

## ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ПОЛІФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК У ЛІКАРСЬКИХ РОСЛИНАХ

**Ключові слова:** поліфенольні сполуки, люмінесценція, тербію (III), сорбція, лікарські рослини

Сполуки фенольної та поліфенольної природи мають властивості антиоксидантів, містяться у складі багатьох лікарських рослин, що зумовлює їх фармакологічну активність. Флавоноїди чинять протизапальну, антигістамінну, антиоксидантну дію, знімають набряки, зменшують ризик серцево-судинних захворювань, стабілізують клітинні мембрани, гальмують процеси старіння [4], тому містяться у складі багатьох біологічно активних добавок і лікарських препаратів [5]. У зв'язку з цим поліфенольні сполуки є важливим показником доброякісності лікарської рослинної сировини.

Для визначення флавоноїдів використовують спектроскопічні [9, 6], хроматографічні [1, 3], електрохімічні [10, 12] методи аналізу та капілярний електрофорез [11]. Найпростішим є спектрофотометричний метод, який на відміну від інших не потребує занадто дорогого обладнання. Значного поширення набув метод Фолина–Деніса (ФД) [3], що ґрунтується на утворенні блакитних продуктів окиснення фенольних сполук вольфрамовою кислотою у лужному середовищі. Однак, цей метод має суттєві недоліки, бо реакція перебігає у вузькому інтервалі значень рН від 7,0 до 8,0. За  $\text{pH} \leq 7,0$  оптична густина не досягає максимального значення, внаслідок неповного перебігу реакції. За  $\text{pH} \geq 8,0$  у реакційній суміші випадає осад, що призводить до отримання занижених результатів.

Мета даної роботи полягає у розробці методики кількісного визначення суми поліфенольних сполук у лікарській рослинній сировині. Як аналітичний сигнал при цьому використовували сенсibilізовану поліфенольними сполуками твердофазну люмінесценцію йона Tb (III), підсилену за наявності донорно-активної добавки триоктилфосфіноксиду (ТОФО).

**Реагенти та обладнання.** Як стандартний розчин використовували галову кислоту, розчин якої готували розчиненням точної наважки препарату в етанолі. Хлорид тербію готували розчиненням найчистішого оксиду (99,99 %) у хлористоводневій кислоті (1:1) з подальшим видаленням її надлишку випарюванням. Концентрацію Tb (III) контролювали комплексонометричним титруванням розчином комплексону (III) з індикатором арсеназо I за наявності уротропіну. Розчин ТОФО готували розчиненням точної наважки речовини в етанолі.

Об'єктами дослідження була лікарська рослинна сировина: квітки ромашки, шишки хмелю, трава чистотілу, які згідно з даними літератури є багатим джерелом сполук поліфенольної природи.

Спектри люмінесценції комплексів поліфенольних сполук з йонами тербію (III) реєстрували за допомогою спектрометра ИСП-51 з фотоелектричною приставкою ФЭП-1, люмінесценцію збуджували світлом ртутно-кварцової лампи СВД-120А зі світлофільтром УФС-2, що виділяє випромінювання з  $\lambda_{\text{макс}} = 365 \text{ нм}$ . рН розчинів вимірювали за допомогою іономера універсального ЕВ-74.

### Експериментальна частина

Відомо, що поліфенольні сполуки утворюють комплекси з йонами лантанидів [8], в яких внаслідок внутрішньомолекулярного переносу енергії йони тербію (III) виявляють сенсibilізовану люмінесценцію [2, 7]. Як поліфенольний стандарт використовували галову кислоту, за допомогою якої були обрані оптимальні умови проведення аналізу.

Виявлено, що інтенсивність люмінесценції комплексів значно підвищується на сорбентах унаслідок збільшення жорсткості сорбатів і зменшення при цьому безвипромінювальних втрат енергії збудження. Застосування сорбційно-люмінесцентного визначення дає змогу

провести концентрування і позбутися безвипромінювальних втрат енергії внаслідок теплових співударів молекул, які є у розчинах, а також виключити гасіння люмінесценції молекулами води, які містяться у внутрішній або зовнішній координаційних сферах комплексу. Все це дає змогу підвищити чутливість і експресність аналізу.

Як сорбенти були досліджені силікагелі 100/160 та 100/400, фосфат алюмінію, Sephadex G-50, G-75, G-150, а також цеоліти (CaA, NaA), пеноноліуретан. Встановлено, що найбільша інтенсивність люмінесценції сорбата спостерігається на Sephadex G-75 (рис.1), який обрали для подальших досліджень.

Сорбція комплексу триває 10–15 хв. Інтенсивність люмінесценції сорбату залежить від рН розчину, з якого проводиться сорбція. Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається за рН=4,3. Для створення оптимального значення рН розчину використовують оцтовий буферний розчин з рН=4,3.

Інтенсивність люмінесценції сорбата залежить від температури (рис.2) та часу висушування сорбента (рис.3). Як зображено на рис. 2, максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається при висушуванні сорбата за температури 80 °С протягом 60 хв.

Вивчення залежності інтенсивності люмінесценції сорбата комплексу від кількості йонів Tb (III) на сорбенті свідчить, що інтенсивність люмінесценції підвищується зі збільшенням концентрації йонів Tb (III). Найбільша інтенсивність люмінесценції спостерігається за концентрації Tb (III) –  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л.

Відомо, що інтенсивність люмінесценції комплексів лантанідів з органічними лігандами значно збільшується за наявності другого ліганду, у ролі якого можуть бути різні донорно-активні речовини, такі як 1, 10- фенантролін,  $\alpha$ ,  $\alpha$ -дипіридил, трифенілфосфіноксид, триоктилфосфіноксид, діантипірилметан та ін. Встановлено, що інтенсивність люмінесценції сорбата комплексу Tb (III) з галовою кислотою значно підвищується за наявності триоктилфосфіноксиду (ТОФО). Завдяки наявності трьох гідрофобних октильних ланцюжків у молекулі, ТОФО гідрофобізує молекулу і захищає комплекс, який утворюється, від дезактивуючих люмінесценцію впливів молекул води. Максимальна інтенсивність люмінесценції комплексу спостерігається за концентрації ТОФО –  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л.

Лінійна ділянка залежності інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації галової кислоти, яку використовують як поліфенольний стандарт, спостерігається у діапазоні концентрацій галової кислоти 0,045-1,7 мкг/мл.

#### **Визначення суми фенольних сполук у лікарських рослинах**

Наважку 1 г сухої подрібненої лікарської рослини переносять у колбу, додають 50 мл 70 % етанолу і перемішують на магнітній мішалці протягом 60 хв при температурі 70 °С. Колбу з вмістом охолоджують до кімнатної температури. Одержаний екстракт відфільтровують на фільтрі «синя стрічка» у мірну колбу. Доводять об'єм екстракту до 50 мл 70 % етанолом.

Наважку 100 мг Sephadex G-75 поміщають у три пробірки, обробляють 1 мл водного розчину хлориду тербію (III) ( $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л), перемішують протягом 5 хв до желеподібного стану. Потім в дві пробірки додають по 0,5 мл екстракту сировини, що аналізується. Далі у дві пробірки додають по 0,5 мл стандартного розчину галової кислоти з концентрацією  $1 \cdot 10^{-5}$  моль/л. Далі додають у кожну пробірку по 0,2 мл ацетатного буферного розчину з рН=4,3, по 0,2 мл розчину триоктилфосфіноксиду ( $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л) і перемішують протягом 15 хв. Осад відфільтровують і висушують протягом 60 хв при температурі 80 °С. Потім розтирають у ступці до порошкоподібного стану і реєструють інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу за  $\lambda_{\text{випром.}} = 545$  нм, при збудженні люмінесценції світлом ртутної лампи зі світлофільтром УФС-2 ( $\lambda_{\text{збудж.}} = 365$  нм).

Аналогічно готують проби з другою добавкою, яка за вмістом у два рази перевищує першу, наведену в табл. 1. Розраховують вміст фенольних сполук за методом добавок. Результати визначення фенольних сполук у квітках ромашки аптечної методом «введено–знайдено» наведені в таблиці.

В 1г квіток ромашки виявлено 33,5 мг фенольних сполук в перерахунку на галову кислоту. Одержані результати підтверджують правильність методики.

Правильність методики підтверджено також задовільним збігом результатів, одержаних люмінесцентним методом, який пропонується, і спектрофотометричним методом Фоліна–Деніса (табл.2)

Т а б л и ц я 1

Результати визначення фенольних сполук (мг/мл) у квітках ромашки аптечної методом «введено–знайдено»

Введено	Знайдено	Sr
0,0	0,67	0,051
0,10	0,76	0,042
0,20	0,88	0,048

Таблиця 2

Результати визначення фенольних сполук у рослинній сировині (мг/мл), n=5,0; P=0,95

№ прикладу	Рослинна сировина	Люмінесцентний метод, який пропонується		Спектрофотометричний метод	
		вміст фенольних сполук	Sr	вміст фенольних сполук	Sr
1	Квітки ромашки	0,67	0,035	0,56	0,037
2	Шишки хмелю	0,30	0,028	0,34	0,036
3	Чистотіл	0,54	0,040	0,47	0,029

В и с н о в к и

І люм., відн.од.

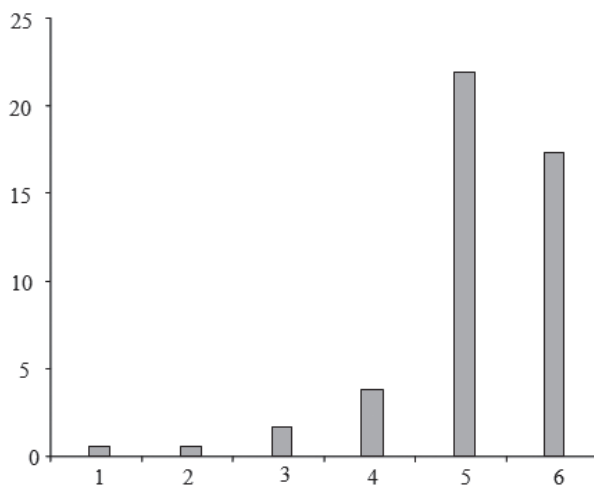


Рис. 1. Залежність інтенсивності люмінесценції сорбату комплексу від типу сорбента: на силікагелях 100/160 (1), 100/400 (2), фосфаті алюмінію (3) й на Sephadex G-50 (4), G-75(5), G-150 (6)

І люм., відн.од.

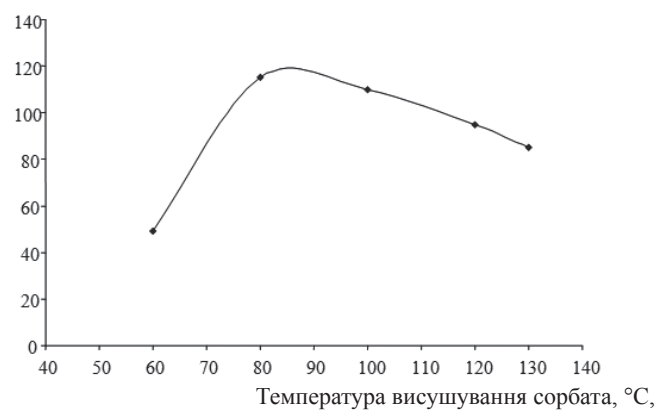


Рис. 2. Вплив температури висушування на інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу

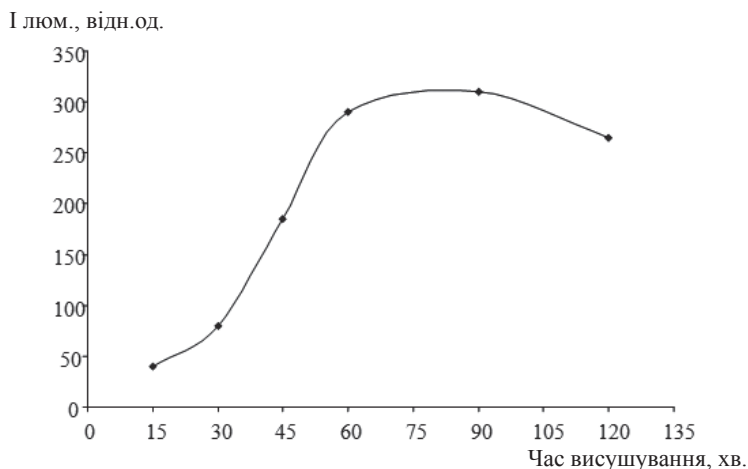


Рис. 3. Вплив часу висушування на інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу

1. Встановлено оптимальні умови твердофазної люмінесценції комплексу тербію (III) з галовою кислотою, яка використана як поліфенольний стандарт. Межа виявлення поліфенольних сполук становить 0,02 мкг/мл.

2. Розроблено методику визначення суми поліфенольних сполук у лікарських рослинах, що ґрунтується на реєстрації сенсibiliзованої люмінесценції іонів тербію (III) у сорбатах комплексів з вказаними сполуками.

1. Алексеева М.А., Эллер К.И., Арзамасцев А.П. //Химико-фармацевтический журнал. – 2004. – Т. 38, №12. – С. 39–41

2. Бельтюкова С.В., Теслюк О.И., Ливенцова Е.О. // Вісник Одеського національного університету. – 2003. – Т. 8, № 8. – С. 220–224.

3. Бенетис Р., Радушене И., Якитас В., Янулис В., Пуоджюнене Г. Милашюс А. //Химико-фармацевтический журнал. – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 51–54

4. Георгиевский В.П., Комиссаренко Н.Ф., Дмитрун С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. – Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.

5. Государственная фармакопея СССР: Вип. 2. – 11-е изд. доп. – М: Медицина, 1989. – С. 257.

6. Кудринская В.А., Дмитриенко С.Г., Золотов Ю.А. // Весн. Моск. ун-та, сер.2. Химия. – 2010. – Т. 51, № 4. – С. 296–301.

7. Подуэжтов Н.С., Тищенко М.А., Алакаева Л.А. // Труды по химии и хим. технологии. – Горький: Горьковский университет, 1973, т.4. – С. 104–105.

8. Яцимирский К.Б., Костромина Н.А., Шека З.А., Давиденко Н.К., Крисс Е.Е., Ермоленко В.И. //Химия комплексных соединений редкоземельных элементов. – К.: Наук. думка, 1966. – 493 с.

9. Kuntic V., Pejic N., Micic S., Vukojevic V., Vujic Z., Malesev D. // J. Serb. Chem. Soc. – 2005. – 70. – P. 753–755.

10. Freitas K.H.G., Medeiros R.A., Fatibello-Filho O. // Anal. Lett. – 2009. – V. 42. – P. 881–885.

11. Wang S. – P., Huang K. – J. // J. Chromatogr. A. – 2004. – V. 1032. – P.273–275.

12. Zhang S., Dong S., Chi L., He P., Wang Q., Fang J. // Talanta. – 2008. – V. 76. – P. 780–782.

Надійшла до редакції 01.07.2011.

С.В.Бельтюкова, А.А.Бычкова

## ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ПОЛИФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

**Ключевые слова:** полифенольные соединения, люминесценция, тербий (III), сорбция, лекарственные растения

Разработана простая методика определения суммы полифенольных соединений в рас-

тительном сырье, основанная на регистрации сенсibilизированной люминесценции ионов тербия (III) в сорбатах комплексов с указанными реагентами, усиленной наличием триоктилфосфиноксида. Изучены оптимальные условия получения и люминесценции сорбатов.

Установлено, что наибольшая интенсивность люминесценции наблюдается на сорбенте Sephadex G-75 при сорбции из ацетатных растворов при pH=4,3, с наличием донорно-активной добавки – триоктилфосфиноксида. Наименьшее обнаруживаемое количество полифенольных соединений составляет 0,02 мкг/мл.

*S.Beltyukova, A.Bychkova*

#### LUMINESCENCE DETERMINATION OF SUM POLYPHENOLIC COMPOUNDS IN MEDICINAL RAW MATERIALS

**Key words:** polyphenolic compounds, luminescence, terbium (III), sorption, medicinal plants

#### S U M M A R Y

A new simple method was developed for the determination of sum polyphenolic compounds in medicinal raw materials. This method is based on registration of the sensitized luminescence of terbium (III) ions in sorbates of complexes with the specified reagents and enhanced in the presence trioctylphosphine oxide. The optimal conditions of determination and luminescence of sorbates were investigated.

The maximum intensity of a luminescence is observed on Sephadex G-75 in the acetic solutions at pH = 4,3 in the presence of the donor active substance – trioctylphosphine oxide.

The least found out quantity of polyphenolic compounds is 0,02 mkg/ml.