

Spectrophotometric Determination of Quercetin and Sum of Polyphenols by Using 18-Molybdodiphosphate Heteropoly Complex

T.A. Denisenko, L.P. Tsiganok, A.B. Vishnikin*

Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarina St., 72, 49010, Dnepropetrovsk,
*e-mail: vishnikin@hotmail.com

Received: July 28, 2014; Accepted: January 28, 2015

18-molybdodiphosphate heteropoly complex (18-MPC) with Dawson structure was proposed as reagent for the spectrophotometric determination of quercetin and sum of polyphenols. Reaction of 18-MPC with quercetin and polyphenols goes under milder conditions than by using Folin-Ciocalteu reagent. Full development of the color is observed at pH>7 and takes less than one minute by the condition that reagent concentration is increased to 0.01 mol/l. Molar absorptivity for quercetin was equal to $5.5 \cdot 10^4 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ at 820 nm that allowed to determine up to 10^{-7} mol ($l = 5 \text{ cm}$) of it. 18-MPC can be successfully applied to the evaluation of the content of polyphenol compounds in plant preparations. Comparison of the results of the analysis obtained with the proposed reagent correlate well with the results of aluminium chloride and Folin-Ciocalteu methods. In some instances, the last method gives overestimated results. Because at pH 11.4 many substances have an influence on the determination of polyphenols, including monophenols, reducing sugars, phenolic acids, aminoacids, and proteins. In contrast to aluminium chloride, 18-MPC can react with most of polyphenolic compounds that allows more reliably to evaluate their content in great number of the objects of the analysis.

Keywords: 18-molybdodiphosphate, heteropoly complex, Folin-Ciocalteu reagent, polyphenol compounds, quercetin, spectrophotometric determination

Спектрофотометрическое определение кверцетина и суммы полифенолов с использованием 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса

Т.А. Денисенко, Л.П. Цыганок, А.Б. Вишникин*

Днепропетровский национальный университет имени Олеся Гончара, пр.Гагарина 72, 49010,
Днепропетровск; *e-mail: vishnikin@hotmail.com

Поступила: 28 июля 2014 г; Принята в печать: 28 января 2015 г

В качестве реагента для спектрофотометрического определения кверцетина и суммы полифенолов предложен 18-молибдодифосфорный гетерополикомплекс структуры Доусона (18-МФК). Реакция 18-МФК с кверцетином и полифенолами протекает в более мягких условиях, чем при использовании реактива Фолина-Чокальтеу. Полное развитие окраски наблюдается при $\text{pH} > 7$, причем при концентрации реагента порядка 0.01 моль/л процесс окисления рутина занимает намного меньше минуты. Молярный коэффициент светопоглощения для кверцетина при 820 нм составил $5.5 \cdot 10^4 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, что позволило определять вплоть до 10^{-7} моль/л этого вещества ($l = 5 \text{ см}$). 18-МФК может быть успешно применен для определения суммы полифенольных соединений в растительных объектах. Сравнение результатов анализа, полученных при использовании предложенного реагента, хлорида алюминия и реактива Фолина-Чокальтеу, говорит о хорошей корреляции всех трёх методов. В ряде случаев, метод с использованием реактива Фолина-Чокальтеу дает завышенные результаты, поскольку при $\text{pH} 11.4$ на определение полифенолов мешающее влияние оказывают монофенолы, восстанавливающие сахара, фенольные кислоты, аминокислоты, протенины и т.п. В отличие от хлорида алюминия 18-МФК вступает в реакцию с большим числом представителей фенольных соединений, что позволяет более объективно оценить их наличие в широком круге объектов анализа.

Ключевые слова: гетерополикомплексы, 18-молибдодифосфат, реактив Фолина-Чокальтеу, ионы алюминия, полифенолы, кверцетин, спектрофотометрия

Полифенолы и их производные весьма широко распространены в природе и являются

практически обязательной составной частью растений. Поскольку высшие животные не могут

синтезировать ароматические соединения из алифатических, полифенолы поступают в их организм преимущественно вместе с растительной пищей. Одну из наиболее широко распространенных групп полифенолов представляют собой флавоноиды, которые являются производными бензо-γ-пирона и содержат несколько гидроксильных групп [1]. Флавоноиды оказывают комплексное благотворное действие на здоровье человека, включая защиту сердечно-сосудистой системы, проявляют антиканцерогенную, антиаллергическую и противовирусную активность, противовоспалительный и противовоспалительный эффект, предупреждают возникновение катаракты [2–4], поэтому их вводят в состав многих биологически активных добавок и некоторых лекарственных препаратов.

Среди природных флавоноидов особого внимания заслуживают кверцетин (рис. 1) и его производные – гликозиды [5], которые в значительных количествах входят в состав фруктов, овощей, масел, орехов и напитков (вино, чай, кофе и пиво).

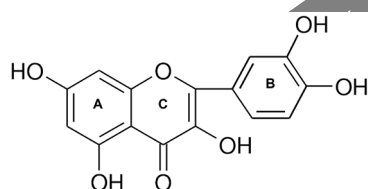


Рис. 1. Структура кверцетина

Основными методами выделения, идентификации и количественного определения фенольных соединений, являются высокоэффективная жидкостная хроматография [6, 7] и капиллярный электрофорез [8, 9]. В ряде случаев, при анализе простых по составу объектов, таких как фармацевтические препараты, используют более простые, экспрессные и не требующие сложных дорогих инструментов спектрофотометрические методики. Среди спектрофотометрических преобладают методики, основанные на собственном поглощении в ближней УФ и видимой области спектра [4, 10–14], использовании реактива Фолина-Дэнниса или Фолина-Чокальтеу [15–16], комплексных соединений с металлами – Sb(III) [17], Sn(II) [18], Al(III) [19–20], V(IV) [21]. Предложены также сорбционно-электрохимические методики [22–24].

Для определения суммы фенолов в широком круге объектов, в том числе в растительных продуктах и напитках, наиболее широко используемым является метод, основанный на окислении фенолов в щелочной среде реактивом Фолина-Дэнниса – разнотандемным молибдовольфрамным гетерополикомплексом структуры Доусона формулы $\text{Na}_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{W}_n\text{O}_{62}$ ($n = 4-5$) [15–16, 25–27]. Этот реагент часто

заменяют реактивом Фолина-Чокальтеу. Наличие сульфата лития в нем предотвращает возможное осаждение натриевых солей.

Недостатком реактива Фолина-Дэнниса (Чокальтеу) является его неизбирательное действие по отношению ко многим восстановителям, таким как аскорбиновая кислота, сероводород, SO_2 , ионы железа(II) или тиолы, аминокислоты, протеины, восстанавливающие сахара, низко-молекулярные монофенолы. Это способно привести к неправильной оценке содержания полифенолов, антиоксидантной активности, пищевой полезности и других комплексных показателей, рассчитываемых с использованием вышеприведенных реагентов.

Из других отрицательных сторон этой методики можно отметить высокий расход реагента, что приводит к большому объему сточных вод, недостаточно высокую скорость реакции, что снижает производительность анализа, образование нерастворимых веществ с компонентами анализируемого образца, нелинейность градуировочной функции, необходимость работать в сильнощелочной области.

В настоящей работе в качестве реагента для спектрофотометрического определения кверцетина и суммы полифенолов предложен 18-молибдодифосфорный гетерополикомплекс структуры Доусона (18-МФК). Основная цель работы заключалась в изучении условий протекания окислительно-восстановительной реакции между 18-МФК и разработке методик спектрофотометрического определения кверцетина и суммы полифенолов.

Экспериментальная часть

Материалы и методики исследований

Использовали следующие реактивы: NaOH «ч.д.а.», H_2SO_4 «ос.ч.», Na_2CO_3 «ч.д.а.», CH_3COONa «ч.д.а.», AlCl_3 «ч.д.а.», кверцетин (ч.д.а.), 96% этиловый спирт. Готовили 20% раствор Na_2CO_3 , 1 моль/л CH_3COONa , 10% водно-спиртовой раствор AlCl_3 . Раствор 18-МФК с концентрацией $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л готовили растворением соли $(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62} \cdot 14\text{H}_2\text{O}$, синтезированной по методике [27] в дистиллированной воде. Синтезировали реактив Фолина-Чокальтеу по методике [16]. Исходный раствор кверцетина с концентрацией 10^{-3} моль/л готовили растворением навески 30.2 мг в 10 мл 96% этилового спирта при нагревании (50–60 °C). Для приготовления фосфатного буферного раствора (pH 7.4) в колбу на 1000 мл вносили 71 мл 0.067 М раствора KH_2PO_4 и доводили до метки раствором 0.067 М Na_2HPO_4 [28].

В качестве объектов анализа использовали лекарственные препараты: «Квертин» (Борщаговский ХФЗ), в состав которого входит кверцетин 40 мг/табл. и вспомогательные веще-

ства (пектин, глюкозы моногидрат, сахароза, ароматизатор апельсиновый, магния стеарат, тальк), «Ascorutin tablet» (Slovak republic) и препараты на основе растительного сырья: «Настойка боярышника» (Виола), «Календула настойка» (Виола), «Софора японская настойка» (Виола), «Солодки корня сироп» (Луганский ФЗ), экстракт «Ротокана», содержащий смесь жидких экстрактов ромашки, календулы и тысячелистника, а также вспомогательные вещества, «Кратал» (Борщаговский ХФЗ), в состав которого входят таурин, смесь сухих экстрактов боярышника и пустырника, «Гинкофар» (БИОФАРМА) в качестве основы содержащий сухой экстракт гинкго билобы, «Микстура от кашля дет.» (Тернофарм), содержащая смесь сухого экстракта корня алтея и корня солодки, «Фламин таб 0,05 г» (Здоровье), содержащий концентрат бессмертника песчаного, спиртовую вытяжку чая зелёного «Кволити». В круглых скобках указана фирма-производитель.

Спектры поглощения в УФ и видимой областях измеряли при помощи спектрофотометра СФ-26. рН измеряли на иономере ЭВ-74 с использованием индикаторного стеклянного электрода и хлорид-серебряного как электрода сравнения.

Определение кверцетина или общего содержания полифенолов с использованием 18-МФК. В мерную колбу на 25 мл вносят аликвоту исследуемого раствора, 1,25 мл 10^{-3} моль/л 18-МФК, 5 мл фосфатного буферного раствора с рН 7.4, доводят объём дистиллированной водой до метки. Измеряют оптическую плотность через 15 мин при 820 нм.

Определение кверцетина с использованием хлорида алюминия. В пробирке смешивают исследуемый раствор, 0.2 мл 10% AlCl_3 , 0.2 мл 1 моль/л ацетатного буферного раствора (рН 4.3), доводят объём до 10 мл. Оптическую плотность измеряют через 30 мин при 430 нм.

Определение кверцетина с помощью реактива Фолина-Чокальтеу. В колбе на 25 мл смешивают исследуемый раствор, 0.3 мл реактива Фолина-Чокальтеу, 3 мл 20% Na_2CO_3 , доводят объём до метки. Светопоглощение растворов измеряют через 15 мин при 720 нм.

Извлечение полифенолов из чая. На аналитических весах взвешивают 0.25 г чая, предварительно растёртого в ступке. Навеску чая переносят в колбу, заливают 25 мл спирта и кипятят на водяной бане с обратным холодильником в течение 2 часов. После раствор фильтруют на воронке Бюхнера и доводят объём спиртом до 25 мл.

Результаты исследований и их обсуждение

Реакция 18-МФК с кверцетином, как и со многими другими фенолами, в определенной области рН сопровождается появлением интенсивно синей окраски, свойственной гетерополисиням (ГПС).

Флавоноиды обладают отчетливо выраженными восстановительными свойствами. Одним из наиболее склонных к окислению флавоноидов является кверцетин. Процесс окисления этого вещества является сложным и многостадийным. При электрохимическом окислении на вольтамперограмме наблюдаются 3 [29–30] или 4 [1] волны (пики), первая из которых при потенциале примерно +0.15 В соответствует двухэлектронному квазиобратимому окислению двух ОН групп в кольце В, который сопровождается отщеплением двух протонов. Интерпретация остальных окислительных процессов является пока неоднозначной. Ранее их связывали с окислением ОН группы в положении 3 кольца С и двух гидроксильных групп в кольце В, но в последнее время было показано, что генерируемый в результате первого процесса окисления орто-хинон является неустойчивым и легко таутомеризуется и превращается с образованием нескольких продуктов, в которых сохраняются в кольце В гидроксильные группы, способные к дальнейшему окислению [29]. Среди продуктов окислительного разложения идентифицированы ди- и триоксибензойные кислоты [31].

Скорость окисления кверцетина 18-МФК зависит от кислотности раствора и концентрации реагента (рис. 2).

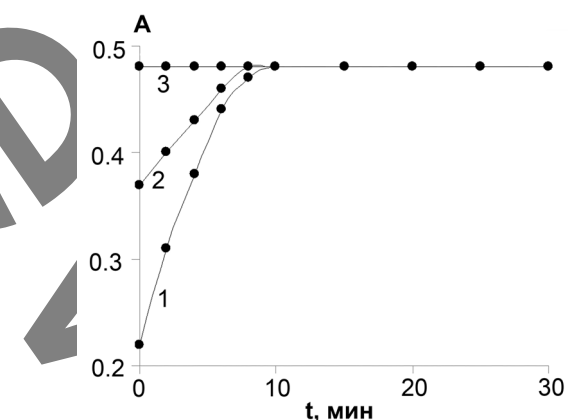


Рис. 2. Зависимость оптической плотности растворов от времени в реакции кверцетина с 18-МФК (1, 3) и реактивом Фолина-Чокальтеу (2). 1 – $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{Кв}} = 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см; 2 – $C_{\text{Кв}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см; 3 – $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, $C_{\text{Кв}} = 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см.

При концентрации 18-МФК $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л окраска раствора развивается в течение 10 минут, а затем остаётся постоянной длительное время. При увеличении концентрации 18-МФК до 0.01 моль/л процесс восстановления сильно ускоряется и занимает намного меньше минуты.

Основным фактором, определяющим характер взаимодействия 18-МФК и кверцетина,

является кислотность раствора [32]. Образование окрашенных продуктов становится заметным при pH выше 5.5. Оптимальным можно считать интервал pH от 7 до 9, где наблюдается количественное образование ГПС (рис. 3), в отличие от реактива Фолина-Чокальтеу, для которого рекомендуется pH 11.4.

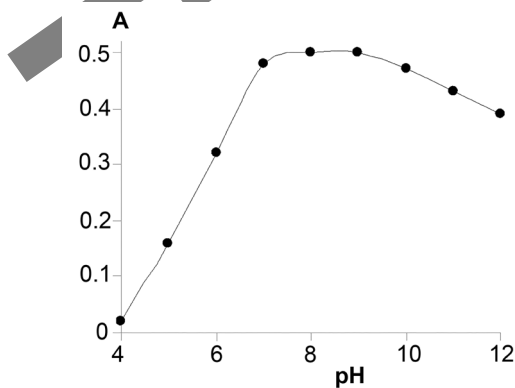


Рис. 3. Влияние pH раствора на образование 18-МФС при взаимодействии кверцетина с 18-МФК. $C_{18-МФК} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{КВ} = 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см.

Различие в поведении обеих систем можно объяснить, во-первых, более высокой устойчивостью разнолигандного молибдовольфрамowego комплекса по сравнению с молибденовым [33]. Кроме того, в случае реактива Фолина-Чокальтеу используется очень высокая концентрация реагента, что не всегда оправдано. В качестве рабочего нами был выбран pH 7.4, при котором гарантируется полнота окисления кверцетина и реакция является более селективной по отношению к флавоноидам.

Первым устойчивым продуктом реакции 18-МФК с восстановителями является двухэлектронная ГПС 18-МФС-2 [24]. Образование 18-МФС-2 подтверждается также характерным спектром поглощения, в котором присутствует полоса с максимумом при 820 нм (рис. 4).

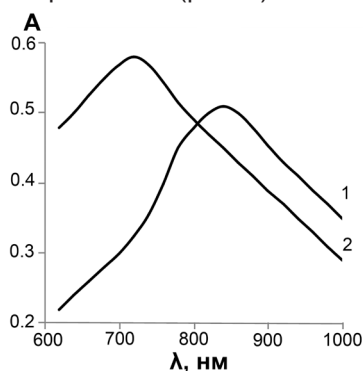


Рис. 4. Спектры поглощения гетерополисиней, полученных при восстановлении 18-МФК кверцетином (1) и реактивом Фолина-Чокальтеу (2). 1— $C_{КВ} = 10^{-5}$ моль/л, pH=7.4, $l = 1$ см; 2— $C_{КВ} = 10^{-5}$ моль/л, pH = 11.4, $l = 2$ см.

Точка перегиба на кривой молярных отношений при насыщении кверцетином соответствует соотношению кверцетин: 18-МФК = 1 : 5 (рис. 5). Таким образом, в реакции окисления молекулы кверцетина участвует 10 электронов. Молярный коэффициент поглощения для кверцетина составляет $5.5 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$, а для 18-МФС-2 — $1.15 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$ при 820 нм [24]. Отношение этих величин подтверждает, что в окислении 1 моля кверцетина принимает участие примерно 5 моль 18-МФК. Наличие четкой точки перегиба на кривой насыщения кверцетина 18-МФК (рис. 5б) при соотношении 18-МФК : кверцетин = 5 : 1 является еще одним доказательством предложенной стехиометрии взаимодействия.

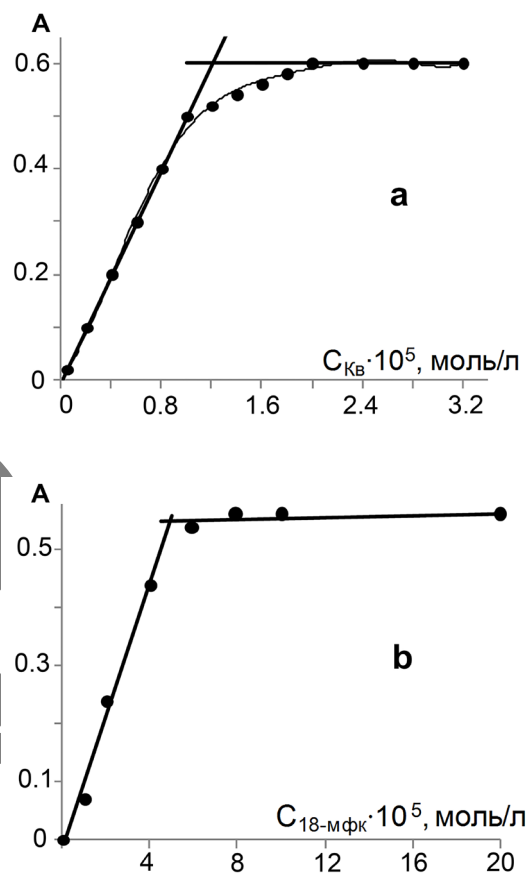


Рис. 5. Кривые метода молярных отношений в системе кверцетин – 18-МФК при насыщении кверцетином (а) или 18-МФК (б). (а)— $C_{18-МФК} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, pH=7.4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см; (б)— $C_{КВ} = 10^{-5}$ моль/л, pH = 7.4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см.

Приведенные кривые насыщения свидетельствуют о том, что для полного окисления кверцетина достаточно использовать небольшой избыток реагента. Как и с другими фенолами [32, 35], реакция проходит быстро, в мягких условиях (pH 5-8) и не требует создания высокой концентрации реагента. Это связано с тем, что 18-МФК является более сильным окислителем, чем реактив Фолина-Чокальтеу.

В оптимальных условиях были построены градуировочные зависимости для определения кверцетина предложенной реакцией с 18-МФК (рис. 6). При использовании кюветы на 1 см градуировочный график линейен в интервале концентраций кверцетина от $5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. и описывается уравнением $A = 5.47 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$ ($R^2 = 0.9986$). С целью расширения интервала определяемых концентраций и определения максимальной возможной чувствительности также был построен градуировочный график с использованием кюветы с $l = 5$ см. Уравнение градуировочного графика для этого случая $A = (3.21 \pm 0.13) \cdot C_{\text{кв}} \cdot 10^5$ ($R^2 = 0.9976$). Интервал определяемых концентраций кверцетина составил $1 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, а предел обнаружения, рассчитанный по формуле $3S_a/\text{tg}\alpha - 5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

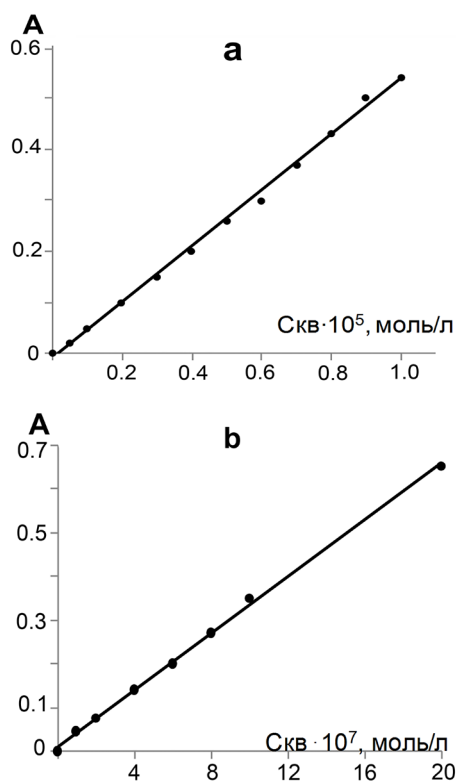


Рис. 6. Градуировочные графики для определения кверцетина с использованием 18-МФК. $\lambda = 820$ нм, pH = 7.4, $c_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $l = 1$ см (а); $l = 5$ см (б).

Интервал линейности градуировочных зависимостей с использованием реакций кверцетина с AlCl_3 и реактивом Фолина-Чокальтеу существенно уже (рис. 7). В случае AlCl_3 градуировочный график описывается уравнением $A = 1.8 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$ ($R^2 = 0.9966$) для интервала концентраций кверцетина $2 \cdot 10^{-6} - 2.2 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Для реактива Фолина-Чокальтеу эти параметры градуировочного графика составляют, соответственно, $2 \cdot 10^{-6} - 1.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л и $A = 3.85 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$ ($R^2 = 0.996$).

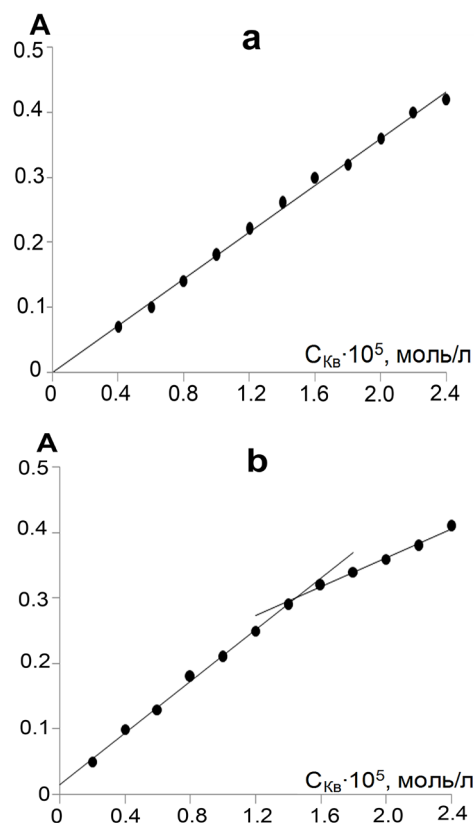


Рис. 7. Градуировочные графики для определения кверцетина с использованием AlCl_3 (а) и реактива Фолина-Чокальтеу (б). (а) – $\lambda = 430$ нм, pH = 4.3, $l = 0.5$ см; (б) – $\lambda = 720$ нм, pH = 11.4, $l = 0.5$ см.

Разработанная методика была апробирована при определении кверцетина в таблетках «Квертин». В результатах анализа, представленных в таблице 2, отсутствует систематическая погрешность. Во-первых, содержание кверцетина, определенное предложенной методикой и двумя стандартными методиками значительно не отличается, поскольку доверительные интервалы средних арифметических для всех трех методик перекрываются, а, во-вторых, содержание кверцетина, гарантированное производителем (40 мг/табл), во всех трех случаях попадает в доверительный интервал среднего арифметического. Все методики характеризуются высокой воспроизводимостью (1-2 %).

Таблица 2. Результаты определения кверцетина в таблетках «Квертин». $n = 6$, $P = 0.95$

Реагент	$C_{\text{кв}}^{\text{ср}} \pm \Delta (S_r)$
18-МФК	$40.3 \pm 1.4 (0.013)$
AlCl_3	$38.2 \pm 1.9 (0.019)$
Реактив Фолина-Чокальтеу	$41.0 \pm 1.9 (0.019)$

Кверцетин является одним из стандартных веществ, используемых для оценки общего содержания флавоноидов или фенолов. В данной работе мы попытались показать возможность использования 18-МФК для определения этих интегральных показателей. Известно, что препараты на основе растительного сырья содержат как одну из основных составных частей полифенолы, обуславливающие их полезные антиоксидантные и другие свойства.

На рис. 8а представлена корреляционная зависимость между результатами определения полифенолов в ряде растительных образцов, в которых преобладают флавоноиды, с использованием 18-МФК и $AlCl_3$.

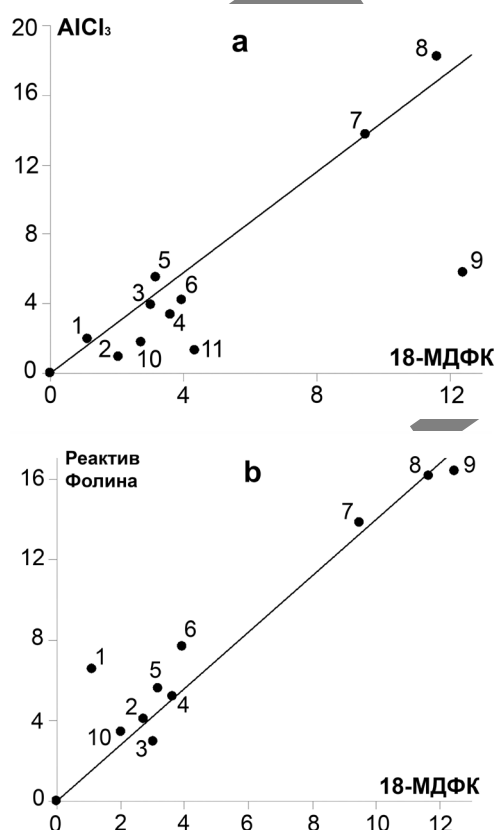


Рис. 8. Корреляция содержания полифенолов в препаратах на основе растительного сырья при пересчете на кверцетин с использованием различных реагентов. (а) – хлорид алюминия и 18-МФК; (б) – реактив Фолина-Чокальтеу и 18-МФК. На графике точками обозначены анализируемые объекты: 1. «Микстура от кашля» (мг/г порошка); 2. «Настойка боярышника» (мг/10 мл); 3. Ротокан (мг/мл); 4. «Календула настойка» (мг/10 мл); 5. «Солодка корень, сироп» (мг/10 мл); 6. «Софора японская» (мг/мл); 7. «Гинкофар» (мг/табл); 8. «Фламино0,05г» (мг/табл); 9. «Кратал» (мг/табл); 10. Чай зеленый «Кволити» (г/100г сухого вещества); 11. «Ascorutin» (мг/табл). В скобках приведены использованные единицы измерения содержания полифенолов в пересчете на кверцетин.

За исключением нескольких случаев (точки 9, 10, 11) эта зависимость характеризуется высоким коэффициентом корреляции 0.953. Столь высокую степень корреляции результатов двух методик мы связываем с тем, что в обоих случаях молярные коэффициенты для большой группы полифенолов являются в среднем достаточно близкими величинами, что приводит к близким, в пересчете на кверцетин, результатам определения.

Используя литературные [16, 20] и наши экспериментальные данные, мы оценили реакционную способность групп веществ, содержащихся в растительных лекарственных препаратах, по отношению к 18-МФК (табл. 3), $AlCl_3$ и реактиву Фолина-Чокальтеу. При этом преимущественно принимали во внимание вещества, проявляющие восстановительные свойства.

Наиболее избирательным реагентом среди представленных является хлорид алюминия, который образует окрашенные комплексы с такими хромофорными группами полифенолов, которые имеют в своём составе оксихинонную и/или орто-диокси группы [20]. К таким соединениям относятся флавоноиды, часто преобладающие в составе лекарственных растительных препаратов.

В то же время, наличие в препаратах 2, 4 и 6 фенольных кислот, аскорбиновой кислоты, дубильных веществ или некоторых других групп полифенолов является возможной причиной расхождения результатов, учитывая, что хлорид алюминия не реагирует или обладает низкой реакционной способностью по отношению к указанным веществам. Очевидной причиной критически больших отличий в результатах определения двумя методами в случае препарата «Кратал» является наличие в нем большой доли фенольных кислот и дубильных веществ, для препарата «Аскорутин» – аскорбиновой кислоты, для чаёв – преобладание в них танинов. В последнем случае алюминий(III) образует с танинами бесцветные комплексы, максимум поглощения которых находится в УФ-области. Принимая во внимание то, что измерения проводили при длине волны 430 нм, вклад танинов не учитывается.

Данные, представленные на рис. 8б, свидетельствуют о том, что содержание фенолов в пересчете на кверцетин, определенное предложенным реактивом и Фолина-Чокальтеу, в основном хорошо коррелирует. Коэффициент корреляции составляет 0.969. Таким образом, химизм взаимодействия (стехиометрия и полнота протекания реакции, усредненное значение молярного коэффициента) примерно одинаков для обеих реакций и предложенный реагент может быть в большинстве случаев использован вместо реактива Фолина-Чокальтеу. Приблизительно полуторакратная разница в содержании фенолов в пересчете на кверцетин объясняется тем, что

18-МФК более глубоко окисляет кверцетин, а молярный коэффициент при использовании реактива Фолина-Чокальтеу меньше и составляет 3.85×10^4 моль⁻¹ л см⁻¹.

Из литературных и наших экспериментальных данных следует, что в реакции с рутином, морином, галловой кислотой, эпинефрином, кофеиновой кислотой молярные коэффициенты для обоих реагентов близки. Реакция 18-МФК с большинством изученных полифенолов отличалась высокой скоростью. Исключением из этой закономерности является взаимодействие с таннинами и катехинами, которое заканчивается при pH 7.4 в течение 1-1,5 часов. В этом случае нами рекомендовано проводить реакцию при pH 9.4, при этом для полного развития окраски необходимо 15 мин.

Вместе с тем, нами показано, что реакция с 18-МФК с большинством монофенолов при pH 7.4 протекает в незначительной степени, в том числе с фенолом, тимолом, салициловой кислотой, галлотанином. Лишь некоторые наиболее реакционноспособные монофенолы, такие как п-аминофенол, способны к количественному взаимодействию в указанных условиях. Большая часть фенольных кислот не реагируют с 18-МФК, но такие соединения как кофеиновая или хлорогеновая кислоты, содержащие орто-диокси группу, окисляются предложенным реагентом.

Как и для реактива Фолина-Чокальтеу, реакция 18-МФК не избирательна для таких сильных восстановителей, как аскорбиновая кислота или тиолы. Но, в этом случае можно количественно оценить и учесть содержание данных веществ,

Таблица 3. Реакционная способность основных активных составляющих растительных препаратов по отношению к хлориду алюминия, 18-МФК, реактиву Фолина-Чокальтеу.

Растительный препарат	Биологически активные вещества	AlCl ₃	18-МФК	Реактив Фолина-Чокальтеу
«Софора японская настойка»	Восстанавливающие сахара	—	—	+/-
«Настойка боярышника»	Фенольные кислоты (хлорогеновая к-та)	—	+/-	+
	Флавоноиды (рутин)	+	+	+
	Аскорбиновая к-та	—	+	+
	Восстанавливающие сахара	—	—	+/-
«Микстура от кашля дет.»	Восстанавливающие сахара	—	—	+/-
	Флавоноиды (ликвиритин)	+	+	+
	Флавоноиды (кверцетин, лютеин, эпигенин)	+	+	+
	Дубильные вещества	—	+/-	+
«Ротокан»	Фенольные кислоты (кофейная, 4-гидроксiben-зойная, кумаровая кислоты)	—	+/-	+
	Аскорбиновая кислота	—	+	+
	Флавоноиды (рутин)	+	+	+
«Кратал»	Фенольные кислоты (кофейная кислота)	—	+/-	+
	Восстанавливающие сахара	—	—	+/-
	Дубильные вещества	—	+/-	+
«Гинкофар»	Флавоноиды (производные кверцетина, кемферола, изорамнетина)	+	+	+
«Фламин таб 0,05 г»	Флавоноиды (производные кверцетина, кемферола, апигенина)	+	+	+
«Календулы настойка»	Флавоноиды (рутин, изорамнетин)	+	+	+
	Дубильные вещества	—	+/-	+
	Аскорбиновая кислота	—	+	+
«Солодки корня сироп»	Флавоноиды (ликвиритин)	+	+	+
Чай зелёный «Кволити»	Флавоноиды (рутин)	+	+	+
	Дубильные вещества	—	+/-	+
	Фенольные кислоты (кофейная кислота)	—	+/-	+
	Катехины	—	+/-	+

Примечание. В скобках приведены представители данной группы полифенолов, которые преобладают в препарате на основе растительного сырья; «+» — вносит значимый вклад в результаты определения. «-» — не вносит значимого вклада в результаты определения. «+/-» — химическая реакция протекает не полностью или она замедлена во времени.

если провести их определение при pH 4.3-4.7, при которых в реакцию с 18-МФК вступают только указанные сильные восстановители.

Для нескольких образцов отличие в результатах существенно больше возможных расхождений из-за разницы в молярных коэффициентах или стехиометрии взаимодействия с восстановителями и может быть объяснено только различной реакционной способностью реагентов по отношению к тем или иным веществам. Для образца 1 (Микстура от кашля) и 6 (Софора) важным является наличие в них большого содержания восстанавливающих сахаров, которые способны частично окисляться реактивом Фолина-Чокальтеу.

Заключение

18-молибдодифосфорный гетерополикомплекс может быть успешно применен для определения содержания суммы полифенольных соединений и является полезной альтернативой существующим основным стандартным методикам определения содержания полифенолов. Его сфера использования включает оценку общего содержания фенолов в растительных препаратах, учитывая доминирование в них полифенольных соединений. Результаты анализа, полученные при использовании предложенного реагента и реактива Фолина-Чокальтеу, в основном хорошо коррелируют. В ряде случаев последний реактив дает завышенные результаты, учитывая, что при pH 11.4 многие вещества имеют более высокую восстановительную способность, включая монофенолы, восстанавливающие сахара, фенольные кислоты, аминокислоты, протеины и т.п. В отличие от других, предложенная методика позволяет дифференцировать группы веществ и отдельно определять при pH 4.3 более сильные восстановители, такие как аскорбиновая кислота или тиолы.

Литература

1. Brett A.M.O., Ghica M.-E. Electrochemical oxidation of quercetin. *Electroanalysis*. 2003, 15 (22), 1745-1750.
2. Тараховский Ю. С., Ким Ю. А., Абдралилов Б. С., Музафаров Е. Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Под ред. Е.И. Маевский. Пущино: Synchrobook, 2013. С. 310.
3. Растительные лекарственные средства. Под ред. Н.П. Максютин. Киев, 1985, С. 285.
4. Химический анализ лекарственных растений. Под редакцией Гринкевич Н.И., Сафронич Л. Н. Москва: Высшая школа, 1983. С. 176.
5. Biesaga M., Pyrzynska K. Analytical procedures for determination of quercetin and its glycosides in plant material. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 2009, 39, 95-107

В отличие от хлорида алюминия 18-МФК вступает в реакцию с большим числом представителей фенольных соединений, что позволяет более объективно оценить их наличие в широком круге объектов анализа. В то время как реакция 18-МФК с большинством полифенольных соединений приводит к образованию одного и того же окрашенного продукта, а вариации в стехиометрии реакции и молярном коэффициенте не столь велики, для реакции ионов алюминия(III), как и других металлов молярный коэффициент и особенно реакционная способность, положение полос поглощения сильно зависят от природы полифенола, что способно привести к более сильному различию полученных результатов и истинного содержания этих веществ.

Кроме более высокой избирательности по отношению к полифенолам, методика на основе 18-МФК имеет несколько других преимуществ. Она характеризуется более высокой чувствительностью. При определении кверцетина предел обнаружения находится на уровне 10^{-7} моль/л. Выгодной особенностью является намного более высокая скорость реакции. Для большинства полифенолов путем увеличения концентрации реагента можно найти условия, при которых окраска раствора будет развиваться в течение менее минуты. Простота и высокая скорость реакции особенно востребованы при создании автоматизированных методов, существенно повышая чувствительность и производительность. В методике используются на 1-2 порядка меньшие концентрации реагента, способного разлагаться с образованием токсичного молибдата, что позволяет снизить экологическую нагрузку и отвечает принципам «зеленой химии». Реакция проходит в мягких условиях, образование малорастворимых продуктов при использовании 18-МФК не отмечено.

6. Куркина А.В., Рыжов В.М., Авдеева Е.В. Перспективы использования высокоэффективной жидкостной хроматографии для стандартизации сырья и препаратов бессмертника песчаного. Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2011, 13 (1/8), 144-150.
7. Ходаков И.В. Способ идентификации полифенолов в растительных экстрактах при помощи ВЭЖХ. Определение состава изофлавонов сои. Методы и объекты хим. анализа. 2013, 8(3), 132-142.
8. Geng C. H., Lin M., Wang W. Y., Ye J. N.. Определение активных ингредиентов в боярышнике и его компонентах методом капиллярного электрофореза с электрохимическим детектированием. Журн. аналит. химии. 2008, 63(1), 455-462.
9. Ignat I., Volf I., Popa V.I. A critical review of

methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* 2011, 126, 1821-1835.

10. Hassan H.N.A., Barsoum B.N., Habib I.H.I. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a Kalman Filter approach. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999, 20, 315-320.

11. Giusti, M.M., Wrolstad R.E. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems. *Biochemical Engineering Journal.* 2003, 14(3), 217-225.

12. Зайцев В.М., Халаф В.А., Зайцева Г.М. Методи концентрування та визначення фенольних сполук. Методи і об'єкти хім. аналізу. 2008, 3(1), 4-21.

13. Коренман И.М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. Москва: Химия, 1975. С. 359.

14. Лобанова А.А., Будаева В.В., Сакович Г.В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья. *Химия растительного сырья.* 2004, 1, 47-52.

15. Box, J. D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res.* 1983, 17, 511-525.

16. Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidations substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in enzymology.* 1999, 299, 152-178.

17. Bhatia I.S., Singh J., Bajaj K.L. A sensitive colorimetric method for the microdetermination of flavonols. *Microchim. Acta.* 1974, 62(5), 909-913.

18. Sakamoto M., Takamura K. Consecutive determination of rutin and quercetin by spectrophotometric measurements. *Microchem. J.* 1978, 23, 374-381.

19. Dowd L.E. Spectrophotometric determination of quercetin. *Anal. Chem.* 1959, 31(7), 1184-1187.

20. Jurd L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation. *Phytochemistry.* 1969, 8, 445-462.

21. Kaushal G.P., Sekhon B.S., Bhatia I.S. Spectrophotometric determination of quercetin with VO^{2+} . *Microchim. Acta.* 1979, 71(5-6), 365-370.

22. Алимарин И.П., Дорохова Е.Н., Казанский И.В. и др. Реакции гетерополиокислот с основными красителями и их применение в анализе. *Журн. аналит. химии.* 1984, 34(6), 965-973.

23. Papaconstantinou E., Pope M.T. Heteropolyblues V. Electronic spectra one-to-six electron blues of 18-metaldiphosphate anions. *Inorg. Chem.* 1970, 9(3), 667-673.

24. Vishnikin A.B., Sklenarova H., Solich P., Petrushina G.A., Tsiganok L.P. Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system. *Anal. Lett.* 2011,

44(1-3), 514-527.

25. Качан И.А., Запорожец О.А., Зинько Л.С., Коваль А.А. Твердофазноспектрофотометрическое определение восстановителей в растворе по реакции образования «синей» гетерополиокислоты. Методы и объекты хим. анализа. 2006, 1(2), 127-131.

26. Спосіб визначення загального вмісту поліфенолів. Пат. № 101250. Україна. МПК G01N 21/63, C07C 39/00, C07C 39/12. Запорожець О.А., Бас Ю.П., Петрух М.В. – № а 2011 10127; заявлено 16.08.2011; надр. 27.02.2012; Бюл. № 4. – 6 с.

27. Alman M., Easton E.B. Selective determination of ascorbic acid with a novel hybrid material based 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid and the Dawson type ion $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ immobilized on glassy carbon. *Electrochim. Acta.* 2011, 56(7), 2847-2855.

28. Лурье Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. Москва: Химия, 1979, С. 278.

29. Timbola A.K., de Souza C.D., Giacomelli C., Spinelli A. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution. *J. Braz. Chem. Soc.* 2006, 17(1), 139-148.

30. Томсон Р.Х. Структура и реакционная способность фенольных соединений. Биохимия фенольных соединений. Под ред. Дж. Харборна. Москва, 1968. С.233.

31. Ramešová Š., Sokolová R., Degano I., Bulířková J., Žabka J., Gál M. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012, 402, 975-982.

32. Bulatov A.V., Petrova A.V., Vishnikin A.B., Moskvina A.L., Moskvina L.N. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine. *Talanta.* 2012, 96, 62-67.

33. Цыганок Л.П. Особенности реакций образования и восстановления гетерополикомплексов элементов III-A группы Периодической системы. Л.П. Цыганок, А.Б. Вишникин. Днепропетровск: ДГУ, 1996. С.202.

34. Vishnikin A.B., Al-Shwaiyat M.K.E.A., Petrushina G.A., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Ya.R., Sklenarova H., Solich P. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect. *Talanta.* 2012, 96, 230-235.

35. Vishnikin A.B., Al-Shwaiyat M.K.E.A., Petrushina G.A., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Ya.R., Sklenarova H., Solich P. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect. *Talanta.* 2012, 96, 230-235.