

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ФІЗИКО-ХІМІЧНИЙ ІНСТИТУТ ім. О.В. БОГАТСЬКОГО

ДЕНИСЕНКО ТЕТЯНА ОЛЕКСАНДРІВНА



УДК 543.422.3:547.475.2:546.173:547.564.4:54-328

**СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ З
ВИКОРИСТАННЯМ ГЕТЕРОПОЛІКОМПЛЕКСІВ СТРУКТУРИ ДОУСОНА**

02.00.02 – аналітична хімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата хімічних наук

Одеса – 2016

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрах аналітичної хімії, фізичної та неорганічної хімії, хімії та хімічної технології ВМС хімічного факультету Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара

Науковий керівник:

доктор хімічних наук, професор
Вишнікін Андрій Борисович,
завідувач кафедри аналітичної хімії
Дніпропетровського національного
університету імені Олеся Гончара

Офіційні опоненти:

доктор хімічних наук, доцент
Сухарев Сергій Миколайович,
Ужгородський національний університет,
професор кафедри екології та охорони
навколишнього середовища

кандидат хімічних наук,
Лівенцова Олена Олегівна,
Одеська національна академія харчових
технологій, доцент кафедри харчової хімії

Захист відбудеться “ 10 ” березня 2016 р. о 10⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К 41.219.01 у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України (65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86).

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці Фізико-хімічного інституту ім. О.В. Богатського НАН України (65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86).

Автореферат розісланий “ 2 ” лютого 2016 р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат хімічних наук



Снурнікова О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Фенольні сполуки (ФС) – один з найбільш поширених класів біологічно активних речовин, що містять ароматичні кільця з вільною або зв'язаною гідроксильною групою. Вони в значних кількостях містяться в рослинах, овочах, фруктових соках і напоях. Середнє споживання поліфенолів в день складає близько 1 г, що приблизно в 10 разів більше, ніж вітаміну С. Поліфеноли чинять на організм людини протизапальну, антигістамінну, антиоксидантну, протинабрякову та протиракову дію, стабілізують клітинні мембрани, гальмують процеси старіння, позитивно впливають на функцію серцево-судинної системи. Висока фізіологічна активність рослинних фенолів обумовлює їх широке використання у фармацевтичній, косметичній та харчовій промисловості.

Основними методами визначення індивідуальних поліфенолів в лікарських рослинах є високоефективна рідинна хроматографія, її комбінація з мас-спектроскопічним детектуванням, а також капілярний електрофорез. Ці методи вимагають коштовного та складного устаткування, спеціальної пробопідготовки (екстракції або дериватизації) і, як результат, малоприсадибні для рутинного аналізу. Крім того, аналіз хроматографічними методами часто включає визначення обмеженої групи ФС, оскільки комерційні стандартні зразки можуть бути недоступні, а структура деяких представників поліфенолів залишається невстановленою. При цьому зазвичай не враховується вміст танінів, фенольних дітерпенів та летких ФС.

Надати інтегральну оцінку тих чи інших показників при визначенні поліфенольних сполук можна за допомогою спектрофотометричних (СФ) методик. Для визначення суми фенолів головною та майже незамінною є методика, заснована на використанні реактиву Фоліна-Чокальтеу (ФЧ), яка характеризується досить високою чутливістю, надійністю, відтворюваністю одержуваних результатів. Все ж при використанні реактиву ФЧ виникає ряд проблем, пов'язаних з незадовільною вибірковістю по відношенню до багатьох відновників, високою витратою реагенту, недостатньою швидкістю реакції, утворенням малорозчинних речовин з компонентами аналізованого зразка, нелінійністю градуєвальної функції, необхідністю працювати у сильнолужному середовищі. Подолати зазначені вище недоліки методик на основі реактиву ФЧ можна, використовуючи в якості реагенту гетерополікомплекс (ГПК) структури Доусона – 18-молібдодифосфат (18-МФК), запропонований раніше для визначення ряду відновників.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.

Дисертаційна робота виконувалася на кафедрах хімії та хімічної технології високомолекулярних сполук та аналітичної хімії Дніпропетровського національного університету імені Олеся Гончара відповідно до держбюджетної теми Міністерства освіти і науки України № 7-246-11 «Гетерополіаніони як аналітичні форми та реагенти у спектроскопічних та автоматизованих проточних методах аналізу» (2011-2013 рр., номер державної реєстрації 0111U001149).

Мета і завдання дослідження. Мета роботи полягала у з'ясуванні особливостей взаємодії та реакційної здатності молібденових і молібдовольфрамівих гетерополікомплексів структури Доусона по відношенню до

фенольних сполук та розробка на цій основі простих, експресних, високочутливих методик для визначення індивідуальних представників поліфенолів, окремих груп фенольних сполук, а також їх суми в рослинних об'єктах, лікарських препаратах та інших об'єктах.

Для реалізації поставленої мети вирішувалися наступні завдання:

- встановлення особливостей взаємодії і реакційної здатності 18-МФК і реактиву ФЧ по відношенню до індивідуальних представників фенольних сполук;
- оптимізація умов визначення індивідуальних представників поліфенолів, суми фенольних сполук, а також окремих їх груп у рослинних об'єктах з використанням 18-МФК;
- розробка спектрофотометричних, візуально-тестових і кольорометричних методик визначення суми фенольних сполук, окремих представників поліфенолів і їх груп в рослинних об'єктах, лікарських препаратах, продуктах харчування; а також методик визначення різних груп поліфенолів і відновників нефенольної природи при спільній присутності.

Об'єкт дослідження – реакції відновлення гетерополікомплексів структури Доусона природними фенольними сполуками.

Предмет дослідження – гетерополікомплекси структури Доусона, природні фенольні сполуки.

Методи дослідження – спектрофотометрія в ближній УФ і видимій ділянках спектра, потенціометрія, кольорометрія.

Наукова новизна одержаних результатів.

Вперше встановлено можливість використання 18-МФК у якості аналітичного реагенту для визначення як суми фенольних сполук, так і ряду індивідуальних поліфенолів, а також окремих їх груп. На основі систематичного вивчення особливостей взаємодії ФС з 18-МФК визначений вплив на перебіг хімічної реакції концентрації реагенту, природи поліфенолу, рН середовища тощо.

Показано, що 18-МФК у порівнянні з реактивом ФЧ є більш сильним окисником по відношенню до фенолів, інтервал оптимальних значень кислотності зсунутий в область менших значень рН. Відмінності у складі гетерополіаніонів істотно не впливають на значення умовних молярних коефіцієнтів світлопоглинання продуктів їх взаємодії з представниками різних класів поліфенольних сполук.

У випадку, коли загальний вміст поліфенолів визначається присутністю флавонолів або оксикоричних кислот, реакцію взаємодії з 18-МФК рекомендовано проводити при рН 7,4. Для визначення менш реакційноздатних ФС (полімерні поліфеноли, катехіни, оксибензойні кислоти) оптимальною є область рН вище 9,0.

Знайдено, що склад ГПС і вид спектрів поглинання, які отримують при відновленні 18-МФК та реактиву ФЧ, обумовлюються співвідношенням ГПА до фенолу, що є причиною нелінійності градууювальних залежностей. На відміну від реактиву ФЧ у спектрах ГПС, одержаних при відновленні 18-МФК фенольними сполуками, спостерігається ізобестична точка ($\lambda = 900$ нм), наявність якої дозволяє будувати прямолінійні градууювальні залежності.

Практична значимість одержаних результатів.

18-МФК, як і реактив ФЧ, є придатним для визначення суми фенольних сполук, що підтверджується високим ступенем кореляції ($R^2 > 0,95$) між

результатами, отриманими обома методиками при аналізі рослинних зразків різного складу. Методика з використанням 18-МФК дозволяє більш об'єктивно оцінити інтегральні показники (сума фенольних сполук, антиоксидантна активність, харчова цінність) у порівнянні з реактивом ФЧ, завдяки набагато меншому впливу простих фенолів або ряду відновників нефенольного характеру (відновлюючі сахари, амінокислоти, протеїни, тіамін та ін.).

При використанні 18-МФК стає можливим роздільно визначати поліфеноли та більш активні відновники шляхом варіювання рН або з попереднім відокремленням ГПС на пінополіуретані (ППУ). Методика з 18-МФК є більш робастною у порівнянні з реактивом ФЧ. Умови проведення визначення (рН, концентрація буферного розчину і реагенту, час) набагато менше впливають на отримані результати. При визначенні поліфенолів з 18-МФК відсутнє утворення малорозчинних продуктів, методика є більш експресною.

З використанням 18-МФК у якості реагенту були розроблені спектрофотометричні методики визначення загального вмісту ФС у лікарських препаратах на основі рослинної сировини (таблетках, настоянках, сиропах), лікарських рослинах, фруктах, зеленому і чорному чаях (водна та водно-спиртова витяжка), у свіжовиготовлених соках овочів і фруктів, кверцетину в таблетках, рутина і аскорбінової кислоти при спільній присутності в «Аскорутині», флавонолів в лікарських травах, флавонолів і танінів у чорних чаях, катехінів у зелених чаях, фенольних кислот в каві, лопусі, корі дуба та таке інше. Розроблено візуально-тестові та кольорометричні методики для визначення суми ФС, а також фенолів і аскорбінової кислоти при спільній присутності з використанням в якості сорбенту ППУ. Методики визначення ФС у продуктах харчування впроваджено в учбовий практикум кафедри аналітичної хімії та кафедри харчової хімії та інженерії ДНУ ім. О. Гончара.

Особистий внесок здобувача

Аналіз літературних даних, експериментальні дослідження, обробка отриманих даних виконані автором самостійно. Постановка завдань дослідження, обговорення та узагальнення отриманих результатів, підготовка публікацій до друку, формулювання наукових положень і висновків проведені спільно з науковим керівником д.х.н., проф. Вишнікіним А.Б. та д.х.н., проф. Циганок Л.П.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи було викладено та обговорено на X Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Дн-вськ, 2012 р.); III міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії» (Запоріжжя, 2012 р.); VI Міжнародній науково-технічній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (Дн-вськ, 2013 р.); XIV Міжнародній конференції студентів та аспірантів КНУ ім. Т. Шевченка «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 2013 р.); IX Всеукраїнській конференції з аналітичної хімії (Донецьк, 2013 р.); 18th International Conference on Flow Injection Analysis (Portugal, Porto, 2013); XII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії (Дн-вськ, 2014 р.), Київській конференції з аналітичної хімії «Сучасні тенденції» (Київ, 2014 р., 2015 р.), Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології» (Київ, 2014 р.); VII Міжнародній

науково-технічній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Хімія та сучасні технології» (Дн-вськ, 2015 р.); XIII Всеукраїнській конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії з міжнародною участю (Дн-вськ, 2015 р.).

Публікації. Матеріали дисертаційної роботи відображено у 5 статтях, 13 тезах доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 4 розділів, висновків, двох додатків, списку цитованої літератури, що нараховує 312 найменувань, містить 46 рисунків та 27 таблиць. Загальний обсяг дисертації складає 162 сторінки машинописного тексту.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність роботи, сформульовано мету та задачі дослідження, зазначено наукову новизну і практичне значення роботи.

У **першому розділі** (огляд літератури) наведено відомості про загальні характеристики ФС, механізми окисно-відновних реакцій та антиоксидантну дію за участю поліфенолів; розглянута найбільш поширена класифікація ФС, флавоноїдів, полімерних поліфенолів та проаналізовані основні методи їх визначення. На основі аналізу літературних даних показано, що для визначення чисельних представників різних класів ФС, які характеризуються різною реакційною здатністю необхідно використовувати широкий арсенал методів. До цього часу не було запропоновано такого спектрофотометричного реагенту, з використанням якого можна було б визначати як окремі представники ФС або їх групи, так і сумарний вміст поліфенолів. Тому пошук нових реагентів та вдосконалення існуючих спектрофотометричних методів є актуальною задачею при визначенні ФС у рослинних об'єктах. Спектрофотометричні методики відповідають цим вимогам і широко використовуються для проведення рутинного аналізу. У якості стандартного реагенту для спектрофотометричного визначення суми фенолів використовують ГПК структури Доусона – реактив Фоліна-Чокальтеу (ФЧ), суттєвим недоліком якого є його низька селективність відносно великої кількості відновників. Це призводить до отримання завищених результатів та невірної інтерпретації одержаних даних. Використання реактиву ФЧ потребує значного надлишку реагенту; низька швидкість реакції призводить до неможливості автоматизації методик; градувальна функція лінійна у вузькому діапазоні концентрацій; є необхідним працювати у сильнолужному середовищі, в якому вихідний реагент та продукт реакції – гетерополісинь є нестійкими; склад реагенту до кінця невідомий і може змінюватися в залежності від умов синтезу.

З попередніх робіт, виконаних на кафедрі аналітичної хімії ДНУ ім. О. Гончара відомо, що для визначення відновників неорганічної і органічної природи (нітриту, аскорбінова кислота, епінефрин, цистеїн і т.п.) можна з успіхом використовувати 18-МФК. Він має один з найбільших серед ГПА окисно-відновних потенціалів, є стійким в широкому інтервалі рН. Методи синтезу 18-МФК контрольовані та добре відомі. Даних про застосування цього реагенту для визначення суми фенольних сполук у літературі не знайдено.

У **другому розділі** описано вихідні речовини та методики приготування їх розчинів, умови синтезу вихідних ГПК, перераховані лікарські препарати, рослинні об'єкти, продукти харчування, які були проаналізовані в даній роботі, наведені процеси їх пробопідготовки, охарактеризовано використане обладнання та апаратура, наведені застосовані у роботі стандартні методики для визначення поліфенолів у рослинних об'єктах.

Третій розділ присвячено вивченню особливостей взаємодії та реакційної здатності 18-МФК та реактиву ФЧ по відношенню до окремих представників ФС. Реактив ФЧ уявляє собою суміш молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона (18-МВФК), у складі якої переважають члени ряду різнолігандних ГПА, що містять 4-5 атомів молібдену. Ці компоненти іноді помилково відносять до ГПК структури Кеггіна або описують як суміш молібденового і вольфрамового ГПК фосфору структури Доусона. Віднесення молібдовольфрамівих ГПА, які входять до складу реактиву ФЧ, до доусонівських комплексів підтверджується способом синтезу, який включає тривале кип'ятіння розчину на протязі не менш ніж 8 годин і тим, що на відміну від кеггінівських ГПА він є стійким у лужному середовищі. У той час як ГПС, які утворюються при відновленні молібдовольфрамівих ГПА структури Кеггіна, мають молярні коефіцієнти світлопоглинання від 500 до 2000 $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, відповідні ГПА, які входять у склад реактиву ФЧ, утворюють ГПС з набагато більшими значеннями молярного коефіцієнту, які знаходяться у межах від 10000 до 24000 $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$. Сучасна формула таких ГПА має вигляд $\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}^{6-}$ ($n=4-5$).

Відомо, що в залежності від будови ФС значення їх редокс-потенціалів знаходяться в діапазоні від +0,23 В до +0,75 В. Сила фенолів, як відновників, зростає при збільшенні рН. Саме тому для досягнення високої швидкості реакції, в тому числі, з найменш реакційноздатними фенолами при використанні реактиву ФЧ рекомендується створювати сильнолужне середовище (рН 11,4). При цьому на кривій залежності світлопоглинання ГПС від рН розчину практично відсутня ділянка з постійною оптичною густиною, що вимагає точного контролю рН аналізованого розчину. Встановлення рН 11,4 ускладнюється відсутністю придатних буферних розчинів, а при використанні сильних основ відбувається дуже швидке руйнування ГПК, що погіршує відтворюваність результатів визначення.

У цій роботі для визначення ФС у якості аналітичних реагентів досліджені моно- та різнолігандні ГПА структури Доусона. Нами вперше показано можливість застосування у якості реагенту для визначення поліфенолів молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона з невеликою кількістю атомів Вольфраму загальної формули $\text{P}_2\text{Mo}_{18-n}\text{W}_n\text{O}_{62}^{6-}$ ($n=2-4$). Розроблено методику синтезу вказаних ГПК. Відзначено значне підвищення виходу ГПК з ~20 % для 18-МФК до ~80 % для 18-МВФК. Виявлено, що швидкість реакції, спектри поглинання двохелектронних ГПС, значення окисно-відновних потенціалів у широкому діапазоні рН істотно не змінюються при переході від 18-МФК до вказаних молібдовольфрамівих ГПК. Молярні коефіцієнти ГПС, які утворюються при взаємодії відновників з потрійним ГПК або з 18-МФК, є приблизно однаковими. Вказані факти кажуть про перспективність використання молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона з невеликою кількістю атомів Вольфраму для визначення відновників.

Основну увагу у даній роботі присвячено вивченню реакційної поведінки 18-МФК по відношенню до поліфенольних сполук. Експериментальні дослідження, які підтверджуються літературними даними, показали, що окиснена (жовта) форма 18-МФК є стійкою в інтервалі рН 2-5. При рН від 6 до 10 за 60 хвилин руйнується приблизно 60–70% ГПК у водному розчині, а при рН ≥ 10 достатньо 5 хвилин для повного гідролізу 18-МФК. Ми показали, що підвищити стійкість доусонівських ГПК в лужному середовищі, щоб розширити область його використання, можна за рахунок введення до розчину окисненої форми 18-МФК неіоногенних поверхнево-активних речовин (НПАР), але, як виявилось, це значно уповільнює реакцію його відновлення. Тому ми відмовилися від подальших спроб покращити хіміко-аналітичні властивості 18-МФК шляхом застосування міцелярних розчинів НПАР.

Можливість та глибина взаємодії фенолів з 18-МФК суттєво залежать від рН розчину. Це в свою чергу дозволяє регулювати селективність визначення. Знайдено, що в залежності від структурних особливостей різних груп фенолів можна завжди знайти інтервал рН, в якому спостерігається їх кількісна взаємодія з 18-МФК. При рН < 3 18-МФК не здатен до взаємодії з усіма «рослинними» фенолами, які вивчалися (рис. 1).

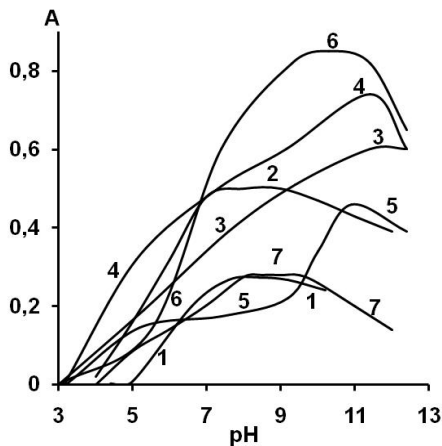


Рис. 1. Вплив рН розчину на утворення ГПС при взаємодії 18-МФК з фенолами. $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ФС}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм; $t = 15$ хв, $l = 0,5$ см. 1 – рутин, 2 – кверцетин, 3 – ЕГКГ, 4 – елагова кислота, 5 – хлорогенова кислота, 6 – розмаринова кислота, 7 – галова кислота

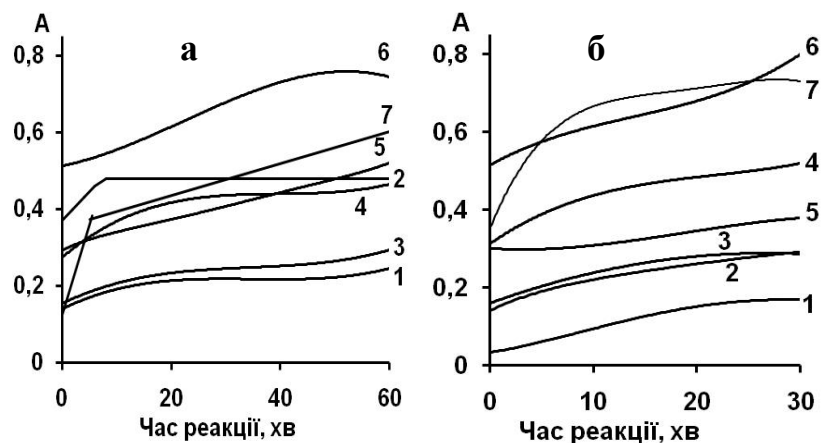


Рис. 2. Залежність оптичної густини ГПС від часу реакції при рН 7,4 (а) та 9,5 (б). $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ФС}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 0,5$ см. 1а – рутин; 2а – кверцетин; 1б – ліквіритин; 2б – гесперидин; 3 – ЕГКГ, 4 – елагова кислота, 5 – хлорогенова кислота, 6 – розмаринова кислота, 7 – галотанін

У якості робочого рН для визначення флавонолів з 18-МФК рекомендовано рН 7,4 (рис. 1, крива 1, 2). В цих умовах швидкість реакції є досить високою і потрібно приблизно 10 хвилин для її закінчення (рис. 2, крива 1, 2). Помічено, що на швидкість реакції окиснення кверцетину значний вплив також має концентрація 18-МФК. Так, при концентрації 18-МФК $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л ГПС утворюється вже за 10 хвилин, а при збільшенні до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л займає менше однієї хвилини. У випадку рутину або морина зміна концентрації реагенту впливає набагато менше.

При рН $> 10,5$ (рис. 1) майже для усіх вивчених систем спостерігається зменшення інтенсивності світлопоглинання. Це пов'язано з прискоренням процесу руйнації окисненої та відновленої форм 18-МФК. Втрати реагенту можна

компенсувати збільшенням концентрації 18-МФК, але в окремих випадках це призводить до збільшення часу визначення. Так, наприклад, реакція окиснення галоїдної кислоти $1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л розчином 18-МФК при рН 9,5 закінчується через 15 хв. Якщо ж концентрацію реагенту збільшити до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, то реакція буде займати не менше 60 хв.

Окиснення ФС, які мають низьку реакційну здатність, таких як флавонони (гесперидин, ліквіритин), монофеноли (м-крезол), при рН < 9 відбувається повільно. Але вже при рН 9,5 (боратний буферний розчин) через 15 хв після початку реакції встигає прореагувати майже 90 % цих речовин. Тому для визначення таких представників фенолів рекомендованим є рН 9,5, час реакції складає 15 хв. При визначенні простих фенолів час визначення треба збільшити до 30 хв (рис. 2б). При визначенні усіх груп ФС достатньо використовувати концентрацію 18-МФК $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Це значення на порядок менше, ніж у стандартній методиці з реактивом ФЧ.

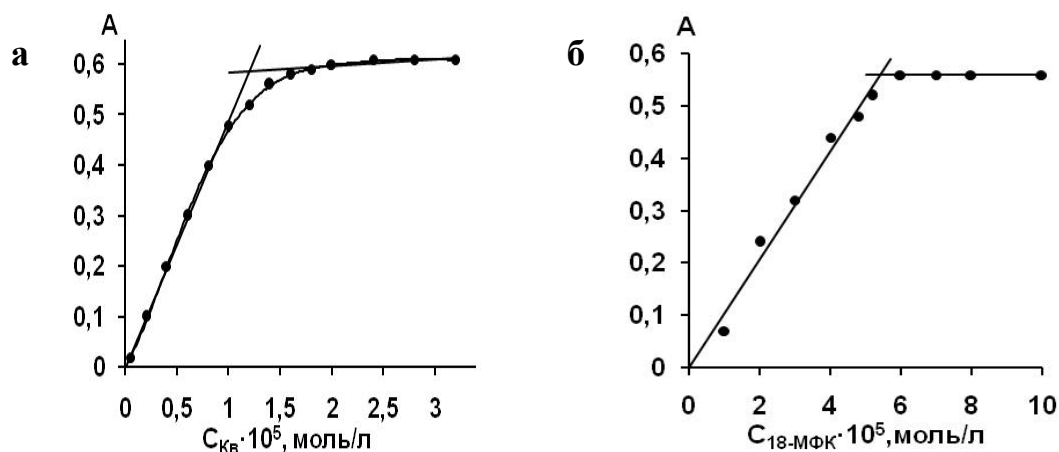


Рис. 3. Криві методу молярних відношень для системи кверцетин – 18-МФК при насиченні кверцетином (а) та 18-МФК (б). а – $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, рН = 7,4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см. б – $C_{\text{кв}} = 10^{-5}$ моль/л, рН = 7,4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см

Точка перегину на кривій методу молярних відношень при насиченні кверцетином відповідає співвідношенню кверцетин: 18-МФК = 1 : 5 (рис. 3а). Молярний коефіцієнт поглинання для кверцетину складає $5,5 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$, а для 18-МФС-2 – $1,15 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$ при 820 нм. Відношення цих величин підтверджує, що в окисненні 1 моля кверцетину бере участь приблизно 5 моль 18-МФК. Наявність чіткої точки перегину на кривій насичення кверцетину 18-МФК (рис. 3б) при співвідношенні 18-МФК : кверцетин = 5: 1 є ще одним доказом запропонованої стехіометрії взаємодії. Важливо підкреслити, що при окисненні ФС утворюється суміш продуктів, склад якої до того ж змінюється у часі, тому для поліфенолів важко казати про певну стехіометрію взаємодії з ГПК.

За оптимальних умов побудовано градувальний графік для визначення кверцетину 18-МФК, який є лінійним в інтервалі концентрацій від $5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л для $l = 1$ см і описується рівнянням $A = 5,47 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$ ($R^2 = 0,998$). З метою розширення інтервалу визначуваних концентрацій кверцетину і досягнення максимально можливої чутливості також було побудовано градувальний графік з використанням кювети $l = 5$ см ($A = (3,21 \pm 0,13) \cdot C_{\text{кв}} \cdot 10^5$ ($R^2 = 0,998$)). У цьому випадку межа визначення кверцетину складає $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

У даній роботі вперше акцентовано увагу на те, що при використанні ГПК структури Доусона градувальний графік, побудований при довжині хвилі, яка відповідає максимуму поглинання ГПС, є нелінійним. При аналізі рослинних об'єктів, коли визначають загальний вміст поліфенолів, це не є суттєвим. Але при визначенні окремих фенолів або, що ще більш істотно, двох відновників у суміші, відсутність лінійності градувальної функції значно впливає на правильність результатів аналізу.

Показано, що при відновленні 18-МФК ФС переважно утворюється двохелектронна ГПС (18-МФС-2), формули $P_2Mo^{VI}_{16}Mo^V_2O_{62}^{8-}$. При зміні рН від 2 до 5 у спектрі поглинання 18-МФС-2 відбувається зміщення максимуму від 760 до 820 нм, а при подальшому збільшенні рН спектр поглинання залишається незмінним. Це є наслідком повної депротонізації ГПА. Нами вперше встановлено, що зміна співвідношення 18-МФК : відновник суттєво впливає на характер спектрів поглинання ГПС (рис. 4). Це продемонстровано на прикладі взаємодії 18-МФК і реактиву ФЧ з рутином, епігалокатехінгалатом, аскорбіною та галовою кислотами. У надлишку реагенту у довгохвильовій області з'являється нова смуга, спектр якої відповідає утворенню одноелектронної ГПС за схемою:

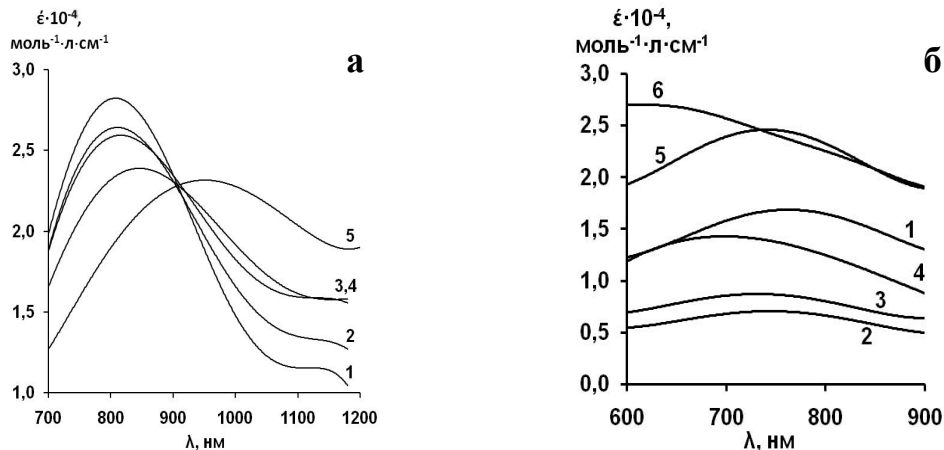
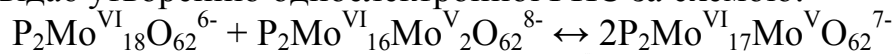
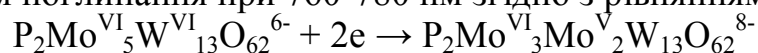


Рис. 4. Спектри поглинання гетерополісіней, отриманих при окисненні галової кислоти 18-МФК (а) та реактивом ФЧ (б). (а) – $C_{18-МФК} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 7,4, $t = 30$ хв, $C_{ГК}$, мкмоль/л: 1 – 30; 2 – 20; 3 – 10; 4 – 6; 5 – 2. (б) – $C_{ФЧ} = 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 11,4, $t = 15$ хв, $C_{ГК}$, мкмоль/л: 1 – 4; 2 – 12; 3 – 20; 4 – 36; 5 – 60; 6 – 80

У спектрах поглинання 18-МФС (рис. 4) є ізобестична точка при 900 нм, яка підтверджує наше припущення про перехід однієї форми ГПС в іншу. Враховуючи це, для збереження лінійності градувальної залежності оптичної густини 18-МФС від концентрації відновника було запропоновано робити вимірювання не в максимумі світлопоглинання при 820 нм, а при довжині хвилі, яка відповідає ізобестичній точці.

Так само, як і для 18-МФК, при дослідженні реакції відновлення реактиву ФЧ помічено, що характер спектра залежить від співвідношення ГПА : відновник. При збільшенні мольної частки фенолу максимум світлопоглинання зміщується від 760-780 нм до 660-680 нм, а також суттєво знижується інтенсивність поглинання. Можна припустити, що у великому надлишку реагенту утворюється двохелектронна ГПС з максимумом поглинання при 760-780 нм згідно з рівнянням напівреакції:



Утворення двохелектронної ГПС підтверджується тим, що смуга поглинання даної ГПС та 18-МФС-2 ($\lambda_{\max} = 820$ нм) знаходяться в тій самій області спектра. Смуги поглинання в цій області обумовлені переносом електрона $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$. Молярні коефіцієнти двохелектронних ГПС, які утворюються з 18-МФК та 18-МВФК, дуже близькі ($\sim 1,1 \cdot 10^4$ моль $^{-1}$ ·л·см $^{-1}$). Підтвердженням є і дані вольтамперометрії: перша хвиля відновлення ГПА (рН = 1) $\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}^{6-}$ ($n_{\text{Mo}} = 4, 5, 6$) відповідає утворенню двохелектронної 18-МВФС ($E = +0,5$ В відн. НКЕ), друга хвиля спостерігається лише при $E = -0,1$ В.

При збільшенні співвідношення фенол : ГПК рівновага зміщується у бік утворення чотирьохелектронної ГПС. При зменшенні долі атомів Mo^{VI} в ГПА збільшується вклад електронних переносів $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{W}^{\text{VI}}$, яким відповідають смуги поглинання при 500–520 нм. Зміщення максимуму смуги поглинання до 660–680 нм пов'язано з утворенням у розчині суміші двох різних форм ГПС.

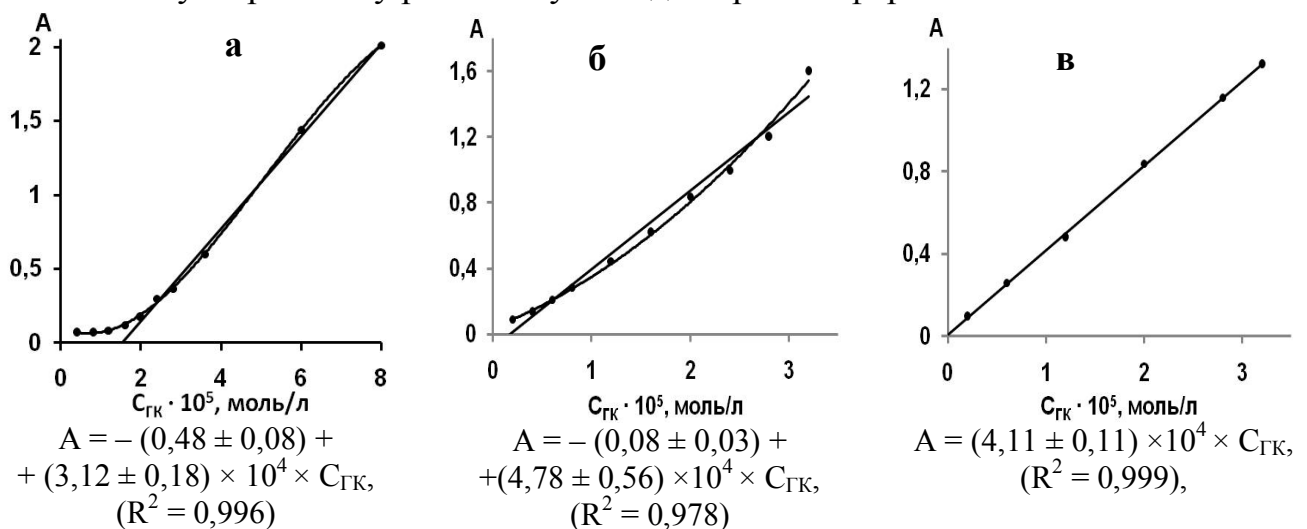


Рис. 5. Градувальні залежності для визначення галлової кислоти (ГК) з реактивом ФЧ (а), 18-МФК (б, в). (а) – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 11,4, $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см; (б, в) – $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 9,5, $l = 1$ см, $\lambda = 820$ нм (б), $\lambda = 900$ нм (в)

У відповідності з вищесказаним градувальні залежності для визначення поліфенолів за допомогою реактиву ФЧ (рис. 5а) та 18-МФК (рис. 5б) при довжині хвилі, яка відповідає максимуму світлопоглинання є нелінійними, а градувальний графік, побудований при довжині хвилі, яка відповідає ізобестичній точці (рис. 5в), має строго прямолінійний характер. У табл. 1 наведені умовні молярні коефіцієнти світлопоглинання продуктів взаємодії поліфенолів з ФЧ і 18-МФК, а в табл. 2 надана оцінка реакційної здатності інших речовин, які містяться разом з фенолами у рослинних об'єктах і виявляють відновні властивості.

З отриманих даних можна зробити висновок, що у більшості випадків молярні коефіцієнти в перерахунку на поліфенол є близькими один до одного. Це свідчить про те, що обидва ГПК мають споріднену структуру, а їх реакційна здатність відрізняється незначно. Проте у ряді випадків молярні коефіцієнти в перерахунку на поліфенол при використанні 18-МФК істотно вище, а отже вище і чутливість методик в порівнянні з реактивом ФЧ.

Умовні молярні коефіцієнти фенольних сполук для їх реакцій з 18-МФК і реактивом ФЧ

Фенольні сполуки		18-МФК				Реактив ФЧ
		$\epsilon^{820} \cdot 10^{-4}, \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$				$\epsilon^{720} \cdot 10^{-4}, \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1},$ pH = 11,4
		pH = 7,4		pH = 9,5		
		15 хв	30 хв	15 хв	30 хв	15 хв
Флавоноли	Кверцетин	5,5	5,5	5,5	5,5	3,85
	Морін	2,7	2,7	2,7	2,7	2,7
	Рутин	2,7	2,7	2,7	2,7	2,8
Фенольні кислоти	Галова	2,1	–	3,2	–	2,7
	Елагова	3,8	4,5	4,0	5,0	6,0
	Хлорогенова	1,7	2,0	1,8	2,2	2,5
	Розмаринова	5,8	7,0	6,4	8,0	8,0
Флавонони	Гесперидин	0,28	0,28	1,4	1,8	1,8
	Ліквіритин	0,015	0,02	0,17	0,17	0,17
Флавані	ЕГКГ	3,65	4,0	3,73	5,0	2,46
Таніни	Галотанін	7,0	–	24,0	–	14,0
Антоціани	Ціанідин	0,08	0,09	0,09	0,12	0,14

Таблиця 2

Оцінка впливу фенолів нерослинного походження та супутніх речовин в реакції з 18-МФК та з реактивом ФЧ (час реакції 15 хв)

Речовина	18-МФК		Реактив ФЧ
	$\epsilon^{820}, \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$		$\epsilon^{720}, \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$ pH = 11,4
	pH = 7,4	pH = 9,5	
Пікринова, цитратна, оксалатна, тартратна, сульфосаліцилова і ацетилсаліцилова к-ти, кофеїн	–	–	–
Саліцилова к-та	–	–	40
Глюкоза, фруктоза, мальтоза	–	–	5
О-крезол	–	–	–
П-крезол	–	–	600
М-крезол	–	400	800
Фенол	10	30	80
Пірідоксіна гідрохлорид	20	20	1100
Тіаміна хлорид	45	2500	42000
Фолієва к-та	180	600	600
Тімол	450	1200	1200
Каптоприл хлорид	5500	5500	8000
Аскорбінова к-та	12000	12000	10000
Пірогаллол карбонова к-та	10000	28000	28000
Гідрохінон	15000	20000	28000

– речовина не реагує з ГПК

Розроблено спектрофотометричну методику визначення кверцетину з використанням 18-МФК у лікарських препаратах. Для перевірки правильності запропонованої методики порівнювали результати аналізу, одержані з використанням 18-МФК, з даними, отриманими стандартними методиками з реактивом ФЧ та алюміній хлоридом (табл. 3).

**Результати визначення кверцетину в таблетках «Квертин»
(мг кверцетину / табл.), n = 6, P = 0,95**

Реагент	18-МФК	AlCl ₃	Реактив ФЧ
C ^{кв} _{ср} ± Δ (S _r)	40,3 ± 1,4 (0,013)	38,2 ± 1,9 (0,019)	41,0 ± 1,9 (0,019)

Нами вперше розроблено спектрофотометричну методику, яка дозволяє одночасно визначати поліфеноли та інші відновники (на прикладі АК) при сумісній присутності за рахунок варіювання рН (рис.6). Використання реактиву ФЧ для цієї

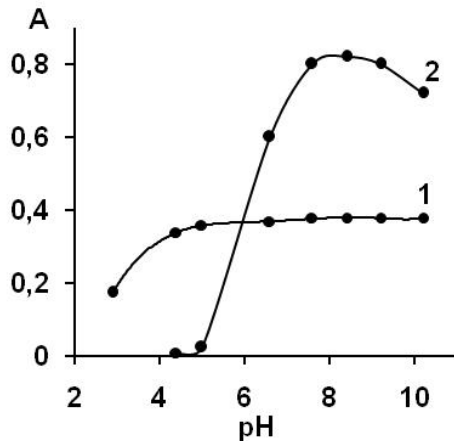


Рис. 6. Вплив рН розчину на оптичну густину при відновленні 18-МФК рутином (1) і АК (2). C_{18-МФК} = 5·10⁻⁵ моль/л, λ = 820 нм, l = 2 см, t = 15 хв. 1 – C_{рутина} = 1,5·10⁻⁵ моль/л, 2 – C_{АК} = 1,5·10⁻⁵ моль/л

мети неможливо через нелінійність градууювальної залежності. Розроблена спектрофотометрична методика була апробована на штучних сумішах та таблетках «Аскорутину». АК визначали в середовищі ацетатного буферного розчину з рН 4,5. Потім при рН 7,4 вимірювали оптичну густину, що відповідає сумі АК і рутина. Рутин визначали за різницею оптичних густин двох дослідів. Було оцінено вплив співвідношення АК і рутина в штучних сумішах на точність визначення рутина. Використання нелінійних градууювальних залежностей з апроксимацією їх рівнянням прямої лінії у разі вимірювання оптичної густини при 820 нм призводить до того, що в результатах визначення навіть однієї речовини з'являється статистично значуща систематична похибка. Оскільки концентрація рутина визначається за різницею світлопоглинань двох дослідів, то в результати вноситься ще більша позитивна систематична похибка, величина якої при збільшенні співвідношення аскорбінової кислоти до рутина зростає до ~ 50%. При використанні лінійних градууювальних графіків (λ = 900 нм) загальна похибка визначення, яка визначається тільки випадковою похибкою, не перевищує 2-4% (табл. 4).

Оцінка правильності та відтворюваності визначення аскорбінової кислоти та рутина у штучних сумішах

Введено		Знайдено (λ = 820 нм)				Знайдено (λ = 900 нм)			
C _{АК}	C _{рутина}	C _{АК} ± Δ	%	C _{рутина} ± Δ,	%	C _{АК} ± Δ,	%	C _{рутина} ± Δ,	%
мкмоль/л		мкмоль/л		мкмоль/л		мкмоль/л		мкмоль/л	
10	10	13,4 ± 0,8	134	12,5 ± 0,5	125	10,4 ± 0,7	104	10,3 ± 0,4	103
20	10	22,9 ± 0,3	114	13,0 ± 0,5	130	19,8 ± 0,2	99	9,5 ± 0,4	95
40	10	38,8 ± 0,6	97	13,7 ± 0,3	137	38,4 ± 0,5	96	9,8 ± 0,2	98
80	10	75,1 ± 0,9	94	15,3 ± 0,7	153	81,5 ± 0,8	102	9,6 ± 0,5	96

При аналізі реальних зразків «Аскорутину» запропонованою методикою в результатах визначення систематична похибка відсутня (табл. 5). По-перше, вміст рутина і АК, визначений запропонованою методикою значимо не відрізняється від результатів аналізу, отриманих стандартними методиками, а, по-друге, вміст рутина

і АК, зазначений виробниками, у всіх випадках потрапляє в довірчий інтервал знайденого вмісту. Всі методики характеризуються високою відтворюваністю (1-3%).

Таблиця 5

**Результати визначення аскорбінової кислоти та рутина в таблетках
«Аскорутин» запропонованою та стандартними методиками
(мг / табл. $\pm \Delta$, n = 5, P = 95%)**

Виробник таблетки, її вага	Значення заявлене		Знайдено запропонованою методикою		Знайдено стандартною методикою	
	АК	Рутин	АК	Рутин	АК ^a	Рутин ^b
Zentiva, Чехія, 0,5 г	100	20	101,1 \pm 2,2	21,4 \pm 1,2	101,4 \pm 1,5	20,7 \pm 0,4
Борщаговський ХФЗ, Україна, 0,33 г	50	50	48,9 \pm 1,2	49,5 \pm 1,5	50,3 \pm 0,7	49,4 \pm 1,2

^a Визначено з 2,6-феноліндофенолом ^b Визначено з AlCl₃

Четвертий розділ присвячено розробці методик визначення суми ФС та деяких окремих груп поліфенолів з 18-МФК. У попередньому розділі був зроблений висновок про подібність реакційної поведінки 18-МФК і реактиву ФЧ на основі знайдених особливостей реакцій з індивідуальними представниками різних класів ФС. Враховуючи різноманітність фенолів у рослинах і наявність у них відновників нефенольного походження, було доцільно підтвердити зроблені висновки на прикладі аналізу достатньо великої кількості об'єктів, у тому числі рослин і ряду лікарських препаратів на основі природних компонентів.

Для встановлення відповідності між результатами визначення загального вмісту фенолів у рослинних об'єктах дані, отримані з 18-МФК, порівнювали з результатами методу ФЧ та методики, яка ґрунтується на використанні алюміній хлориду (табл. 6-8). Наведені приклади аналізу реальних рослинних препаратів переконливо доводять подібність хімічної поведінки 18-МФК і реактиву ФЧ відносно фенолів та підтверджують, що 18-МФК є аналітичним реагентом альтернативним реактиву ФЧ, який може бути з успіхом використаний замість нього.

Таблиця 6

**Сумарний вміст фенолів у препаратах на основі рослинної сировини і
біологічно активних добавках, у перерахунку на рутин, знайдений з
використанням 18-МФК, AlCl₃ і реактиву ФЧ, мг / табл. $\pm \Delta$ (S_r), n = 6, P=0,95**

Об'єкт аналізу	AlCl ₃	18-МФК рН = 7,4	Реактив ФЧ
«Гінкофар»	3,60 \pm 0,042 (0,010)	3,70 \pm 0,045 (0,012)	3,91 \pm 0,041 (0,011)
«Фламін»	6,92 \pm 0,06 (0,009)	11,59 \pm 0,18 (0,016)	11,1 \pm 0,09 (0,008)
«Осокор»	0,20 \pm 0,006 (0,026)	3,36 \pm 0,07 (0,021)	3,4 \pm 0,05 (0,016)
«Формула 3»	мутний р-н	6,76 \pm 0,07 (0,011)	6,58 \pm 0,12 (0,018)
Мікстура від кашлю дитяча*	15,85 \pm 0,36 (0,022)	23,91 \pm 0,27 (0,012)	23,24 \pm 0,26 (0,011)
«Кратал»	0,94 \pm 0,022 (0,021)	12,71 \pm 0,27 (0,021)	11,68 \pm 0,13 (0,011)
«Альтан»	0,7 \pm 0,02 (0,15)	5,21 \pm 0,13 (0,020)	4,23 \pm 0,34 (0,06)

* – вміст вказано в 100 мл розчину

Сумарний вміст фенолів у сиропях і настояках на основі рослинної сировини у перерахунку на рутин, знайдений з використанням 18-МФК, $AlCl_3$ і реактиву ФЧ, мг / 10 мл $\pm \Delta (S_r)$, n = 6, P = 0,95

Зразок лікарського препарату	$AlCl_3$	18-МФК рН = 7,4	Реактив ФЧ
Софора японська	10,34 \pm 0,07 (0,006)	10,62 \pm 0,2 (0,018)	10,92 \pm 0,17 (0,015)
Календула	10,98 \pm 0,16 (0,015)	14,50 \pm 0,27 (0,019)	14,71 \pm 0,27 (0,018)
Солодка	11,03 \pm 0,16 (0,015)	12,85 \pm 0,42 (0,033)	15,69 \pm 0,43 (0,027)
Глід	4,88 \pm 0,16 (0,032)	11,01 \pm 0,49 (0,045)	11,50 \pm 0,27 (0,023)
«Ротокан»	9,4 \pm 0,3 (0,05)	11,02 \pm 0,23 (0,019)	9,44 \pm 0,21 (0,026)

Таблиця 8

Сумарний вміст фенолів у рослинних об'єктах у перерахунку на рутин, знайдений з використанням 18-МФК, $AlCl_3$ і реактиву ФЧ, мг рутину / г $\pm \Delta (S_r)$, n = 5, P = 0,95

Зразок	$AlCl_3$	18-МФК рН = 7,4	18-МФКрН = 9,5	Реактив ФЧ
Грейпфрут	4,73 \pm 0,15 (0,028)	2,21 \pm 0,028 (0,011)	4,40 \pm 0,09 (0,017)	6,1 \pm 0,4 (0,05)
Апельсин	2,13 \pm 0,10 (0,042)	2,07 \pm 0,12 (0,048)	5,34 \pm 0,14 (0,018)	4,59 \pm 0,10 (0,020)
Лимон	10,4 \pm 1,4 (0,12)	6,26 \pm 0,47 (0,07)	9,4 \pm 0,8 (0,07)	10,2 \pm 0,7 (0,06)
Чай зелений	16,3 \pm 1,1 (0,06)	187 \pm 17 (0,08)	264 \pm 20 (0,05)	209 \pm 15 (0,05)
Гібіскус	12,3 \pm 1,4 (0,10)	26,1 \pm 1,8 (0,06)	–	26,1 \pm 2,7 (0,09)
Гранат	1,3 \pm 0,14 (0,10)	6,67 \pm 0,063 (0,008)	–	4,97 \pm 0,11 (0,019)
Шиповник плоди	0,32 \pm 0,06 (0,10)	3,96 \pm 0,13 (0,027)	–	3,69 \pm 0,14 (0,032)
Шиповник квіти	–	8,77 \pm 0,53 (0,046)	–	6,7 \pm 0,8 (0,10)
Сумах	21,6 \pm 2,1 (0,08)	100 \pm 18 (0,14)	142 \pm 10 (0,06)	138 \pm 12 (0,07)
Кора дуба	1,82 \pm 0,16 (0,07)	15,9 \pm 1,6 (0,08)	21,2 \pm 0,7 (0,027)	21,7 \pm 0,6 (0,022)
Кофе	12,0 \pm 1,3 (0,09)	95,4 \pm 1,7 (0,014)	92,4 \pm 2,6 (0,023)	81,3 \pm 1,9 (0,019)
Лопух	–	1,92 \pm 0,05 (0,023)	2,50 \pm 0,10 (0,034)	2,91 \pm 0,14 (0,04)
Шовковиця	–	–	0,44 \pm 0,01 (0,023)	0,36 \pm 0,013 (0,03)

«–» – немає даних

Таблиця 9

Сумарний вміст фенольних сполук у перерахунку на рутин в деяких рослинних об'єктах аналізу згідно з літературними даними у порівнянні з результатами аналізу методикою, що використовує 18-МФК

Зразок	Літературні дані	Знайдено з 18-МФК
апельсин, мг / 100 г	517 – 621	530
лимон, мг / 100 г	366 – 568	940
грейпфрут, г / 100 г	0,38 – 1,08	0,44
зелений чай, мг / г	145 – 200	264
квіти гібіскуса, мг / г	78 (з антоціанами) 54 (без антоціанів)	26
софора японська, мг / г	270	530
глід настояка, мг / мл	1,8 – 2,2	1,1
календула, мг / г	148	145
лопух, мг / г	4,9	2,5

Вміст поліфенолів, знайдений з 18-МФК, знаходиться в інтервалі концентрацій, типових для даного рослинного об'єкта, або досить близький до них, зрозуміло, що за умови використання одного і того ж самого стандарту (табл. 9). Така ж відповідність спостерігається, якщо у якості стандарту застосовують рутин або галову кислоту.

При використанні 18-МФК є можливим одночасне визначення при сумісній присутності різних груп поліфенолів. Прикладом є визначення флавонолів та танінів у чорних чаїв (табл. 10). Відомо, що для танінів є характерною специфічна реакція, яка ґрунтується на їх здатності осаджуватися желатином або іонами металів (Cu^{2+} , Zn^{2+} і т.п.). Для визначення флавонолів у присутності танінів з 18-МФК, по-перше, проводили осадження танінів аміачно-амонійним розчином комплексу цинку при рН 9,5. Нерозчинні таннати цинку відокремлювали за допомогою центрифугування. До розчину освітленого чаю додавали трилон Б для маскування надлишку іонів цинку та визначали флавоноли. Вміст танінів визначали за різницею двох дослідів (сумарного вмісту ФС та вмісту флавонолів).

Таблиця 10

Результати визначення вмісту танінів, в перерахунку на галотанін (ТК), та флавонолів, в перерахунку на рутин, у чорних чаях, отримані з використанням запропонованої та стандартних методик

	Сорт чаю	Вміст галотанінів, г ТК / 100 г чаю			Вміст флавонолів, г рутину / 100 г чаю		
		Ванілін	18-МФК	реактив ФЧ	Реактив ФЧ	18-МФК	AlCl_3
1	Аскольд	10,6	3,7	4,0	3,3	1,8	1,6
2	Greenfield	10,6	5,6	5,6	3,5	2,0	1,7
3	Hyleys	6,0	5,1	5,1	2,6	1,4	1,3
4	Lipton	7,3	5,9	4,9	3,0	1,7	1,7
5	Bestseller	4,9	8,0	7,2	2,5	1,2	1,2
6	Тянь Шань	4,4	5,3	5,8	2,4	1,8	1,7
7	Ahmad	–	8,5	9,5	–	–	–
8	Qualitea	–	6,9	7,0	–	–	–

– немає даних

Підтвердженням правильності визначення вмісту флавонолів з використанням 18-МФК є близькість з результатами, одержаними з алюміній хлоридом. У той самий час вміст флавонолів, знайдений з реактивом ФЧ, приблизно в 1,5 рази більше, що можливо пов'язано з невибірковою дією реактиву ФЧ по відношенню до деяких інших відновників (фенольні кислоти, відновлюючі сахари та ін.).

Швидка і стійка сорбція ГПС на пінополіуретані (ППУ) дозволяє розробити прості і зручні візуально-тестові та кольорометричні методики визначення відновників. Побудовано ізотерму сорбції 18-МФС-2 на ППУ (рис. 7). Залежність величини сорбції (a) від рівноважної концентрації 18-МФС-2 у розчині задовільно лінеаризується у координатах ізотерми Ленгмюра (рис. 7б) за рівнянням $1/a = 2,95 + 0,45/(C_{\text{равн}} \cdot 10^8)$ ($R^2 = 0,995$). Розраховані гранична сорбційна ємність, $a_{\infty} = 33,96$ мкмоль / г та константа сорбційної рівноваги $K_L = 5,93 \cdot 10^4$ л / моль.

Розроблені візуально-тестова та кольорометрична методики визначення суми ФС у рослинних об'єктах. Було враховано, що реакція взаємодії поліфенолів з 18-МФК, попередньо імпрегнованим на ППУ, є сильно уповільненою у часі і має погіршену відтворюваність. Тому визначення суми поліфенолів проводять у дві

стадії. На першій стадії отримували ГПС при рН 7,4 (фосфатний буфер) або 9,5 (боратний буфер), а на другій суміш підкислювали до рН $2,0 \pm 0,2$ і сорбували ГПС на ППУ. Вміст поліфенолів розраховували за тест-шкалою або градувальними графіками залежності модифікованої функції Кубелки-Мунка $(255-R)^2/2R$ від концентрації стандартної речовини (галова кислота, ГК), де R – координата кольору. В табл. 13 наведені основні параметри запропонованих методик, які були розраховані за рівнянням градувального графіку при визначенні ГК: $(255-R)^2/2R = (56 \pm 2) + (30 \pm 4) \cdot C_{ГК} \cdot 10^5$. Відзначено, що для зразків ППУ колір змінюється від світло-сірого до темно-синього.

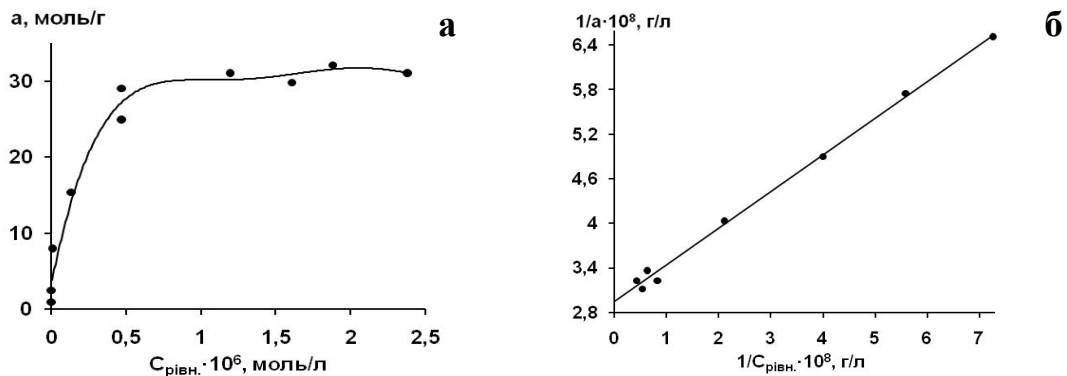


Рис. 7. Вихідна ізотерма сорбції 18-МФС-2 на ППУ (а) та залежність, лінеаризована в координатах ізотерми Ленгмюра (б)

Таблиця 11

Основні параметри кольорометричної методики визначення поліфенолів ГК та АК з 18-МФК

Речовина, яку аналізують	Інтервал лінійності, мг/л	Межа визначення, мг/л	Коефіцієнт кореляції
АК	0,2–17,6	0,48	0,995
ГК	0,1–2,0	0,17	0,988

З використанням 18-МФК розроблено методику, яка дозволяє визначати ФС у присутності великої кількості АК. На першій стадії знешкоджують вплив АК після її вибіркової взаємодії з 18-МФК при рН 3,0 шляхом сорбції на ППУ. Вміст АК розраховують за тест-шкалою або градувальним графіком залежності модифікованої функції Кубелки-Мунка від концентрації АК $(255-R)^2/2R = (46 \pm 8) + (27 \pm 2) \cdot C_{АК} \cdot 10^5$. На другій стадії до аналізованого розчину додають нову порцію 18-МФК для компенсації її втрат на реакцію з АК та боратний буферний розчин рН 9,5. Вміст ФС визначають за графіком залежності оптичної густини від концентрації ГК.

ВИСНОВКИ

Вирішено наукове завдання розробки простих, експресних, високочутливих спектрофотометричних, кольорометричних та тест-методик визначення суми фенольних сполук, окремих представників поліфенолів і їх груп в рослинних об'єктах, лікарських препаратах, продуктах харчування.

1. В результаті систематичного вивчення особливостей взаємодії 18-МФК з фенольними сполуками встановлено, що 18-МФК в порівнянні з реактивом ФЧ є більш сильним окисником по відношенню до фенолів, інтервал оптимальних значень кислотності зсунутий в область менших значень рН. Відмінності у складі

ГПА (у реактиві ФЧ переважають атоми Вольфраму, а до складу 18-МФК входять тільки атоми Молібдену) не впливають істотно на величини ефективних молярних коефіцієнтів, одержувані для реакцій з представниками різних класів поліфенольних сполук.

2. У випадку, коли загальний вміст поліфенолів визначається присутністю флавонолів або оксикоричних кислот, реакція взаємодії при рН 7,4 з 18-МФК перебігає повністю з достатньо високою швидкістю. Для визначення менш реакційноздатних ФС (полімерних поліфенолів, катехінів, оксибензойних кислот) оптимальною є область рН вище 9,0. Для кількісного утворення 18-МФС-2 не потрібен великий надлишок реагенту.

3. Встановлено, що склад ГПС, які отримують при відновленні 18-МФК та реактиву ФЧ, залежить від співвідношення ГПА : фенол. При цьому суттєво змінюються спектри поглинання ГПС, що є причиною нелінійності градууювальних залежностей. На відміну від реактиву ФЧ у спектрах ГПС, одержаних при відновленні 18-МФК фенольними сполуками, спостерігається ізобестична точка ($\lambda = 900$ нм), що дозволяє отримувати прямолінійні градууювальні залежності.

4. При використанні 18-МФК стає можливим роздільно визначати поліфеноли та більш активні відновники шляхом варіювання рН або з попереднім відокремленням ГПС на ППУ, що показано на прикладі одночасного визначення ФС (рутин, галова кислота) та аскорбінової кислоти.

5. При визначенні суми фенольних сполук для великої кількості рослинних зразків різного складу ступень кореляції між результатами, отриманими з використанням 18-МФК та реактиву ФЧ, є досить високим, $R^2 > 0,95$. Оцінка інтегральних показників (сума фенольних сполук, антиоксидантна активність, харчова цінність) з використанням 18-МФК є більш надійною, у порівнянні з реактивом ФЧ.

6. З використанням 18-МФК розроблені спектрофотометричні, візуально-тестові та кольорометричні методики для визначення індивідуальних представників, окремих груп поліфенолів та суми ФС, а також деяких фенолів чи їх суми і аскорбінової кислоти при спільній присутності у лікарських препаратах на основі рослинної сировини (таблетках, настоянках, сиропах), лікарських рослинах, фруктах, зеленому і чорному чаєх (водна та водно-спиртова витяжки), у свіжовиготовлених соках овочів і фруктів, кверцетину в таблетках, рутина і аскорбінової кислоти при спільній присутності в «Аскорутині», флавонолів в лікарських травах, флавонолів і танінів у чорних чаєх, катехінів в зеленому чаї, фенольних кислот в каві, лопусі, корі дуба. У порівнянні з реактивом ФЧ методики характеризуються меншою тривалістю визначення, у ряді випадків більш високою чутливістю та набагато меншим впливом відновників нефенольної природи.

Основний зміст дисертації викладено в публікаціях:

1. Цыганок Л.П., Вишникин А.Б., Денисенко Т.А. Химико-аналитические свойства 15-молибдо-3-вольфрамоdifосфата структуры Доусона // Вопросы химии и химической технологии. 2013. – № 5. – С. 117–120.

Здобувачем проведено дослідження хіміко-аналітичних властивостей 15-молібдо-3-вольфрамофосфату, прийнята участь в обговоренні результатів і підготовці статті до друку.

2. Simultaneous determination of two active components of pharmaceutical preparations by sequential injection method using heteropolycomplexes / Al-Shwaiyat M.K.E.A., **Denisenko T.A.**, Zaruba S.V., Vishnikin A.B., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Y.R. // Вестник Днепропетровского национального университета. Серия химическая. 2014. – Т. 22, № 1. – С. 16–22.

Здобувачем запропоновано новий підхід до одночасного визначення двох відновників, проведена апробація методики для визначення аскорбінової кислоти в таблетках «Аскорутин», прийнята участь в обговоренні результатів і підготовці статті до друку.

3. **Денисенко Т.А.**, Цыганок Л.П., Вишникин А.Б. Спектрофотометрическое определение кверцетина и суммы полифенолов с использованием 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса. Методы и объекты химического анализа. 2014. – Т. 9, № 3. – С. 130-138.

Здобувачем проведено дослідження, щодо встановлення оптимальних умов перебігу реакції окиснення кверцетину 18-молібдодифосфатом та апробацію методики для визначення поліфенолів в рослинних об'єктах та лікарських препаратах, прийнята участь в обговоренні результатів і підготовці статті до друку.

4. **Денисенко Т.А.**, Цыганок Л.П., Вишникин А.Б. Спектрофотометрическое определение рутина и аскорбиновой кислоты при совместном присутствии с использованием 18-молибдодифосфорного гетерополикомплекса. Вісник ОНУ. Хімія. 2015. – Т. 20, № 1 (53). – С. 49–68.

Здобувачем проведено дослідження, щодо встановлення оптимальних умов перебігу реакції окиснення рутину 18-молібдодифосфатом, розроблена та апробована методика одночасного визначення аскорбінової кислоти та рутину при спільній присутності, прийнята участь в обговоренні результатів і підготовці статті до друку.

5. **Денисенко Т.А.**, Цыганок Л.П., Вишникин А.Б. Особенности взаимодействия 18-молибдодифосфата и реактива Фолина-Чокальтеу с фенольными соединениями. Аналитика и контроль. 2015. – Т. 19, № 3. – С. 242–251.

Здобувачем проведено порівняльне дослідження взаємодії 18-молібдодифосфату та 18-молібдовольфрамофосфату з рядом представників фенольних сполук, прийнята участь в обговоренні результатів і підготовці статті до друку.

6. **Денисенко Т.О.**, Цыганок Л.П. Дослідження окисно-відновних властивостей 15-молібдо-3-вольфрамофосфата методом потенціометричного титрування // Тези доп. III міжнародної науково-практичної конференції «Сучасні проблеми біології, екології та хімії». – Запоріжжя, 2012. – С.313–314.

7. **Денисенко Т.О.** Підвищення стійкості 18-молібдодифосфату // Тези доп. VI Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених. – Дніпропетровськ, 2013. – С. 84.

8. Денисенко Т.О. Вивчення хіміко-аналітичних властивостей різнолігадного комплексу структури Доусона // Тези доп. XIV Міжнародної конференції студентів та аспірантів Київського національного університету імені Тараса Шевченка «Сучасні проблеми хімії». – Київ, 2013.– С. 207.

9. Денисенко Т.А., Цыганок Л.П., Вишнікин А.Б., Петрушина Г.А. Спектрофотометрическое определение кверцетина с помощью 18-молибдодифосфата // Тези доп. IX Всеукраїнської конференції з аналітичної хімії. – Донецьк, 2013.– С.72.

10. Цыганок Л.П., Петрушина Г.О., Вишнікин А.Б., Денисенко Т.О. Дослідження стабільності 18-молибдодифосфату у лужних розчинах // Тези доп. Всеукраїнської конференції з аналітичної хімії. – Донецьк, 2013.– С.83.

11. Al-Shwaiyat M.K.E.A., Vishnikin A.B., Denisenko T., Tsiganok L.P., Andruch V., Bazel Y. New methods for simultaneous determination of several analyses by using flow analysis and Dawson heteropolyanions // Abstracts of 18th International Conference on Flow Injection Analysis. – Porto, Portugal, 2013. – P. 82.

12. Денисенко Т.О. 18-молибдодифосфат – новий реагент для визначення поліфенолів // Тези доп. XX Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії. – Дніпропетровськ, 2014. – С.20.

13. Денисенко Т.О., Вишнікин А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометричне визначення поліфенолів з використанням 18-молибдодифосфату // Тези доп. Київської конференції з аналітичної хімії «Сучасні тенденції». – Київ, 2014. – С. 173.

14. Денисенко Т.О., Вишнікин А.Б., Цыганок Л.П. Спектрофотометричне визначення таніну з використанням 18-молибдодифосфату // Тези доп. Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні проблеми хімії та хімічної технології». – Київ, 2014. – С. 110.

15. Денисенко Т.А. Спектрофотометрическое определение катехинов в зелёном чае с использованием 18-молибдодифосфата // Тези доп. VII Міжнародної науково-технічної конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Хімія та сучасні технології». – Дніпропетровськ, 2015. – С. 120.

16. Денисенко Т.О., Русанова Т.О. Вивчення особливостей взаємодії галової кислоти з 18-молибдодифосфатом // Тези доп. XIII Всеукраїнської конференції молодих вчених та студентів з актуальних питань хімії з міжнародною участю. – Дніпропетровськ, 2015. – С.84.

17. Вишнікин А.Б., Денисенко Т.О., Цыганок Л.П. Кольорометричне та тест-визначення поліфенолів і аскорбінової кислоти при спільній присутності з використанням 18-молибдодифосфату // Тези доп. Київської конференції з аналітичної хімії «Сучасні тенденції». – Київ, 2015. – С. 145.

АННОТАЦІЯ

Денисенко Т.О. Спектрофотометричне визначення поліфенолів з використанням гетерополікомплексів структури Доусона. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.02 – аналітична хімія. – Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, Одеса, 2016.

Дисертаційна робота присвячена розробці простих, високочутливих, експресних спектрофотометричних методик визначення окремих фенольних сполук (ФС), їх груп, а також загального вмісту ФС у рослинних об'єктах з використанням у якості аналітичних реагентів молибденових і молибдовольфрамівих гетерополикомплексів (ГПК) структури Доусона. Порівняльне дослідження реакції взаємодії 18-молибдофосфорного ГПК і реактиву Фолина-Чокальтеу з рядом представників різних класів ФС, а також результати аналізу ряду рослинних об'єктів засвідчили високий ступінь кореляції результатів визначення, отриманих обома методиками. Розроблені спектрофотометричні візуально-тестові і кольорометричні методики для визначення окремих ФС або їх суми у лікарських рослинах і препаратах (таблетках, настоянках, сиропах), фруктах, соках, флавонолів у лікарських травах, флавонолів та танінів у чорних чаях, катехінів у зеленому чаї, фенольних кислот у кофе, танінів у коньячних виробках і т.п.

Ключові слова: реактив Фолина-Чокальтеу, 18-молибдодифосфат, спектрофотометрія, визначення фенолів.

АННОТАЦІЯ

Денисенко Т.А. Спектрофотометрическое определение полифенолов с использованием гетерополикомплексов структуры Доусона. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.02 – аналитическая химия. – Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, Одесса, 2016.

Диссертационная работа посвящена изучению особенностей взаимодействия и реакционной способности молибденовых и молибдовольфрамивых гетерополикомплексов структуры Доусона по отношению к фенольным соединениям с целью разработки спектрофотометрических, цветометрических и тест-методик для определения суммарного содержания полифенолов, отдельных групп фенолов, а также индивидуальных представителей в лекарственных растениях, фармпрепаратах, продуктах питания, соках, напитках, чаях и т.п. Сравнительное исследование реакции взаимодействия 18-молибдофосфорного ГПК (18-МФК) и реактива Фолина-Чокальтеу (ФЧ) с рядом представителей различных классов ФС, а также результаты анализа ряда лекарственных препаратов на основе растительного сырья свидетельствуют о том, что 18-МФК, как и ФЧ, пригодны для спектрофотометрического определения суммы ФС. В случае, если общее содержание полифенолов определяется присутствием флавонолов или оксикоричных кислот, то взаимодействие последних с 18-МФК является быстрым и полным при проведении реакции при рН 7,4. Для определения менее реакционноспособных ФС (полимерные полифенолы, катехины, оксибензойные кислоты) оптимальной является область рН выше 9,0. Корреляция результатов определения суммы полифенолов, полученных с использованием 18-МФК или реактива ФЧ, с результатами методики, использующей хлорид алюминия, наблюдается только в том случае, если в растениях преобладают флавоны, имеющие гидроксильные группы в положении 3 и/или 5. Установлено, что 18-МФК является более активным окислителем по отношению к фенолам, вследствие чего в сравнении с реактивом ФЧ интервал оптимальных значений рН сдвинут в более

кислую область, скорость реакции выше, а используемая концентрация реагента на порядок меньше. Обнаружено, что при использовании обоих реактивов и измерении оптической плотности в максимуме поглощения гетерополисини (ГПС) градуировочные зависимости являются нелинейными. Возможной причиной этого служит изменение состава и глубины восстановления ГПК при изменении соотношения ГПК : фенол. В спектрах ГПС, получаемых при восстановлении 18-МФК, имеется изобестическая точка ($\lambda = 900$ нм), что позволило получать строго прямолинейные градуировочные зависимости. При использовании 18-МФК влияние восстанавливающих сахаров, простых фенолов, сульфит-ионов, витаминов и некоторых других соединений на результат определения фенольных соединений становится намного меньшим. Только при использовании 18-МФК возможно одновременное определение фенола и аскорбиновой кислоты путем варьирования рН определения или предварительной сорбции ГПС, образующейся при взаимодействии с аскорбиновой кислотой при рН 4,0-4,7. Разработаны спектрофотометрические визуально-тестовые и цветометрические методики для определения отдельных ФС или их суммы в лекарственных растениях и препаратах на основе растительного сырья (таблетках, настойках, сиропах), фруктах, соках, фармацевтических препаратах, флавонолов в лекарственных травах, флавонолов и танинов в черных чаях, катехинов в зеленом чае, фенольных кислот в кофе, танинов в коньячных изделиях и т.п.

Ключевые слова: реактив Фолина-Чокальтеу, 18-молибдодифосфат, спектрофотометрия, определение фенолов.

SUMMARY

Denisenko T.O. Spectrophotometric determination of polyphenols by using of heteropoly complexes with Dawson structure. – Manuscript.

The thesis for a scientific degree of Ph.D. Candidate in Chemistry by specialty 02.00.02 – analytical Chemistry. A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of National Academy of Sciences of Ukraine, Odessa, 2016.

The thesis is devoted to the development of simple, highly sensitive and rapid methods for the determination of individual phenol compounds (FC), their groups, and total phenol content by using of Dawson molybdenum and molybdotungstic heteropoly complexes (HPC) as analytical reagents. Comparative investigation of the reaction between 18-molybdodiphosphate HPC (18-MPC) and Folin-Ciocalteu reagent with representatives of various classes of FC showed a high degree of correlation between the results of the determination obtained by both methods. Spectrophotometric, visual-test and colorimetric methods were developed for the determination of individual FC or total phenol content in medicinal plants and preparations (tablets, tinctures, syrups), fruits, juices, flavonols in medicinal herbs, flavonols and tannins in black tea, catechins in green tea, phenolic acids in coffee, tannins in cognac products etc.

Keywords: Folin-Ciocalteu reagent, 18-molybdodiphosphate, spectrophotometry, determination of phenols.