

Luminescent Determination of α -Bitter Acids in Hops

S.V. Beltyukova¹, Ie.V. Cherednychenko^{1*}, O.I. Teslyuk²

¹ Odessa National Academy of Food Technologies, Kanatnaya st., 112, Odessa, Ukraine, 65039;

*e-mail: okorochocho@gmail.com

² Bogatskii Physicochemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, Lyustdorfskaya dor. 86, Odessa, Ukraine, 65080

Received: July 02, 2015; Accepted: September 12, 2015

Luminescent properties of the Tb(III) complex with α -bitter hop acids are studied. Dependence of intensity of a luminescence of a complex on concentration of terbium, α -bitter acids, acidity is investigated. It is shown that effective transfer of energy of excitation from ligands to a lanthanide ion takes place in a complex, this causes an intensive luminescence. Influence of solvents on intensity of a luminescence of a complex is studied. It is established that optimal I_{lum} is found in the presence of a dimethyl sulfoxide and in aqueous-alcoholic mediums. It is established that surface-active substances (cetyltrimethylammonium chloride, cetylpyridinium chloride, sodium dodecyl sulfate, triton X-100, tween-80), and also donor-active agents (1,10-phenanthroline, 2,2'-dipyridyl, triphenylphosphine oxide, trioctylphosphine oxide, β -cyclodextrin) don't influence intensity of the luminescence of a complex, or reduce it. Possibility of direct luminescent determination of α -bitter hop acids in hop extracts on a sensitized luminescence of an ion of Tb(III) is shown. The detection limit of α -bitter acids in extracts of hop makes 0.003 mg/ml.

Keywords: α -bitter acids of hops, sensitized luminescence of Tb(III) ion

Люминесцентное определение α -горьких кислот в хмеле

С.В. Бельтюкова¹, Е.В. Чередниченко^{1*}, О.И. Теслюк²

¹ Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, Украина, 65039;

*e-mail: okorochocho@gmail.com

² Физико-химический институт им. А.В.Богатского НАН Украины, Люстдорфская дорога, 86, Одесса, Украина, 65080

Поступила: 02 июля 2015 г; Принята: 12 сентября 2015 г

Изучены люминесцентные свойства комплекса Tb(III) с α -горькими кислотами хмеля. Исследована зависимость интенсивности люминесценции комплекса от концентрации тербия, α -горьких кислот, кислотности среды. Установлено, что в комплексе осуществляется эффективный перенос энергии возбуждения от лигандов к иону лантанида, что обуславливает интенсивную люминесценцию последнего. Изучено влияние растворителей на интенсивность люминесценции комплекса. Установлено, что оптимальная I_{lum} обнаруживается в присутствии диметилсульфоксида и в водно-спиртовых средах. Установлено, что поверхностно-активные вещества (цетилтриметиламмоний хлорид, цетилпиридиний хлорид, додецилсульфат натрия, тритон X-100, твин-80), а также донорно-активные вещества (1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил, трифенилфосфиноксид, триоктилфосфиноксид, β -циклодекстрин) не влияют на интенсивность люминесценции комплекса, либо уменьшают её. Показана возможность прямого люминесцентного определения α -горьких кислот хмеля в его экстрактах по сенсibilизированной люминесценции иона Tb(III). Предел обнаружения α -горьких кислот в экстрактах хмеля составляет 0.003 мкг/мл.

Ключевые слова: α -горькие кислоты хмеля, сенсibilизированная люминесценция иона Tb(III)

Хмель обыкновенный (*Humulus lupulus* сем. Cannabaceae) – двудомное многолетнее растение, содержит большой комплекс биологически активных веществ (БАВ), широко применяется в народной и научной медицине, используется в пищевой и пивоваренной промышленности, в пекарном производстве, в фармацевтической промышленности, в производстве биологически активных добавок к пище [1].

Шишки хмеля обыкновенного богаты БАВ, такими как эфирные масла (более 100 компонентов), горькие гликозиды, фитогормоны, органические кислоты, флавоноиды, витамины группы В, РР, С, токоферол, аминокислоты, кумарины, дубильные и пектиновые вещества, алкалоиды. Хмель входит в состав ряда известных препаратов и многих биологически активных добавок (БАД) к пище. Препараты хмеля оказывают

седативное, нейрогенное, противовоспалительное, противоязвенное, капиллярорасширяющее, антиоксидантное, болеутоляющее, снотворное действие [1].

Важнейшей характеристикой хмеля в пивоварении является наличие в нем α - и β -горьких кислот, содержание которых является сортовой особенностью хмеля и зависит от места и условий выращивания. Количественное содержание суммы горьких кислот определяют неводным титрованием экстракта хмеля 0.01 М раствором гидроксида калия [2]. Количественное содержание α -горьких кислот определяют кондуктометрическим методом, основанном на измерении электропроводности анализируемого раствора в процессе титрования раствором уксуснокислого свинца [3]. Метод достаточно точен, но сложен в исполнении и требует специального оборудования.

В настоящей работе представлены результаты исследования по разработке методики люминесцентного определения α -горьких кислот (α -ГК) в хмеле с использованием люминесценции иона Tb(III).

Экспериментальная часть

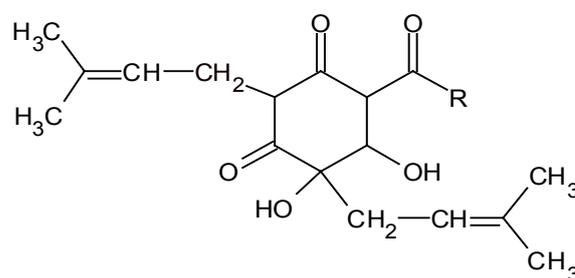
Хлориды Eu(III) и Tb(III) готовили растворением их высокочистых оксидов (99.998%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию устанавливали комплексометрическим титрованием. Точные навески растворяли в бидистиллированной воде. Раствор 1,10-фенантролина готовили растворением точной навески (до четвертого знака после запятой) вещества в бидистиллированной воде с подкислением соляной кислотой до pH 5. Растворы других донорно-активных веществ готовили растворением их точных навесок в этаноле (2,2'-дипиридила, трифенилфосфиноксида (ТФФО), триоктилфосфиноксида (ТОФО), β -циклодекстрина). α -Горькие кислоты экстрагировали из размолотого хмеля (3.75 г) смесью растворителей гексана и этилового спирта в соотношении 9:1 (22.5 мл гексана и 2.5 мл этанола) в течение 5 мин. Полученный экстракт фильтровали через складчатый бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 50 см³, остаток на фильтре несколько раз промывали той же смесью растворителей и доводили содержимое колбы до метки смесью растворителей. Перед анализом экстракт разбавляли в 10 раз этанолом.

Спектры люминесценции ионов Eu(III) и Tb(III) регистрировали в области 560-650 и 450-650 нм с помощью спектрометра Cary Eclipse Varian (Австралия) с двойным источником света (ксеноновая лампа 150-W сплошного спектра и импульсная лампа). Значения энергии триплетных уровней α -горьких кислот определяли регистрацией спектров фосфоресценции их комплексов с

иттрием при 77 К. Для изучения кинетики затухания люминесценции применяли осциллографическую регистрацию. Люминесценцию возбуждали при этом импульсным азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм. Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC Shimadzu (Япония). Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра OP-211/1 Radelkis (Венгрия) со стеклянным электродом. Необходимое значение pH создавали в растворе с помощью уротропина.

Обсуждение результатов

α -Горькие кислоты представляют собой смесь производных, главной составной частью которых является гумулон ($R = -CH_2 - CH(CH_3)_2$):



Остальные аналоги (когумулон, адгумулон, постгумулон) имеют в боковой цепи различные заместители (R) [4].

α -Горькие кислоты содержат дикарбонильный фрагмент и подобно β -дикетонам, очевидно, проявляют в растворах кето-енольную таутомерию и могут образовывать сионамид двух- и трехзарядных катионов прочные комплексные соединения. Эта группа лигандов вызывает определенный интерес благодаря наличию в их структуре подвижной π -электронной системы, сопряженной с хелатным циклом, что может благоприятствовать появлению сенсibilизированной люминесценции лантанидов.

Спектр поглощения раствора α -горьких кислот характеризуется наличием в УФ-области интенсивной полосы поглощения с максимумом при $\lambda = 275$ нм, что обуславливает эффективное поглощение световой энергии лигандами. Энергия триплетного уровня лигандов (20500 см⁻¹), найденная из спектра фосфоресценции, равна или выше энергии возбужденных уровней ионов Eu(III) (17300 см⁻¹) и Tb(III) (20500 см⁻¹), что делает возможным эффективное поглощение и последующий перенос энергии возбуждения от лигандов на резонансные уровни этих ионов. В присутствии α -ГК указанные ионы проявляют интенсивную люминесценцию.

Наиболее интенсивная люминесценция наблюдается для иона Tb(III). Резонансный уровень иона Tb(III) расположен ближе к триплетному уровню лигандов, поэтому в процессе передачи энергии возбуждения от лигандов к иону лантанида

снижается степень безызлучательных потерь. В случае Eu(III) интенсивность люминесценции значительно слабее. Вероятно, в этом случае происходит передача энергии возбуждения на энергетический уровень Eu(III) 5D_1 (19000 см^{-1}) с последующей безызлучательной дезактивацией до первого возбужденного состояния 5D_0 (17300 см^{-1}), что приводит к значительным потерям энергии возбуждения.

В спектре люминесценции водно-этанольных растворов комплексов иона Tb(III) наиболее интенсивной является полоса, соответствующая его сверхчувствительному переходу (СЧП) $^5D_0 \rightarrow ^7F_5$ ($\lambda = 545$ нм), значительно слабее по интенсивности полосы с максимумами при 490, 586 и 620 нм (переходы с уровня 5D_4 на подуровни 7F_6 , 7F_4 и 7F_3 соответственно) (рис. 1).

Увеличение $I_{\text{люм.}}$ Tb(III) в присутствии α -ГК на несколько порядков величины является косвенным подтверждением образования комплексных соединений. Подтверждением комплексообразования является и тот факт, что в присутствии α -ГК время жизни возбужденного состояния иона Tb(III) значительно возрастает ($\tau_{\text{компл.}} = 840$ μs) по сравнению со временем жизни аква-иона тербия ($\tau = 420$ μs).

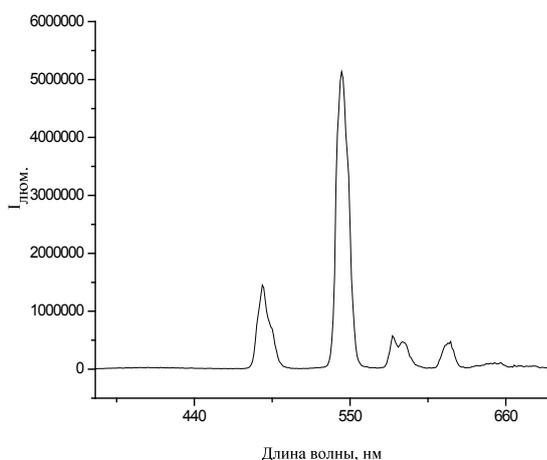


Рис. 1. Спектр люминесценции иона Tb(III) в комплексе с α -горькими кислотами ($C_{\text{Tb}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Образование комплексов подтверждено также с использованием спектра погашения иона Nd(III), его сверхчувствительного перехода (СЧП) $^4I_{9/2} \rightarrow ^2,4G_{7/2, 5/2}$ ($\lambda = 575$ нм). В присутствии α -ГК интенсивность СЧП возрастает, что может служить подтверждением комплексообразования в системе α -ГК-Nd(III).

Комплексообразование иона Tb(III) с α -ГК наблюдается в широком интервале значений pH 3.0–9.0, с максимумом люминесценции при pH 5.8–6.1 (рис. 2), которое устанавливали с помощью уротропина. При pH < 3.0 степень образования комплекса, очевидно, резко снижается, а при

pH > 9.0, вероятно, происходит разрушение комплексов с образованием гидроксидов лантанида.

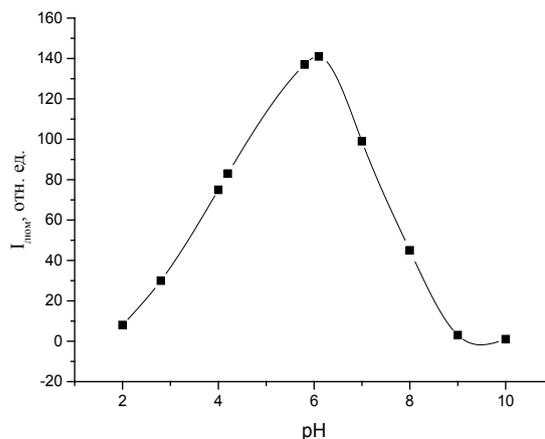


Рис. 2. Зависимость $I_{\text{люм.}}$ иона Tb(III) в комплексе с α -горькими кислотами от pH раствора ($\lambda_{\text{изл. Tb}} = 545$ нм; $C_{\text{Tb}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Интенсивность люминесценции комплексов зависит от природы растворителей (рис. 3). Практически все растворители, за исключением ацетона, увеличивают $I_{\text{люм.}}$ иона Tb(III). Механизм влияния растворителя на спектрально-люминесцентные характеристики комплекса очень сложен. Растворитель влияет на химизм реакции, устойчивость комплекса, кислотно-основное равновесие лигандов, пересольватацию иона металла и его комплексных форм в растворе [5]. Можно предположить, что в данном случае увеличение $I_{\text{люм.}}$ иона лантанида в присутствии растворителей связано с вытеснением молекул воды из внешней, а затем и из внутренней координационной сферы комплекса, что уменьшает процессы дезактивации энергии возбуждения [6].

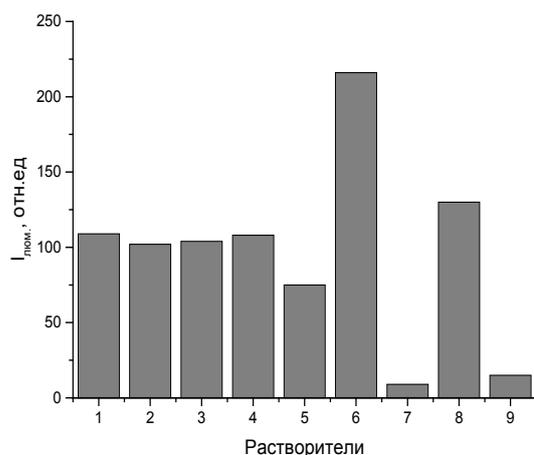


Рис. 3. Влияние растворителей на $I_{\text{люм.}}$ иона Tb(III) в комплексе с α -ГК: 1 – метанол; 2 – этанол; 3 – изопропанол; 4 – ацетонитрил; 5 – этилцетат; 6 – ДМСО; 7 – ацетон; 8 – ДМФА; 9 – вода; ($C_{\text{Tb}} = 1 \cdot 10^{-4}$ моль/л).

Как видно из рис. 3, наибольшая $I_{\text{люм. Tb}}$ наблюдается в диметилсульфоксиде, однако для разработки методики определения был выбран более доступный и дешевый растворитель этанол. $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ зависит от количества этанола в растворе (рис. 4).

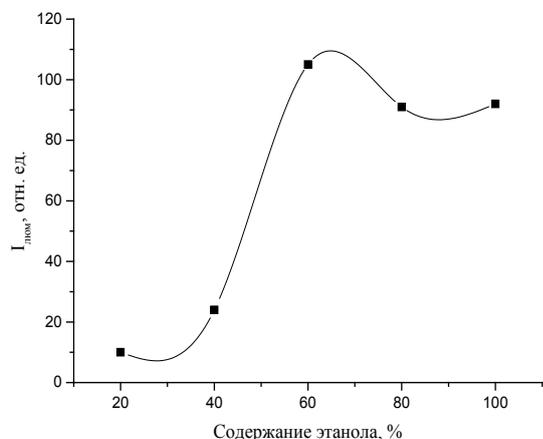


Рис. 4. Зависимость $I_{\text{люм}}$ иона Tb(III) в комплексе с α -горькими кислотами от содержания этанола ($\lambda_{\text{изл. Tb}} = 545 \text{ нм}$; $C_{\text{Tb}} = 1 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$).

Оптимальное количество этанола составляет 60%. $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ в растворе оптимальна при содержании ионов Tb(III) $1 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$ (рис. 5).

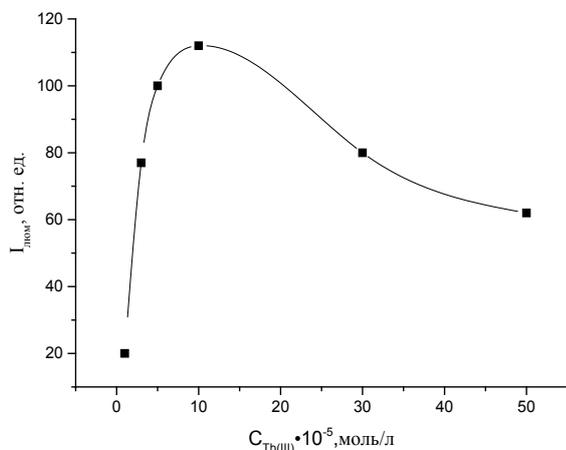


Рис. 5. Зависимость $I_{\text{люм}}$ иона Tb(III) в комплексе с α -горькими кислотами от концентрации Tb(III) ($\lambda_{\text{изл. Tb}} = 545 \text{ нм}$).

Установлено, что поверхностно-активные вещества (цетилтриметиламмоний хлорид, цетилпиридиний хлорид, додецилсульфат натрия, тритон X-100, твин-80), а также донорно-активные вещества (1,10-фенантролин, 2,2'-дипиридил, ТОФО, ТФФО, β -циклодекстрин) в концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ – $1 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ не влияют на интенсивность люминесценции комплексов, либо уменьшают её.

При оптимальных условиях комплексообразования $I_{\text{люм. Tb(III)}}$ достигает максимума через 2-3 минуты после сливания растворов и остается постоянной в течение 3-х

часов. Интенсивность люминесценции Tb(III) в комплексе с α -ГК пропорциональна содержанию α -ГК в растворе в интервале концентраций 0.01–1 мкг/мл. Предел обнаружения α -ГК составляет 0.003 мкг/мл.

Достаточно широкий интервал линейной зависимости $I_{\text{люм.}}$ от концентрации α -ГК позволяет использовать метод добавок.

Методика определения

Определение α -ГК проводили в образцах хмеля гранулированного. В три пробирки помещают по 0.1 мл разбавленного анализируемого экстракта хмеля, в две из них добавляют стандартный раствор α -горьких кислот в таком количестве, чтобы $I_{\text{люм.}}$ пробы выросла в 2 и 3-4 раза соответственно. Затем во все три пробирки добавляют по 0.1 мл раствора хлорида тербия $1 \cdot 10^{-2} \text{ моль/л}$, 0.2 мл раствора уротропина 40%-го, 3 мл этанола и дистиллированную воду до 5 мл. Интенсивность люминесценции иона Tb(III) измеряют при $\lambda = 545 \text{ нм}$ ($\lambda_{\text{возб.}} = 365 \text{ нм}$). Параллельно готовят раствор контрольной пробы, которая содержит все компоненты, кроме α -горьких кислот.

Содержание α -горьких кислот рассчитывают по формуле:

$$C_x = \frac{I_x}{I_x + ad. - I_x} \cdot C_1, \text{ мг/мл}$$

где C_x – концентрация α -горьких кислот в хмеле; C_1 – концентрация стандартного раствора α -горьких кислот, мг/мл; I_x – интенсивность люминесценции анализируемого экстракта хмеля; $I_{x+ad.}$ – интенсивность люминесценции экстракта хмеля с добавкой стандартного раствора α -горьких кислот.

Содержание α -горьких кислот в хмеле в процентах рассчитывают по формуле:

$$X = \frac{c \cdot 10^{-3} \cdot V_1 \cdot V_0 \cdot 100}{V \cdot a}, \%$$

где C – концентрация α -горьких кислот в пробе, найденная методом добавок, мг/мл; V_1 – конечный объем пробы, в котором проводили определения, мл; V_0 – объем мерной колбы, в которой растворяли экстракт α -горьких кислот, мл; V – объем пробы, взятой для определения, мл; a – масса навески хмеля, из которого экстрагировали α -горькие кислоты, г; 10^{-3} – коэффициент перерасчета мг в г.

Результаты определения α -горьких кислот в хмеле методом добавок приведены в таблице 1. Точность и достоверность определения проверена путем статистической обработки результатов определения. При $n=5$, $P=0.95$ величина относительного стандартного отклонения составляет 4.4–5.1%.

Таблица 1. Результаты определения α -горьких кислот в хмеле ($n=5$, $P=0.95$).

№ образца	Образец хмеля	Найдено, %	S_r , %
1	Хмель гранулированный (Франция)	4.56 ± 0.20	4.4
2	Хмель гранулированный (Франция)	6.40 ± 0.30	4.6
3	Хмель гранулированный (Германия)	1.50 ± 0.07	5.1

Проверка правильности полученных результатов методом «введено-найденно» на примере хмеля «французский» приведена в табл. 2.

Таблица 2. Результаты определения α -горьких кислот в хмеле методом «введено-найденно» ($n=5$, $P=0.95$).

Объект анализа, гранулы хмеля	Введено, мг/мл	Найдено в пробе с добавкой, мг/мл	Найдено в пробе, мг/мл	S_r
Хмель	0.100	0.205	0.105 ± 0.005	0.05
французский	0.200	0.306	0.106 ± 0.006	0.06

Выводы

Изучены люминесцентные свойства комплексов ионов Tb(III) с α -горькими кислотами хмеля.

Показана возможность прямого люминесцентного определения α -горьких кислот в хмеле по сенсibilизированной люминесценции иона Tb(III).

Литература:

1. Годованний А.А., Лещенко Н.И., Райтман И.Г., Ежов И.С. Хмель и его использование. Под редакцией Ежова И.С. Киев: Урожай. 1990. С. 335.
2. Шмидт Л. Г. Горькие вещества хмеля и методы их анализа. Центр. ин-т науч.-техн. информации пищевой пром-сти Гос. ком. по пищевой пром-сти. при Госплане СССР. Москва: [б.и.], 1964. С. 64.
3. Ермолаева Г.А. Справочник работника лаборатории пивоваренного предприятия. Санкт-Петербург.: Профессия, 2004. С. 536.

4. Ляшенко Н.И. Биохимия хмеля и хмелепродуктов. Житомир: Полисся, 2002. С. 388.
5. Полуэктов Н.С., Кононенко Л.И., Ефрюшина Н.П., Бельтюкова С.В. Спектрофотометрические и люминесцентные методы определения лантаноидов. Киев: Наукова думка, 1989. С. 254.
6. Tanaka F., Kawasaki Y. Preferential solvation of the europium (III) ion in water-non-aqueous solvent mixtures. A luminescence lifetimes study. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 1988, 84(4), 1083-1090.