

УДК 615.074;543.426

С.В. Бельтюкова, д-р. хим. наук, проф.,
А.А. Бычкова, магистр,
Одес. нац. акад. пищевых технологий

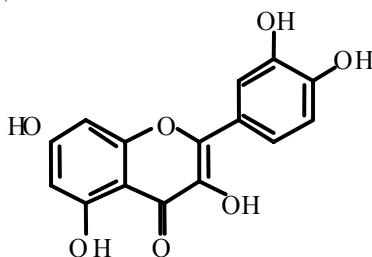
СОРБЦИОННО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КВЕРЦЕТИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

С.В. Бельтюкова, Г.О. Бычкова. Сорбційно-люмінесцентне визначення кверцетину в лікарських рослинах. Розроблено методику визначення кверцетину в лікарських рослинах, яка заснована на використанні власної твердофазної люмінесценції кверцетину, посиленої в присутності іттрію (III). Межа виявлення кверцетину на фосфаті алюмінію становить $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова. Сорбційно-люмінесцентное определение кверцетина в лекарственных растениях. Разработана методика определения кверцетина в лекарственных растениях, основанная на использовании собственной твердофазной люминесценции кверцетина, усиленной в присутствии иттрия (III). Предел обнаружения кверцетина на фосфате алюминия составляет $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

S.V. Belyukova, A.A. Bychkova. Sorption-luminescent determination of quercetin in medicinal plants. A technique for determining quercetin in medicinal plants is developed. The method is based on application of the intrinsic solid-phase luminescence of quercetin enhanced by the presence yttrium (III). The detection limit of quercetin on aluminium phosphate is $5 \cdot 10^{-8}$ mole per liter.

Кверцетин — 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонол является одним из наиболее распространенных биоантиоксидантов ряда флавоноидов:



Полифенолы занимают ведущее место среди биологически активных веществ. Их биологическое действие связано с *P*-витаминной активностью флавоноидов, антимикробной – катехинов, а весь комплекс полифенолов обладает антилучевым, антистрессовым, антиоксидантным действием. Фенольные вещества занимают ведущее место в лечебно-профилактическом питании. Флавоноиды препятствуют окислению липопротеидов низкой плотности плазмы крови и развитию атеросклеротических повреждений стенок кровеносных сосудов (артерий), подавляя процессы внутриклеточного перекисного окисления липидов. Флавоноиды угнетают агрегацию тромбоцитов, что также является положительным фактором в профилактике сердечно-сосудистых заболеваний. Они предотвращают окислительное повреждение нуклеиновых кислот и препятствуют развитию процессов канцерогенеза. Наиболее распространенными биоантиоксидантами (АО) ряда флавоноидов являются рутин и кверцетин [1...3], которые содержатся во многих лекарственных растениях.

Методы определения АО, в том числе и флавонолов, основаны на способности их молекул окисляться как в растворе, так и на поверхности электродов из материалов различной природы. Предложено вольтамперометрическое определение флавонолов в фармпрепаратах, основанное на регистрации высоты волны окисления кверцетина на платиновом электроде на фоне 0,1M H₂SO₄ [4] либо на фоне 0,1M HCl [5]. Однако чувствительность определения в этих методах невысока, предел обнаружения составляет $3,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Известны спектроскопические методы определения флавонолов. Спектрофотометрическая методика определения фенольного состава подземных органов сабельника болотного позволяет провести качественный анализ по

спектрам поглощения, расчет количественного содержания флавоноидов проводится в пересчете на хлорогеновую кислоту [9]. Предложена флуориметрическая методика определения кверцетина, основанная на регистрации интенсивности люминесценции комплекса кверцетина с алюминием, с пределом обнаружения $2 \cdot 10^{-6}$ моль/л [6]. Чаще всего эти препараты в растительном сырье определяются методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с фотодиодным матричным детектированием [7], с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ [8]. Эти методы дают возможность одновременного обнаружения флавоноидов в лекарственных растениях, характеризуются высокими пределами обнаружения $(5 \dots 6) 10^{-8}$ моль/л. Однако они требуют наличия весьма дорогостоящей и сложной аппаратуры.

Ввиду большого интереса к флавоноидам, как важным природным антиоксидантам, обладающим биологической активностью, разработка простых экспрессных и воспроизводимых методик определения АО в растительном сырье представляет собой актуальную задачу. Перспективными являются тест-методы для предварительной полуколичественной или количественной оценки присутствия химического компонента в образце, а также для проведения предварительного скрининга, отбраковки и установления фальсификации образцов. Особенно это важно в процессе контроля качества пищевых продуктов и фармацевтических препаратов.

Разработана простая методика тест-определения кверцетина, основанная на регистрации собственной люминесценции этого препарата, усиленной в присутствии иттрия (III). Способ позволяет осуществлять быстрый скрининг антиоксидантной активности флавоноидсодержащих лекарственных растений, используемых в пищевой промышленности в качестве биологически активных добавок, а также в фармацевтической промышленности.

Аппаратура и материалы. Спектры люминесценции кверцетина и его комплекса с иттрием (III) регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 (люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120 А со светофильтром УФС-2, выделяющим излучение с $\lambda_{\text{макс}}=365$ нм), а также на фотокolorиметре-люминометре "Унифот-люм 8С-420". Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра UV-VIS Specord M40, pH растворов измеряли с помощью иономера универсального ЭВ-74.

Раствор кверцетина ($1,0 \cdot 10^{-3}$ моль/л) готовили по точной навеске препарата в этаноле. Растворы хлоридов иттрия (III), лантана (III), скандия (III) ($1,0 \cdot 10^{-1}$ моль/л) готовили растворением соответствующих оксидов в соляной кислоте (1:1). Избыток кислоты выпаривали до влажных солей и разбавляли дистиллированной водой. Растворы сульфатов Al (III) и Zn (II) готовили путем растворения точных навесок препаратов в дистиллированной воде. Буферный раствор гексаметилентетрамина 4%-ного готовили растворением навески препарата в дистиллированной воде. Для дальнейших измерений применяли 0,4%-ный раствор гексаметилентетрамина, полученный разбавлением исходного этанолом. Стандартный раствор лаурилсульфата натрия ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) готовили растворением точной навески препарата в дистиллированной воде.

Экспериментальная часть. Этанольный раствор кверцетина при облучении УФ-светом ртутной лампы с $\lambda_{\text{макс}}=365$ нм проявляет люминесцентные свойства, но интенсивность люминесценции $I_{\text{люм}}$ невелика. Известно, что $I_{\text{люм}}$ лиганда в некоторых случаях может возрастать при комплексообразовании с ионами металлов, не имеющих собственного поглощения в видимой области спектра. В связи с этим было рассмотрено влияние на $I_{\text{люм}}$ кверцетина и солей металлов: лантана, скандия, алюминия, цинка (рис. 1). Как видно ионы всех рассматриваемых металлов в большей или меньшей степени вызывают увеличение интенсивности люминесценции кверцетина. Наибольшей интенсивностью люминесценции обладают комплексы с Y (III), который и был выбран для дальнейших исследований. В присутствии ионов иттрия (III) интенсивность люминесценции кверцетина возрастает в 90 раз за счет того, что возрастает жесткость молекулы и уменьшаются внутримолекулярные потери энергии возбуждения. Спектр поглощения этанольного раствора кверцетина характеризуется полосой в УФ-области спектра с $\lambda_{\text{макс}}=375$ нм с молярным коэффициентом поглощения $\epsilon=26400$

л/см·моль, что свидетельствует об интенсивном поглощении этим лигандом УФ-излучения. При комплексообразовании с ионом Y (III) полоса поглощения кверцетина сдвигается в видимую область, сдвиг максимума составляет 60 нм.

Батохромное смещение максимума спектра поглощения кверцетина может служить подтверждением комплексообразования с Y (III). Спектр люминесценции комплекса сдвинут по сравнению со спектром поглощения на 65 нм в сторону длинных волн и имеет максимум при $\lambda_{\text{изл}}=500$ нм. Интенсивность люминесценции комплекса сохраняется на сорбентах. Экспериментально выбраны сорбенты, на которых $I_{\text{люм}}$ кверцетина наибольшая. Для этого исследована сорбция комплекса на различных сорбентах: пенополиуретане, цеолитах (CaA, NaA), фосфате алюминия, силикагеле, Sephadex. Максимальная интенсивность люминесценции комплекса наблюдается на фосфате алюминия, иммобилизованном ионами иттрия (III) и на силикагеле (табл. 1).

Таблица 1

Интенсивность люминесценции кверцетина на различных сорбентах, модифицированных ионами иттрия (III)

Сорбент	Фосфат алюминия	Силика-гель	Пенополи-уретан	Цеолит CaA	Цеолит NaA	Sephadex G-50	Sephadex G-75	Sephadex G-150
$I_{\text{люм}}$, отн. ед.	100	90	0	5	5	40	30	0

Спектры люминесценции комплекса на фосфате алюминия и силикагеле сдвинуты по сравнению со спектром поглощения на 80 и 87 нм, соответственно, в сторону длинных волн, и имеют максимум при $\lambda_{\text{изл}}=515$ нм на фосфате алюминия и $\lambda_{\text{изл}}=522$ нм на силикагеле (рис. 2).

В качестве фосфата алюминия использовали медицинский препарат “фосфалюгель”, который предварительно отмывали дистиллированной водой, отфильтровывали и высушивали. Осадок обрабатывали спиртовым раствором хлорида иттрия (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л), перемешивали на магнитной мешалке в течение 15 мин, отфильтровывали и высушивали сорбент в течение 30 мин при температуре 60 °С. Время сорбции кверцетина на сорбенте составляет 15...20 мин.

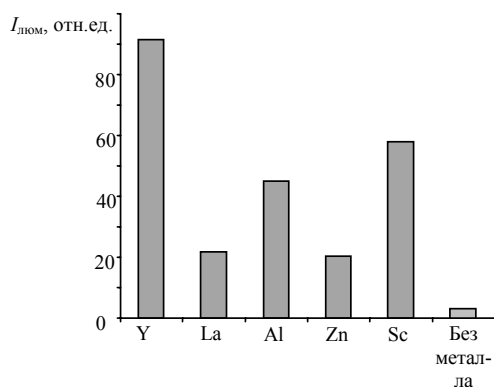


Рис. 1. Интенсивность люминесценции комплексов кверцетина с разными металлами

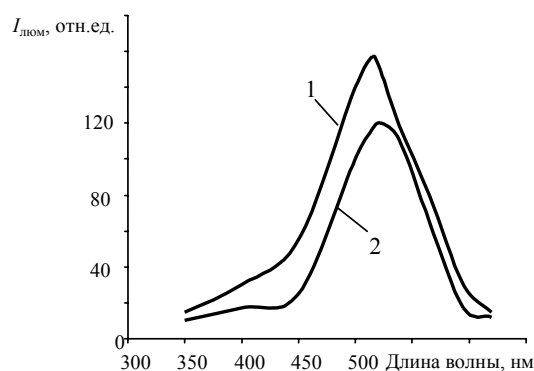


Рис. 2. Спектры люминесценции комплекса кверцетина с иттрием (III) на фосфате алюминия (1) и на силикагеле (2)

Интенсивность люминесценции кверцетина на сорбенте зависит от pH раствора, из которого проводится сорбция. Эта величина составляет pH=4,5. В качестве буфера использовали раствор уротропина 0,4 %-ный.

Изучение зависимости интенсивности люминесценции кверцетина от количества иттрия (III) на фосфате алюминия и силикагеле показало, что наибольшая интенсивность люминесценции наблюдается в интервале концентраций $(0,5...1) \cdot 10^{-2}$ моль/л (рис. 3). Выбрана концентрация иттрия (III) $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

Исследования показали, что $I_{\text{люм}}$ на влажном фосфате алюминия и силикагеле в 3...4 раза выше в отличие от высушенного сорбента.

Установлено, что интенсивность люминесценции комплекса на фосфате алюминия возрастает в 2,5 раза в присутствии анионного поверхностно-активного вещества — лаурилсульфата натрия и в 3 раза в присутствии донорно-активного вещества — триоктилфосфиноксида (рис. 4). В качестве сорбента выбран фосфат алюминия, на котором интенсивность люминесценции сорбата кверцетина выше.

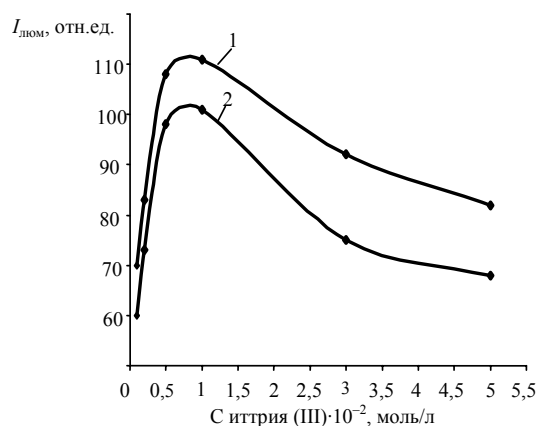


Рис. 3. Зависимость $I_{\text{люм}}$ комплекса от концентрации иттрия(III) на фосфате алюминия (1) и на силикагеле (2)

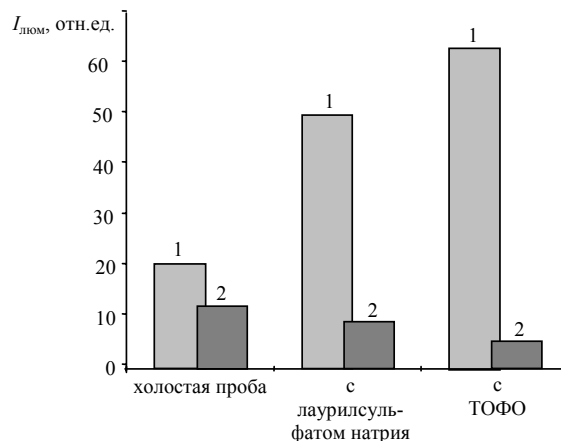


Рис. 4. Влияние усиливающих реагентов на $I_{\text{люм}}$ комплекса кверцетина с Y(III): на фосфате алюминия (1), на силикагеле (2)

На основании полученных результатов разработана методика тест-определения кверцетина в биологически активных лекарственных растениях: шишках хмеля, расторопше, шелухе лука; в настойках боярышника, эвкалипта, прополиса, цветков софоры, календулы.

Определение проводили также по методу градуировочного графика. Линейная область зависимости интенсивности люминесценции комплекса от концентрации кверцетина наблюдается в диапазоне концентраций кверцетина $(0,05...10) \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Методика определения. Навеска 1 г измельченного на мельнице лекарственного растения переносится в колбу, добавляется 50 мл 50 % этанола (этанол-вода 1:1) и перемешивают на магнитной мешалке в течение 60 мин при 70 °С. Полученный экстракт отфильтровывается на фильтре “синяя лента” в мерную колбу, доводится объем экстракта до 50 мл 50 %-м этанолом.

100 мг модифицированного сорбента помещается в тигель, обрабатывается 0,1 мл 0,4 %-го уротропина, затем добавляется 1 мл экстракта лекарственного растения и перемешивается на магнитной мешалке в течение 15 мин. Осадок отфильтровывается, обрабатывается 0,1 мл лаурилсульфата натрия ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) и регистрируется интенсивность люминесценции сорбата комплекса.

При тест-определении интенсивность люминесценции пробы сравнивают с интенсивностью люминесценции стандартных образцов, содержащих различные количества кверцетина $(0,1...5) \cdot 10^{-5}$ моль/л и подготовленных описанным образом. По сравнительной оценке интенсивности делают вывод о содержании кверцетина в образце.

Количественное определение кверцетина проводится по градуировочному графику, который строится по стандартным образцам с различным содержанием кверцетина и подготовленным так же, как описано.

Результаты определения кверцетина в лекарственных растениях и настойках лекарственных растений приведены в табл. 2. Как видно, наибольшим содержанием кверцетина характеризуется экстракт из шелухи лука, настойки прополиса, цветков софоры.

Таблица 2

*Результаты определения кверцетина в лекарственных растениях,
настойках лекарственных растений*

Лекарственное растение	Содержание кверцетина, мг/г сухого продукта
Шишки хмеля	1,0
Шелуха лука	46,7
Плоды расторопши пятнистой	1,4
Этанольные настойки	Содержание кверцетина, мг/л настоя
Прополиса	5616
Цветков софоры	403
Эвкалипта	147
Календулы	53
Боярышника	24

Предложенная методика определения содержания основного действующего компонента (кверцетина) может применяться для оценки качества настоек и экстрактов лекарственных растений, т.е. для осуществления быстрого скрининга антиоксидантной активности флавоноидсодержащих лекарственных растений, используемых в пищевой и фармацевтической промышленности в качестве биологически активных добавок.

Литература

1. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии / [М.В. Кочетова, Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов, А.А. Ревина] // Успехи химии. — 2007. — Т. 76, № 1. — С. 89 — 100.
2. Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты / Е.Б. Бурлакова // Рос. хим. журн. — 2007. — Т. 51, № 1. — С. 3 — 12.
3. Будников, Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Журн. аналит. химии. — 2005. — Т. 60, № 7. — С. 678 — 691.
4. Зиятдинова, Г.К. Определение флавонолов в фармпрепаратах методом вольтамперометрии / Г.К. Зиятдинова, Г.К. Будников // Хим.-фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 10. — С. 54 — 56.
5. Слепченко, Т.Б. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В₁, В₂, С, Е. и кверцетина / [Слепченко Т.Б., Анисимова Л.С., Слепченко В.Ф. и др.] // Хим.-фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 54 — 56.
6. Lin, Y. Studing the fluorescent system of quercetin – Al (III) – Tween 80 and it's using / Y. Lin, H. Chun-xia // J. Guangdong Univ. Technol. — 2001. — Vol. 18, № 2. — P. 81 — 84.
7. Wang, L.-H. General method for determination flavonoids in medical plants and raw cosmetic using HPLS with a photodiode array detector / L.-H. Wang, W.-H. Li // Хим.-фарм. журн. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 46 — 51.
8. Алексеева, М.А. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращенно – фазовой ВЭЖХ / М.А. Алексеева, К.И. Эллер, А.П. Арзамасцев // Хим.-фарм. журн. — 2004. — Т. 38, № 12. — С. 39 — 41.
9. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного / [О.Л. Жукова, А.А. Абрамов, Т.Д. Даргаева, А.А. Маркарян] // Вестн. Моск. Ун-та. — 2006. — Т. 47, № 5. — С. 342 — 345 .

Рецензент д-р хим. наук, проф. Физ.-хим. ин-та им. А.В. Богатского НАН Украины Ефрюшина Н.П.

Поступила в редакцию 29 августа 2008 г.

