

ВИЗНАЧЕННЯ СУМИ ФЛАВОНОЇДІВ У ХМЕЛІ (*HUMULUS L.*) ІЗ ВИКОРИСТАННЯМ ЛЮМІНЕСЦЕНТНОГО СЕНСОРА НА ОСНОВІ КОМПЛЕКСУ РУТИНУ З ІТРІЄМ (III)

Ключові слова: флавоноїди, люмінесценція, ітрій, хміль

Хміль є багатим джерелом сполук поліфенольної природи, що належать до таких класів, як флавонолікози, пренільовані флавоноїди та похідні дигідроксикоричної кислоти, які виявляють властивості антиоксидантів, що зумовлює їхню фармакологічну активність. Поліфеноли хмелю – це одна з основних груп біологічно активних речовин, які визначають його лікувальні властивості. Біологічно активні добавки та лікарські препарати на основі флавоноїдів мають Р-вітамінну активність, жовчогінні, гепатопротекторні, протизвненні, спазмолітичні, діуретичні, антимікробні та проти-вірусні властивості [1].

Для визначення флавоноїдів використовують різноманітні хроматографічні [2–4], електрохімічні [5, 6], електрофоретичні [2, 5] методи аналізу. Найбільш простим і доступним є метод молекулярної абсорбційної спектроскопії в УФ- та видимій області спектра, що дає змогу визначити сумарний вміст флавоноїдів у досліджуваних об'єктах [7–10].

Метою цієї роботи було розроблення методики кількісного визначення флавоноїдів у хмелі. Як аналітичний сигнал використовували люмінесцентні властивості комплексних сполук флавоноїдів з іонами ітрію (III) та цитрат-іоном за присутності бичачого сироваткового альбуміну.

Матеріали та методи дослідження

Розчин цитрату натрію (0,01 моль/л) готували розчиненням точної наважки препарату в дистильованій воді, розчин рутину (0,01 моль/л) – розчиненням точної наважки препарату в етанолі, розчин бичачого сироваткового альбуміну (0,01 г/мл) – розчиненням наважки препарату в дистильованій воді. Хлорид ітрію готували розчиненням високочистого оксиду (99,99%) у хлороводневій кислоті (1:1) із наступним видаленням її надлишку упарюванням. Концентрацію ітрію (III) контролювали комплексонометричним титруванням розчином комплексону III (0,01 моль/л) з індикатором арсеназо I за присутності уротропіну. Флавоноїди екстрагували з хмелю за методикою [10].

Спектри люмінесценції та збудження реєстрували за допомогою спектрометра Cary Eclipse Varian (Австралія) із подвійним джерелом світла (ксенонова лампа 150-W суцільного спектра й імпульсна лампа) та флуорометра ЕФ-ЗМА. Значення рН розчинів вимірювали за допомогою рН-метра ОР-211/1 Radelkis (Угорщина) зі скляним електродом. Необхідне значення рН створювали в розчині за допомогою уротропіну.

Результати дослідження та обговорення

Спектри поглинання флавоноїдів характеризуються наявністю декількох смуг в УФ-області з достатньо високими молярними коефіцієнтами поглинання, що свідчить про ефективне поглинання ними світлової енергії і здатність виявляти люмінесцентні властивості, які значно зростають у разі комплексоутворення з елементами II та III груп. Нами встановлено, що у разі комплексоутворення з іонами ітрію (III) флаво-

ноїди мають найбільш високу інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$). Як поліфенольний стандарт згідно з даними літератури [10] використовували рутин, за допомогою якого було обрано оптимальні умови проведення аналізу. Інтенсивність люмінесценції рутину в розчині невелика, вона зростає у разі комплексоутворення з іонами ітрію (III). Експериментально встановлено, що в присутності цитрат-іонів $I_{\text{люм}}$ комплексу Y(III)–рутин значно зростає. Спектр люмінесценції комплексу Y(III)–рутин має максимум при $\lambda_{\text{випр}} = 570$ нм (рис. 1), в присутності цитрату натрію $I_{\text{люм}}$ комплексу Y(III)–рутин зростає та максимум люмінесценції зсувається в короткохвильову ділянку спектра ($\lambda_{\text{випр}} = 522$ нм), що може свідчити про утворення різнолігандного комплексу. Полідентатний ліганд – цитрат-іон – координується іоном Y(III) по карбоксильній та гідроксильній групам, що призводить до витіснення молекул води з внутрішньої сфери комплексу і, як наслідок, до збільшення $I_{\text{люм}}$. Утворення різнолігандного комплексу в розчині підтверджується й спектрами збудження. У спектрі збудження комплексу за присутності цитрат-іона спостерігається одна інтенсивна смуга з $\lambda_{\text{збудж}} = 280$ нм, водночас у спектрі збудження комплексу Y(III)–рутин є широка, розмита смуга в ділянці 290–380 нм із максимумами за $\lambda_{\text{випр}}$ 315 нм і 355 нм (рис. 2).

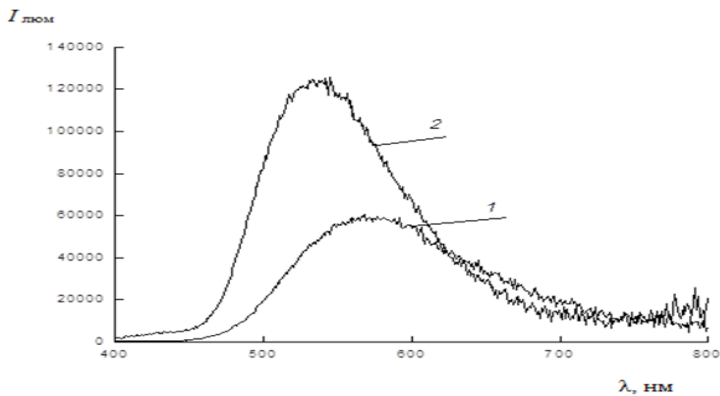


Рис. 1. Спектр люмінесценції комплексу Y(III)–рутин за відсутності (1) та за присутності (2) цитрат-іонів

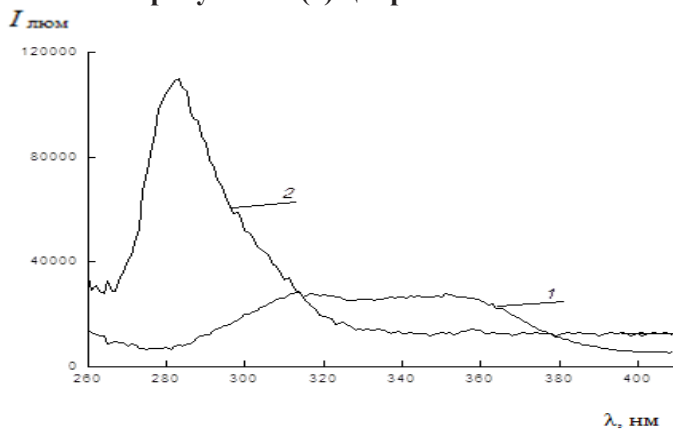


Рис. 2. Спектр збудження комплексу Y(III)–рутин (1) та Y(III)–рутин–цитрат (2)

Поверхнево-активні речовини різної природи (Тритон X-100, Твін-80, лаурилсульфат натрію, цетилпіридиній хлорид і бромід, октадецилпіридиній та цетилтриметиламоній хлориди) на люмінесцентні властивості комплексу суттєво не впливають. Інтенсивність люмінесценції комплексу збільшується на порядок за присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА), який належить до глобулярних білків (рис. 3).

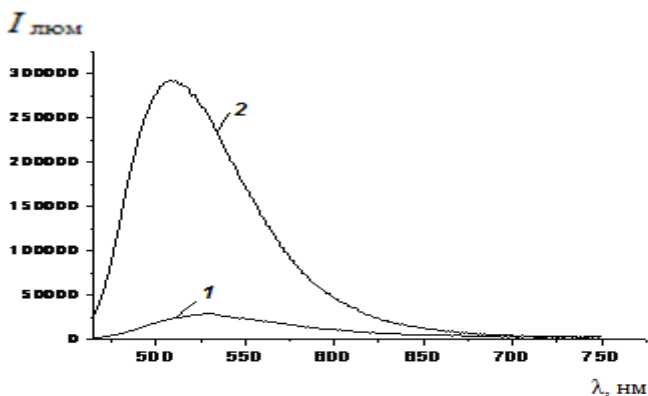


Рис. 3. Спектр люмінесценції комплексу Y(III)–рутин–цитрат за відсутності (1) та за присутності (2) БСА

Можна припустити, що в цьому разі відбувається солюбілізація рутину в мікрофазу глобулярного білка за рахунок електростатичних та гідрофобних взаємодій, що зумовлює екранізацію флуорофору від гасіння молекулами води, що знижує безвипромінювальні втрати енергії. При цьому характер спектрів збудження та люмінесценції не змінюється, збільшується тільки їх інтенсивність, максимума смуг не зміщуються та не розщеплюються, що може бути доказом того, що молекули БСА не входять у внутрішню сферу комплексу.

Максимальна $I_{\text{люм}}$ комплексу Y(III)–рутин–цитрат за присутності БСА спостерігається при рН 6,5–7,5, що створювали в розчині за допомогою уротропіну. Найбільша $I_{\text{люм}}$ спостерігається при концентрації Y(III) $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, рутину – $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, цитрату – $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л. Ці концентрації реагентів було використано для подальших досліджень. Показано, що етанольні розчини флавоноїдів, одержані екстракцією за методикою [10], взаємодіють подібно рутину з іонами ітрію (III), цитрат-іонами, інтенсивність їх люмінесценції збільшується за присутності БСА.

Лінійна залежність інтенсивності люмінесценції комплексу від концентрації рутину, який використовують як стандартну речовину, спостерігається в діапазоні концентрацій рутину 0,03–0,95 мкг/мл.

На основі виконаних досліджень розроблено методику визначення суми флавоноїдів у хмелі.

Визначення суми флавоноїдів у хмелі. Флавоноїди екстрагували з молотого хмелю (1 г) кип'ятінням в етанолі (45 мл) зі зворотним холодильником упродовж 60 хв. Надосадову рідину зливали у мірну колбу ємністю 100 мл і екстракцію в етанолі (45 мл) повторювали знову протягом 30 хв. Об'єднану суміш охолоджували, фільтрували, етиловим спиртом доводили об'єм до 100 мл. Одержані етанольні екстракти флавоноїдів перед аналізом попередньо розбавляли в 2 рази етанолом. У три пробірки вміщували по 0,2 мл розбавленого розчину, що аналізують, по 0,2 мл розчину цитрату натрію з концентрацією $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, у дві з них додавали по 0,1 та 0,2 мл стандартного розчину рутину з концентрацією $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, далі в усі три пробірки додавали по 0,5 мл розчину хлориду ітрію с концентрацією $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л, по 1 мл 1%-го розчину БСА, по 0,2 мл уротропіну 40%-го. Розчини доводили до 10 мл дистильованою водою, змішували, залишали на 20 хв та реєстрували $I_{\text{люм}}$ при $\lambda = 522$ нм. Концентрацію флавоноїдів розраховували за методом добавок.

Результати визначення флавоноїдів у хмелі гранульованому сортів Strisselspalt (Франція) та Hersbrucker Spät (Німеччина) подано в табл. 1 і табл. 2.

Одержані результати перевірено методом «введено–знайдено» та спектрофотометричним методом із AlCl_3 [11].

**Результати визначення суми флавоноїдів (мг/мл) у хмелі гранульованому
Strisselspalt методом «введено–знайдено»**

Введено	Знайдено	S_r
0,00	0,045	0,052
0,02	0,063	0,043
0,03	0,074	0,047

Результати визначення суми флавоноїдів (мг/г) у хмелі гранульованому

№ зразка	Зразок хмелю	Люмінесцентний метод, що пропонують		Спектрофотометричний метод	
		вміст флавоноїдів	S_r	вміст флавоноїдів	S_r
1	Strisselspalt	4,57	0,052	4,15	0,047
2	Hersbrucker Spät	4,19	0,046	4,48	0,043

П р и м і т к а: $n = 5$; $P = 0,95$.

В и с н о в к и

1. Встановлено оптимальні умови люмінесценції різнолігандного комплексу ітрію (III) з рутином, який використано як стандарт, і цитрат-іоном за присутності БСА.

2. Розроблено методику визначення суми флавоноїдів у гранульованому хмелі, що заснована на реєстрації інтенсивності люмінесценції різнолігандного комплексу Y(III)–рутин–цитрат за присутності бичачого сироваткового альбуміну.

Список використаної літератури

1. Ляшенко М. І., Проценко Л. В. Пренілфлавоноїди хмелю та пива / Агропромислове виробництво Полісся: зб. наук. праць. – 2009. – № 2. – С. 52–56.
2. Карцова Л. А., Алексеева А. В. Хроматографические и электрофоретические методы определения полифенольных соединений // Журн. аналит. химии. – 2008. – Т. 63, № 11. – С. 1126–1136.
3. Ванідзе М. Р., Каландія А. Г., Шалашвили А. Г. Флавоноидные соединения плодов фейхоа // Химия раст. сырья. – 2009. – № 3. – С. 103–108.
4. Темердашев З. А., Фролова Н. А., Колычев И. А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Журн. аналит. химии. – 2011. – Т. 66, № 4. – С. 417–424.
5. Дмитриенко В. А., Кудринская В. А., Апяри В. В. Методы выделения, конденсирования и определения кверцетина // Там же. – 2012. – Т. 67, № 4. – С. 340–353.
6. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Определение флавонолов в фармпрепаратах методом вольтамперометрии // Хим.-фарм. журн. – 2005. – Т. 39, № 10. – С. 54–56.
7. Сорокина О. Н., Сумина Е. Г., Петракова А. В., Барышева С. В. Спектрофотометрическое определение суммарного содержания флавоноидов в лекарственных препаратах растительного происхождения // Известия Саратовского ун-та. Сер. Химия, Биология, Экология. – 2013. – Т. 13, Вып. 3. – С. 8–11.
8. Лобанова А. А., Будаева В. В., Сакович Г. В. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья // Химия раст. сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
9. Бекетов Е. В., Абрамов А. А., Нестерова О. В., Кондрашев С. В. Идентификация и количественная оценка флавоноидов в плодах черемухи обыкновенной // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия. – 2005. – Т. 46, № 4. – С. 259–262.
10. Алексеева М. А., Эллер К. И., Арзамасцев А. П. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ // Хим.-фарм. журн. – 2004. – Т. 38, № 12. – С. 39–41.
11. Беликов В. В. Методы анализа флавоноидных соединений // Фармация. – 1970. – № 1. – С. 68.

Надійшла до редакції 1 серпня 2016 року.

С. В. Бельтюкова¹, Е. В. Чередниченко¹, О. И. Теслюк²

¹Одесская национальная академия пищевых технологий

²Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, г. Одесса

ОПРЕДЕЛЕНИЕ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ХМЕЛЕ (*HUMULUS L.*) С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО СЕНСОРА НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСА РУТИНА С ИТТРИЕМ (III)

Ключевые слова: флавоноиды, люминесценция, иттрий, хмель

АННОТАЦИЯ

Полифенолы хмеля являются одной из основных групп биологически активных веществ, определяющих его лечебные свойства. Для определения флавоноидов используют различные хроматографические, электрохимические, электрофоретические методы анализа.

Цель работы – разработка методики количественного определения флавоноидов в хмеле с использованием люминесцентных свойств комплексных соединений флавоноидов с ионами иттрия (III) и цитрат-ионом в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве аналитического сигнала.

В качестве полифенольного стандарта использовали рутин, интенсивность люминесценции которого в растворе увеличивается при комплексообразовании с ионами иттрия (III). Показано, что в присутствии цитрат-ионов I_{lum} комплекса иттрий (III)–рутин значительно возрастает. Цитрат-ион координируется ионом иттрия (III) по карбоксильной и гидроксильной группам, что приводит к вытеснению молекулы воды из внутренней сферы комплекса и, как следствие, увеличению интенсивности люминесценции. Установлено, что интенсивность люминесценции комплекса возрастает в присутствии БСА. Благодаря солубилизации рутина в микрофазы глобулярного белка, что обуславливает экранизацию флуорофора от тушения молекулами воды, снижаются безызлучательные потери энергии. Установлено, что максимальная интенсивность люминесценции комплекса иттрия с рутином и цитрат-ионами в присутствии БСА наблюдается при pH 6,5–7,5. Показано, что этанольные растворы флавоноидов хмеля взаимодействуют подобно рутину с ионами иттрия (III), цитрат-ионами, интенсивность их люминесценции увеличивается в присутствии БСА. Найдены оптимальные условия получения аналитического сигнала предлагаемого люминесцентного сенсора. Разработана методика люминесцентного определения суммы флавоноидов в гранулированном хмеле. Полученные результаты проверены методом «введено–найдено» и спектрофотометрическим методом с $AlCl_3$.

S. V. Belyukova¹, Ye. V. Cherednychenko¹, O. I. Teslyuk²

¹Odesa National Academy of Food Technologies

²Bogatysky Physico-chemical institute of the NAS of Ukraine, Odesa

DETERMINATION OF THE SUM OF FLAVONOIDS IN HOPS (*HUMULUS L.*) WITH THE USE OF LUMINESCENT SENSOR ON THE BASIS OF THE COMPLEX OF RUTIN WITH YTTRIUM (III)

Key words: flavonoids, luminescence, yttrium, hops

ABSTRACT

Hop polyphenols are one of the main groups of biologically active agents defining medicinal properties of hops. Various chromatographic, electrochemical, chromatographic methods of the analysis are used for the determination of flavonoids.

The aim of this work was to develop the method of quantitative determination of flavonoids in hops with the use of luminescent properties of complex compounds of flavonoids with ions of yttrium (III) and citrate-ion in the presence of the bovine serum albumin (BSA) as an analytical signal.

Rutin was used as the polyphenolic standard. Its luminescence intensity increases with a complex formation with ions of yttrium (III). It was shown that I_{lum} of yttrium (III)–rutin complex considerably increased at the presence of the citrate-ions. Citrate-ion is coordinated by an ion of yttrium (III) on carboxyl and hydroxyl groups that leads to replacement of a molecule of water from the internal sphere of a complex and, as a result, to increase in intensity of luminescence. It was established that intensity of luminescence of the complex increased in presence of BSA. Nonradiative energy losses decreased owing to solubilization of rutin into the microphases of globular protein, as solubilization stipulated the protection of a fluorophore from suppression by water molecules. It was established that the maximum intensity of luminescence of the complex of yttrium with rutin and citrate-ions in the presence of BSA could be observed at the pH 6,5–7,5. It was shown that ethanol solutions of flavonoids of hops interacted like routine with ions of yttrium (III), citrate-ions, their intensity increased in the presence of BSA. The optimum conditions for receiving an analytical signal of the proposed luminescent sensor were found.

The method of luminescent determination of the sum of flavonoids in the granulated hops has been developed. The received results were verified by the method of spiked samples and spectrophotometric method with $AlCl_3$.

Електронна адреса для листування з авторами: cherednychenko.liza@gmail.com