добиен од препарат(Cirkon), мобилна фаза составена од метанол/ (0,05 % мравска киселина во вода), (20/80, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm

Со цел да се добијат оптимални услови за раздвојување се изведени серија испитувања со менување на составот на мобилната фаза. Тестирани се следниве мобилни фази составени од метанол/вода, метанол/(0,5 % мравска киселина во вода) и метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) со различни волуменски односи.

Од добиените хроматограми може да се заклучи дека со употреба на оваа колона не е постигнато добро разделување на изомерите од хлорогена киселина. Имено, со примена на веќе спомнатите мобилни фази, на хроматограмот добиен од аналитичкиот стандард се забележува само еден пик (Сл. 8). Затоа, понатамошните

испитувања ги вршевме со употреба на друга стационарна и мобилна фаза.

Колона Poroshell EC 120-c18 (50 mm × 3 mm; 2,7 μm)

Во следните испитувања тргнавме од резултатите добиени од Edgar Naegele [Naegele, 2013], којшто извршил определување на хлорогената киселина во примероци од печено кафе. Тој употребил градиентно елуирање со мобилна фаза составена од 1 % фосфорна киселина растворена во вода (А) и чист ацетонитрил (Б) на три колони, меѓу кои и Agilent Poroshell 120 EC-C18 (3,0 × 50 mm; 2,7 μm), при константна температура на колоната од 25 °C и UV детекција на 324 nm.

Аналитичките колони од типот Poroshell 120 овозможуваат исклучителна ефикасност – зголемена брзина и истовремено зголемена резолуција на хроматографскиот процес во рамките на постоечкиот опсег на притисоци на тековните инструменти и повисока резолуција и брзина на новите LC и LC-MS системи, кои овозможуваат работа при повисоки притисоци (Велкоска-Марковска, 2013).

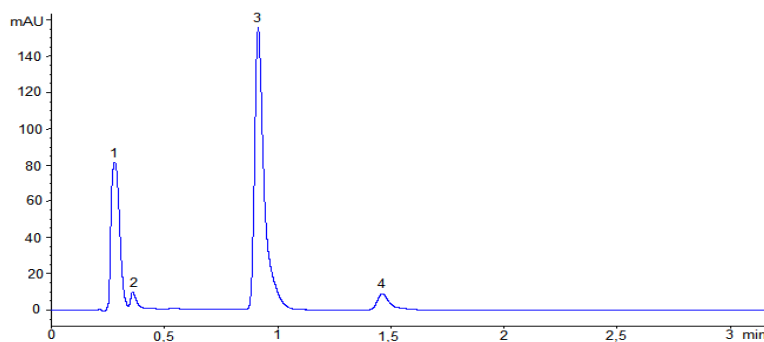
Стационарната фаза Poroshell 120 EC-C18 се состои од цврсто јадро на силика со големина од 1,7  $\mu\text{m}$  и порозен надворешен слој со дебелина од 0,5  $\mu\text{m}$  на кој се наоѓа хемиски врзана фаза EC-C18. Овој тип на честички со вкупна големина од 2,7  $\mu\text{m}$ , обезбедува висока ефикасност при пониски притисоци во споредба со мали, сосема порозни честички и е идеален за брза хроматографска анализа или раздвојување со висока резолуција на многу видови на аналити. Униформните, сферични честички од ултра чиста силика (> 99,995 %  $\text{SiO}_2$ ) се дизајнирани со цел да се намали или елиминира силна адсорпција на базни и високо поларни соединенија. Големината на порите изнесува 12 nm. Овие колони се механички стабилни и може да се користат до притисок од 600 bar и температура до 60  $^{\circ}\text{C}$ . Poroshell 120 EC-C18 е наменета за реверзно-фазна хроматографија и може да се користи за базни, неутрални или кисели примероци, при рН вредност од 2 до 9 (Agilent Technologies, Inc., 2012 a, b).

За да се добијат оптимални услови за раздвојување на аналитите се изведени серија од експерименти со изократско и градиентно елуирање со мобилна фаза составена од ацетонитрил и 1 % фосфорна киселина растворена во вода.

Испитувањата покажаа дека градиентното елуирање трае подолго време, при што се трошат поголеми волумени растворувачи, а во нашиот случај дадоа полоши резултати отколку со примена на изократско елуирање, коешто е поедноставно, побрзо и поекономично.

Оптималните услови за квалитативно и квантитативно определување на активната компонента хлорогена киселина во препаратот Cirkon се добиени со помош на изократско елуирање со мобилна фаза составена од ацетонитрил/(1 % фосфорна киселина растворена во вода), со волуменски однос (10/90, V/V), проток на мобилна фаза од 1 mL/min, константа температура на колоната од 25  $^{\circ}\text{C}$  и UV детекција на 220 nm (Сл. 10).

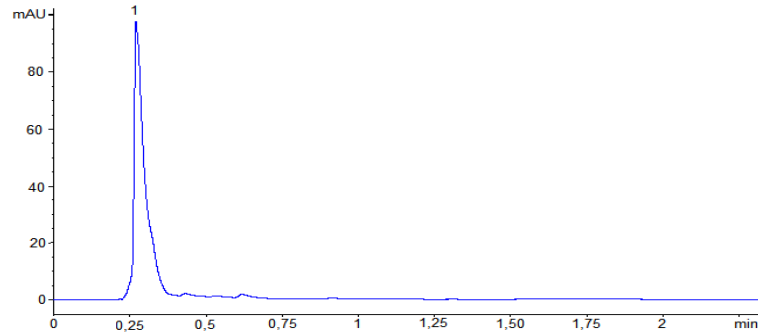
При овие експериментални услови е добиена мирна базна линија, а хроматографските пикови се тесни и добро раздвоени. Како што може да се види од Сл. 10, на хроматограмот добиен од аналитичкиот стандард се забележуваат четири пика, што значи дека при овие хроматографски услови на работа успешно се раздвоени изомерите на хлорогена киселина коишто се застапени во поголеми концентрации.



Сл. 10. Хроматограм добиен од аналитичкиот стандард хлорогена киселина, мобилна фаза составена од ацетонитрил/(1% фосфорна киселина растворена во вода), (10/90, V/V), проток 1 mL/min, температура 25  $^{\circ}\text{C}$  и UV детекција на 220 nm

На Сл. 11 е прикажан хроматограм добиен од производот Cirkon, при истите хроматографски услови на работа. Како што може да се види од оваа слика, во

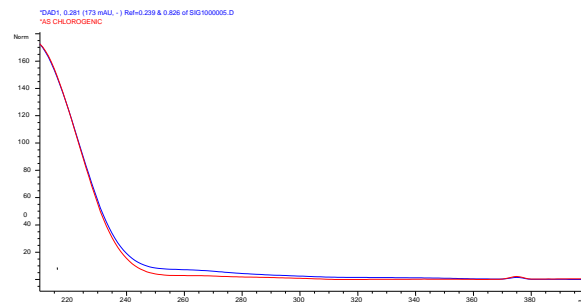
испитуваниот препарат е присутен (во мерливи количества) само еден изомер на хлорогена киселина (1).



Сл. 11. Хроматограм добиен од препаратот *Cirkon*, мобилна фаза составена од ацетонитрил/(1% фосфорна киселина растворена во вода), (10/90, V/V), проток 1 mL/min, температура 25 °C и UV детекција на 220 nm

Специфичноста и селективноста на методот се проценуваат со идентификација на пикот од интерес и добиената вредност за индексот на чистота (Петановска-Илиевска, 2001; Велкоска-Марковска, 2008). Идентификацијата на анализот е извршена со споредување на ретенциското време на аналитичкиот стандард со она на истата компонента од пробата *Cirkon*. Исто така,

земена е предвид вредноста за факторот на совпаѓање (*match factor*) добиен со препокривање на UV спектарот на чистиот аналитички стандард и апсорпцискиот спектар на истиот аналит присутен во анализираниот примерок (Сл. 12). Високата вредност за факторот на совпаѓање (> 998) е доказ дека хроматографскиот пик е од една иста супстанца.



Сл. 17. Препокриени UV спектри на хлорогена киселина од хроматографските сигнали на хлорогена киселина од аналитичкиот стандард и производот *Cirkon*, снимени во раствор на ацетонитрил/(1 % фосфорна киселина во вода), (10/90, V/V)

Во Табела 1 се прикажани некои покарактеристични вредности за анализот, добиени со предложениот метод.

Пресметување на содржината на активната компонента хлорогена киселина во

$$W(\%) = \frac{\frac{A(\text{препарат})}{\text{Одвага (препарат)}}}{\frac{A(\text{аналитички стандард})}{\text{Одвага (аналитички стандард)}}} \times \text{чистота на аналитичкиот стандард}$$

$$W(\%) = \frac{\frac{H(\text{препарат})}{\text{одвага (препарат)}}}{\frac{H(\text{аналитички стандард})}{\text{одвага (аналитички стандард)}}} \times \text{чистота на аналитичкиот стандард}$$

производот *Cirkon* е направена со користење на калибрација во една точка, според следниве формули (Петановска-Илиевска, Велкоска-Марковска, Водеб, 2010):



Табела 1. Некои карактеристични вредности за аналитот добиени со RRLC методот

	$\bar{x}$
Нулно време ( $t_0$ )	0,234 min
Ретенциско време ( $t_r$ )	0,276 min
Ретенциски фактор ( $k'$ )	0,179
Површина под хроматографскиот пик од аналитичкиот стандард хлорогена киселина (А (аналитички стандард))	220,593
Висина на хроматографскиот пик од аналитичкиот стандард хлорогена киселина (Н (аналитички стандард))	90,77
Површина под хроматографскиот пик од хлорогена киселина во препаратот Cirkon (А (препарат))	244,703
Висина на хроматографскиот пик од хлорогена киселина во препаратот Cirkon (Н (аналитички препарат))	91,977

Во Табела 2, се прикажани добиените вредности за содржината на аналитот во испитуваната проба. Со помош на разработениот метод добиените средни

вредности за содржината на активната компонента изнесува: 0,10 g/L, што одговара на декларираната вредност од производителот.

Табела 2. Содржината на хлорогена киселина во производот Cirkon

W/(%)		$\gamma$ /(g/L)	
Според површина под хроматографскиот пик	Според висина на хроматографскиот пик	Според површина под хроматографскиот пик	Според висина на хроматографскиот пик
0,0111	0,0101	0,105	0,095

### Заклучок

За воспоставување на реверзно-фазните хроматографски методи се користени три аналитички колони со различни димензии и големина на честички (Purospher STAR RP-18e (30 mm  $\times$  4 mm; 3  $\mu$ m), LiChrospher 60 RP-select B (125 mm  $\times$  4 mm; 5  $\mu$ m) и Poroshell 120 EC-18 (50 mm  $\times$  3 mm; 2,7  $\mu$ m)) и мобилни фази составени од метанол/вода, метанол/(0,5 % мравска киселина во вода), метанол/(0,05 % мравска киселина во вода) и ацетонитрил/(0,05 % мравска киселина во вода) со различни волуменски односи.

Врз основа на експериментално добиените резултати може да се заклучи дека оптималните услови за квалитативно и квантитативно определување на активната компонента хлорогена киселина во препаратот Cirkon се добиени со употреба на аналитичката колона од типот Poroshell 120 EC-18 (50 mm  $\times$  3 mm; 2,7  $\mu$ m) и изократско елуирање со мобилна фаза составена од ацетонитрил/(1 % фосфорна киселина растворена во вода), (10/90, V/V), проток на мобилна фаза од 1 mL/min,

константа температура на колоната од 25 °C и UV детекција на 220 nm.

Предложениот RRLC метод со UV детекција за квалитативно и квантитативно определување на содржината на активната компонента хлорогена киселина во производот Cirkon е брз, едноставен и економичен.

### Литература

- Agilent Technologies, Inc., Agilent Poroshell 120 EC-C18 Threaded Column, 2012 a.  
 Agilent Technologies, Inc., Agilent Poroshell 120 Columns for HPLC and UHPLC, Perform Rugged, Fast Lc with confidence, 2012 b.  
 Binti N. H., Determination of caffeine, chlorogenic acid and nicotinic acid in coffee beans by using HPLC, Chemistry in the Faculty of Applied Sciences Universiti Teknologi MARA (2008).  
 Brown P. N., Chan M., Paley L., Betz J. M., Determination of Major Phenolic Compounds in Echinacea spp. Raw Materials and Finished Products by High-Performance Liquid

Chromatography with Ultraviolet Detection, South Hackensack, NJ (2008).

Велкоска-Марковска Л. Д., Разработка на HPLC методи за истовремено определување на активните компоненти фенмедифам, десмедифам и етофумесат во посетичидната формулација Inter Of, Магистерски труд, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Скопје, 2008.

Велкоска-Марковска Л. Д., Разработка на HPLC методи за квантитативно определување на некои хербициди и органофосфорни инсектициди во различни матрици, Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Скопје, 2013.

Mullen W., Freeke J., Barattini V., Fast Analysis of Coffee Bean Extracts Using a Solid Core HPLC Column, University of Glasgow, UK (2012).

Naegele, E., Determination of Chlorogenic Acid in Coffee Products According to DIN 10767, Food Testing & Agriculture USA (2013).

Петановска-Илиевска Б., Разработка на HPLC методи за квантитативно определување на активните компоненти

пиримикарб и дазомет во пестицидни формулации, Докторска дисертација, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“, Природно-математички факултет, Скопје, 2001.

Петановска-Илиевска, Б., Велкоска-Марковска, Л., Водеб, Л. (2010). Дневник за лабораториски вежби по аналитичка хемија, Универзитет „Св. Кирил и Методиј“ во Скопје, Факултет за земјоделски науки и храна, Скопје.

<http://ffrm.org.mk/>

<http://tomatoland.mk/>

<https://toptropicals.com>

<http://www.ekoplantserbia.com/>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic\\_acid](https://en.wikipedia.org/wiki/Chlorogenic_acid)

Chen Y., Yu Q. J., Xuemei L., Luo Y., Extraction and HPLC Characterisation of Chlorogenic Acid from Tobacco Residuals, Nanjing Normal University, Nanjing, P.R. China (2012)

ChromBook, Your guide to a fascinating world of chromatography, Merck, 2011.

ChromBook, Chromatography at Merck – Experience drives Innovation, Merck, 2006/07.

ChromBook, Merck, 2004.