

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

На правах рукопису

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук

Науковий керівник:
Вишнікін Андрій Борисович
доктор хімічних наук, професор

Одеса – 2016

ПЛАН

Перелік умовних скорочень	5
Вступ.....	6
РОЗДІЛ 1 Огляд літератури.....	11
1.1. Загальна характеристика фенольних сполук природного походження та їх класифікація	11
1.1.1. Класифікація флавоноїдів	13
1.2. Полімерні поліфеноли, їх властивості та класифікація.....	15
1.3. Фенольні сполуки, що містяться у чаях.....	17
1.4. Реакційна здатність поліфенолів рослинного походження.....	19
1.5. Антиоксидантний ефект	21
1.6. Методи визначення фенольних сполук.....	22
1.6.1. Методи визначення танінів	27
1.7. Характеристика гетерополікомплексів, їх структурні особливості	30
1.8. Окисно-відновні властивості гетерополіаніонів структури Доусона.....	32
1.9. Використання 18-молібдодифосфату в хімічному аналізі.....	33
1.10. Реактив Фоліна-Денніса та Фоліна-Чокальтеу	34
1.11. Сорбційно-спектроскопічні методики визначення фенолів	36
Висновки до розділу 1	39
РОЗДІЛ 2. Характеристика методик, об'єктів та технік експериментальних досліджень.....	40
2.1. Реактиви та розчини реагентів, буферні розчини, стандартні речовини. Використане обладнання	40
2.2. Об'єкти аналізу, які були використані в дисертаційній роботі	43
2.2.1. Пробопідготовка рослинних зразків та лікарських препаратів	44
2.3. Синтез 18-молібдодифосфату та реактиву Фоліна-Чокальтеу	45
2.4. Стандартні методики.....	47
2.4.1. Спектрофотометричні методики для визначення фенольних сполук у рослинних об'єктах	47
2.4.2. Перманганатометричний метод для визначення поліфенолів у чаях	52

2.4.3. Титрометрична методика для визначення аскорбінової кислоти	52
РОЗДІЛ 3. Особливості взаємодії 18-молібдодифосфату та реактиву Фоліна-Чокальтеу з фенольними сполуками.....	54
3.1. Синтез і дослідження реакцій відновлення молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона формули $\text{PMo}_{18-n}\text{W}_n\text{O}_{62}^{6-}$ ($n = 2-4$).....	54
3.1.1. Дослідження реакцій утворення та відновлення 15-молібдо-3-вольфрам-2-фосфорного ГПК у розчині	54
3.1.2. Вплив неіоногенних поверхнево-активних речовин на стійкість 18-молібдодифосфату у розчинах	60
3.1.3. Синтез $(\text{NH}_4)_6[\text{P}_2\text{Mo}_{16}\text{W}_2\text{O}_{62}] \times 14\text{H}_2\text{O}$	62
3.2. Дослідження умов взаємодії окремих фенольних сполук з 18-молібдодифосфатом і реактивом Фоліна-Чокальтеу	65
3.2.1. Вплив кислотності розчину на взаємодію реактиву Фоліна-Чокальтеу та 18-молібдодифосфату з фенольними сполуками	65
3.2.2. Оптимізація концентрації реагенту	70
3.2.3. Встановлення стехіометрії реакції взаємодії 18-молібдодифосфату з фенолами	71
3.3. Вплив на спектри поглинання гетерополісині співвідношення гетерополіаніону до фенолу.....	74
3.4. Побудова градувальних залежностей для визначення кверцетину, рутину, епігалокатехін галата, галової та аскорбінової кислот з реактивом Фоліна-Чокальтеу або 18-молібдодифосфатом	79
3.5. Оцінка реакційної здатності 18-молібдодифосфату до реакцій з окремими фенольними сполуками, фенолами нерослинного походження та супутніми сполуками	84
3.6. Спектрофотометричне визначення кверцетину в таблетках «Квертин».....	87
3.7. Спектрофотометричне визначення рутину та аскорбінової кислоти при спільній присутності у штучних сумішах і лікарському препараті «Аскорутин» .	87
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3.....	90

РОЗДІЛ 4. Спектрофотометричне, кольорометричне та тест-визначення суми фенольних сполук з використанням 18-молібдодифосфату.....	92
4.1. Порівняльна характеристика результатів спектрофотометричного визначення загального вмісту фенолів у рослинних об'єктах з використанням алюміній хлориду, 18-молібдодифосфату та реактиву Фоліна-Чокальтеу.....	92
4.2. Спектрофотометричне визначення загального вмісту поліфенольних сполук у чаях	103
4.3. Кольорометричне та тест-визначення поліфенолів у рослинних об'єктах	110
ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4.....	121
ВИСНОВКИ	122
ДОДАТОК 1	157
ДОДАТОК 2	161

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ГПК – гетерополікомплекс

ГПА – гетерополіаніон

ГПС – гетерополісинь

18-ГПА – гетерополіаніон структури Доусона

18-МФК – 18-молібдодифосфат

18-МФС-2 – двохелектронна 18-молібдодифосфорна синь

18-МФС-4 – чотирьохелектронна 18-молібдодифосфорна синь

Реактив ФЧ – реактив Фоліна-Чокальтеу

Реактив ФД – реактив Фоліна-Денніса

18-МВФК – 18-молібдовольфрамодифосфат

18-МВФС-2 – двохелектронна 18-молібдовольфрамодифосфорна синь

18-МВФС-4 – чотирьохелектронна 18-молібдовольфрамодифосфорна синь

ФС – фенольні сполуки

ПФ – поліфеноли

Кв – кверцетин

ГК – галова кислота

ЕГКГ – епігалокатехін галат

ТК – танінова кислота (інша назва галотанін)

АК – аскорбінова кислота

ПАР – поверхнево-активні речовини

НПАР – неіоногенні поверхнево-активні речовини

ППУ – пінополіуретан

АОА – антиоксидантна активність

СФ – спектрофотометрія

ВСТУП

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, малопридатні 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 сильнолужньому 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 кольориметричних 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.

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.

РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Загальна характеристика фенольних сполук природного походження та їх класифікація

Поліфеноли та їх похідні широко поширені у природі і є практично обов'язковою складовою частиною рослин. Синтез поліфенолів у клітинах тварин і людини не можливий, тому вони надходять в організм переважно з рослинною їжею. Відомо, що фенольні сполуки здатні впливати на хід найрізноманітніших фізіологічних процесів, реагувати з вільнорадикальними сполуками, проявляють схильність до специфічної взаємодії з білками, які виконують регуляторні функції в організмі людини та інше. Вони проявляють протизапальну, антигістамінну, антиоксидантну, протинабрякову і протиракову дію, стабілізують клітинні мембрани, гальмують процеси старіння, позитивно впливають на функцію серцево-судинної системи. Висока фізіологічна активність і низька токсичність рослинних фенолів роблять їх особливо важливими для фармацевтичної, косметичної та харчової промисловості. Враховуючи важливість біологічної активності фенольних сполук, їх ідентифікація в рослинній сировині, фармпрепаратах відіграє важливу роль у контролі якості та безпеки [1-5].

Початок вивчення природних поліфенолів пов'язують з Шевроле, який у 1814 р. виділив з кори дуба кристалічну речовину – кверцетрин. Пізніше Ріганд встановив глікозидний характер цієї речовини і Аглікон назвав кверцетином. У 1903 р. Валяшко М.О. встановив будову рутину [6]. Систематичне вивчення будови природних флавоноїдів багато років проводили польські хіміки. Велику роботу з вивчення антоціанів провів Вільштеттер Р.М. [7]. Дослідженнями катехінів займалися Курсанов А.Л., Запраметов М.Н., Фрейденберг К. та ін. [8]. Зацікавленість поліфенольними сполуками особливо зросла в 40-ві роки ХІХ ст. Після 1970 р. виділено понад 1400 цих речовин, але і дотепер інтерес до рослинних поліфенолів невичерпаний.

Феноли можна розглядати як ароматичні спирти, у яких одна або декілька гідроксильних груп зв'язані безпосередньо з ароматичним ядром. Цим обумовлені головні відмінності фенолів від аліфатичних спиртів. Сучасна класифікація фенольних сполук заснована на ступені окиснення та гідроксилювання пропанового скелета С6-С3-С6. Чисельний клас фенольних сполук, виходячи з вуглецевого скелетного зв'язку, можна поділити на три основні групи: С6-С1; С6-С3; С6-С3-С6 [2, 9].

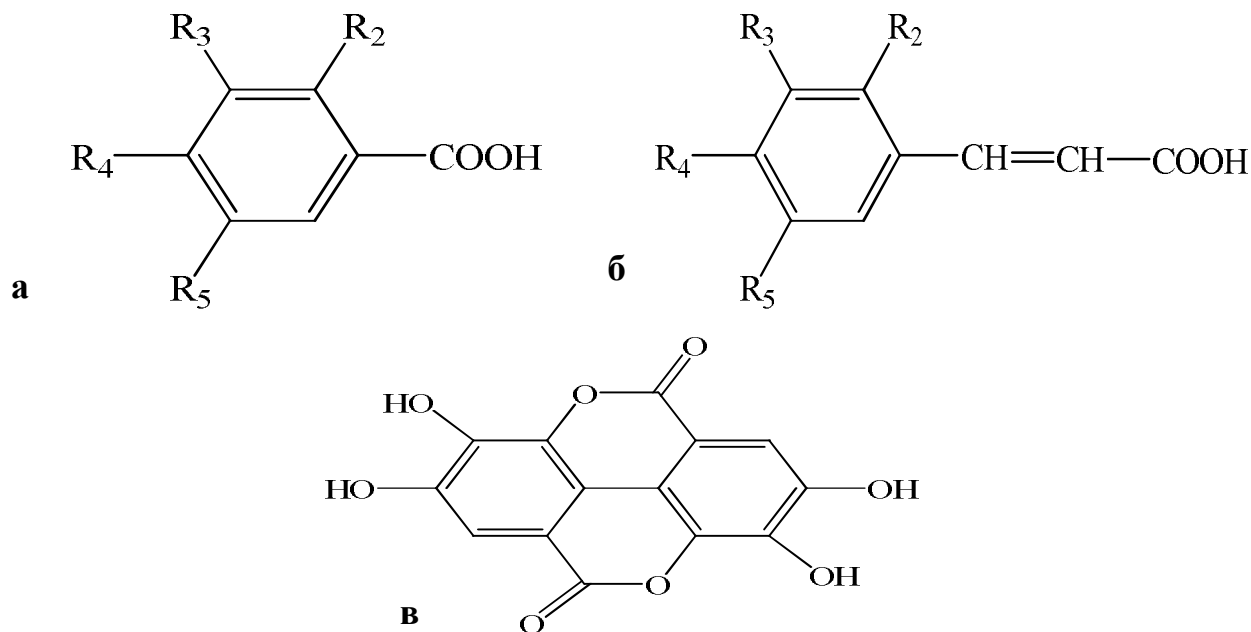


Рис. 1.1. Структурні формули оксибензойних (а), оксикоричних (б) кислот та елагової кислоти (в)

Група С6-С1 сполук представлена оксибензойним кислотами (рис. 1а). До моногідроксибензойних належать 4-гідроксибензойна, саліцилова (2-ОН), ацетилсаліцилова кислоти, до дигідроксибензойних – протокатехова (3,4-ОН), ванілінова (4-ОН, 3-ОСН₃) кислоти. Тригідроксибензойні включають такі речовини, як пірогалолова (2,3,4-ОН), галова (3,4,5-ОН), бузкова (4-ОН, ОСН₃-3,5) кислоти. Оксибензойні кислоти широко поширені в рослинах. Вони зазвичай присутні в них у зв'язаній формі і вивільняються при гідролізі. Наявність ванілінової і, особливо, бузкової кислот характерна для деревних рослин, так як ці кислоти у вигляді ефірів входять до складу лігніну [10-16].

Галова кислота виявлена в рослинах, як у вільному вигляді, так і у вигляді димера – метадигалової кислоти. Складний ефірний зв'язок, утворений за рахунок фенольної гідроксильної групи однієї молекули фенолкарбонової кислоти та карбоксильної групи іншої, за пропозицією Еміля Фішера, називається депсидним зв'язком, а сполуки, що містять такі зв'язки, депсидами [9]. Депсиди галової кислоти є вихідними продуктами для утворення гідролізованих танінів.

Група С6-С3 сполук поділяється на дві підгрупи: кумарини та оксикоричні кислоти [10-14]. До оксикоричних кислот (рис. 1б) відносяться п-оксикорична (п-кумарова) (4-ОН, 2,3,5-Н), кавова (4-ОН, 5-ОН, 3,2-Н), ферулова (5-ОСН₃, 4-ОН, 2,3-Н), синапова (3,5-ОСН₃, 4-ОН, 2-Н), хлорогенова (складний ефір кавової і хінної кислот) [17-18], розмаринова (димер кавової кислоти) [19].

Кавова, п-оксикорична, ферулова і синапова кислоти присутні в рослинах, як у вільному, так і у зв'язаному вигляді. Крім широко поширеною п-оксикоричної кислоти, в деяких рослинах знайдена о-оксикорична кислота. Її транс-форма стійка, але цис-форма (яку ще називають кумариновою кислотою) в кислому середовищі миттєво циклізується з утворенням стійкого лактону кумарину. Похідними кумаринів є елагова кислота (рис. 1в) та її диметилловий ефір [20].

Група С6-С3-С6 сполук особливо різноманітна. До цієї групи належать фенольні сполуки, молекула яких містить два бензольних і одне гетероциклічне (піранове) кільця, з загальною назвою флавоноїди [8-9, 12-14, 21-28].

1.1.1. Класифікація флавоноїдів

Флавоноїди (від лат. *Flavus* – жовтий, грец. *Eidos* – вид) – фенольні сполуки, що містять у своїй структурі фрагмент дифенілпропана (С6-С3-С6) і представляють собою найчастіше похідні 2-фенілхромана (флавани) або 2-фенілхромона (флаволи) [8, 22-23].

Термін «флавоноїди», запропонований в 1949 р. англійським вченим Т. Гейссманом та Е. Гинрейнером, спочатку використовувався тільки для флавонів – речовин, що мають жовте забарвлення. Пізніше його почали застосовувати і для інших сполук флавоноїдної природи, що мають інше забарвлення – безбарвні

(флаванони), помаранчеві (аурони, халкони), червоні, малинові, сині (антоціани) [8, 16, 22-24]. Для флавоноїдів характерні наступні основні підгрупи, виходячи з ступеня окиснення гетероциклічного фрагмента [8-9, 16, 22-23]:

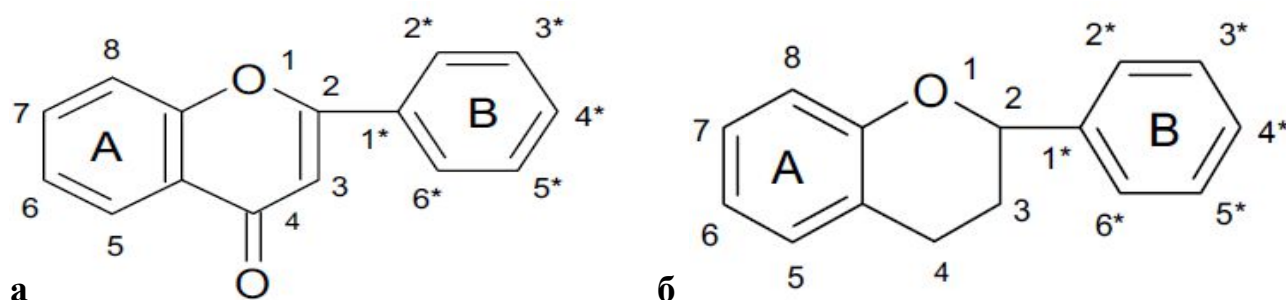


Рис. 1.2. Структурні формули флавона (а) і флаванона (б)

1. Окиснені флавоноїди або похідні флавона (апігеніна):

– **флавоноли**, які при С-3 мають ОН-групу. Цим вони відрізняються від флавона. Найпоширеніші флавоноли – це кверцетин (3,5,7,3*,4*-ОН), мірицетин (3,5,7,3*,4*,5*-ОН), морін (3,5,7,2*,4*-ОН); флавоноглікозиди – рутин (кверцетин-3-О-рутинозид) і гіперозид (кверцетин-3-*D*-галактоза) [8, 22-23];

– структурна відміна **флаванона** від флавона полягає у відсутності подвійного зв'язку між атомами Вуглецю у 2-му і 3-му положеннях. Представником флаванона є гесперидин (5,7,3*-ОН, 4*-ОСН₃), який знаходиться у вигляді глікозиду у плодах цитрусових фруктах, та ліквіритин (7-ОН), виявлений у корені солодки [8, 22-23, 29];

– у **флаванонола** (дигідрофлавонолів), на відміну від флаванона, при С-3 знаходиться ОН-група і, подібно катехінам, молекула флаванонола містить два асиметричних атома вуглецю в молекулі (С-2 і С-3). Природні дигідрофлавонони – аромадендрін і таксифолін [8, 22-23, 30];

– в **ізофлавоноїдів** при С-3 знаходиться фенільна група [8, 22-23, 31];

– **неофлавоноїди** – похідні 4-фенілхромона [8, 22-23];

– **біфлавоноїди** – димерні сполуки, що складаються зі зв'язаних С-С-зв'язком флавононів, флавононів і флавононів [8, 22-23].

2. Відновлені флавоноїди або похідні флаванів:

– **катехіни** (флаван-3-оли) – флавоноїди з найбільшим ступенем відновлення, молекула яких містить два асиметричних атома Вуглецю в пірановому кільці (C2 і C3), тому для кожної молекули можливі чотири ізомери і два рацемату. Так ізомери (+)- катехін і (-)- епікатехін відрізняються конфігурацією гідроксильної групи біля третього вуглецевого атома [8, 22-23, 32-34].

– **лейкоантоціанідіни** (флаван-3,4-діоли) – це лабільні сполуки, що не мають забарвлення. При нагріванні з кислотами вони легко окислюються до відповідних антоціанідинів, стаючи при цьому забарвленими [8, 22-23, 36-38].

Катехіни і лейкоантоціанідіни присутні в рослинах, як у вигляді мономерів, так і у вигляді конденсованих танінів. Особливістю будови антоціанідинів, є наявність вільної валентності у Оксигену в пірановому кільці. Завдяки тому, що антоціанідіни мають позитивний заряд. В кислому розчині вони поводять себе, як катіони і утворюють солі з кислотами, а в лужному, як аніони і утворюють солі з основами. Крім того залежно від рН середовища змінюється забарвлення антоціанідинів [8, 38]. Катехіни, на відміну від більшості фенольних сполук, це безбарвні речовини, які легко окислюються на світлі, при нагріванні і в лужних розчинах, схильні до полімеризації, що ускладнює їх визначення [8].

1.2. Полімерні поліфеноли, їх властивості та класифікація

Крім перерахованих вище фенольних сполук у рослинах містяться і полімерні поліфеноли. До них відносяться таніни, лігніни і меланіни.

Дослівний переклад французького слова «танін» позначає здатність дубити невичинені шкури, перетворюючи їх в шкіру. Ця специфічна реакція взаємодії танінів з колагеном (білком шкіри) призводить до утворення стійкої поперечно зв'язаної структури. Звідси й інша назва – дубильні речовини, в літературі також зустрічається термін «таніди».

За Бейт-Сміт і Суйєном [39] таніни уявляють собою складну суміш водорозчинних близьких за своїм складом фенольних сполук, що мають молекулярну масу від 500 до 3000 г/моль (в окремих літературних джерелах до

5000 г/моль). Крім властивостей, притаманних фенольним сполукам, таніни володіють і специфічними властивостями, такими як утворення малорозчинних сполук з алкалоїдами, желатином та іншими протеїнами. При вживанні деяких продуктів виникає відчуття в'язкості у роті – це є свідченням того, що в них містяться таніни.

Таніни – це суміш різних класів поліфенолів, які до того ж мають різну будову. Саме через це при спробі класифікувати їх виникають певні ускладнення. В даний час найбільш вживаною є класифікація Фрейденберга [39], яка була запропонована в 1933р. Згідно з неї виділяють три основні групи танінів:

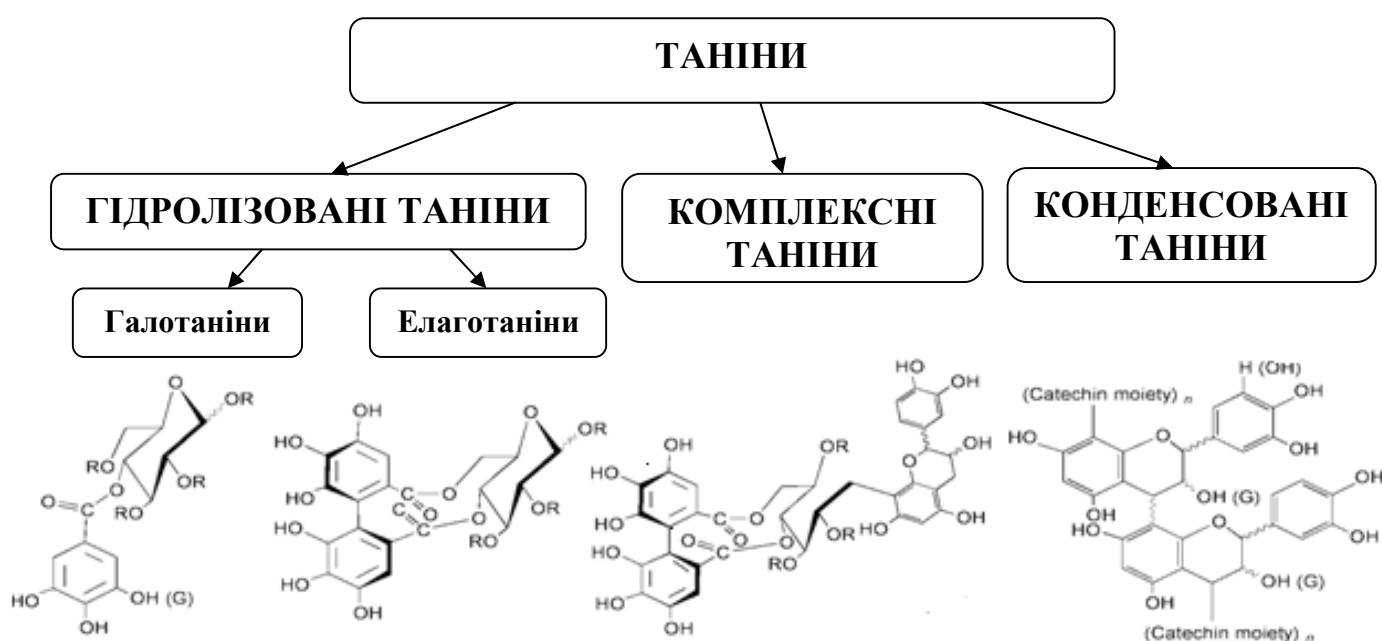


Рис. 1.3. Класифікація танінів за Фрейденбергом [39].

1. **Гідролізовані таніни** уявляють собою суміш складних ефірів фенолкарбонових кислот з моносахаридами або полісахаридами, які в умовах кислотного або ферментативного гідролізу розпадаються на прості складові частини – сахарид та кислоту (галову, елагову, хінну, хлорогенову). Залежно від будови первинних фенольних сполук, які утворюються при повному гідролізі, розрізняють: галотаніни – ефіри галлової кислоти та сахаридів; елаготаніни – ефіри елагової кислоти та сахаридів, ефіри фенолкарбонових кислот, які утворюються при взаємодії галлової з хінною або гідроксикоричними кислотами (хлорогеновою, кавовою, оксикоричною), а також флаванами (катехінгалатами) [39].

2. Конденсовані таніни – похідні флаванолів-3, флавандіолів-3,4 та оксистильбенів. Конденсовані таніни складаються з 12-16 фенольних груп і 5-7 ароматичних кілець, з молекулярною масою близько 5000 г/моль. Зазвичай вони є полімерами катехинів або лейкоантоціанів, або співполімерами цих двох типів флавоноїдних сполук. Конденсовані таніни на відміну від гідролізованих при нагріванні з розведеними кислотами не руйнуються, а підлягають подальшому ущільненню. Конденсовані таніни найбільш поширені в нашій дієті, проте їх будова досі недостатньо добре вивчена [39].

3. Комплексні таніни – полімерні поліфеноли складного складу, утворені галотанінами, елаготанінами та катехінами в різних модифікаціях [39].

1.3. Фенольні сполуки, що містяться у чаю

Чай – тонізуючий напій, що має високі смакові та органолептичні властивості. Чайний напій уявляє собою складну комбінацію хімічних речовин, які багато планово і, в цілому, благотворно впливають на організм людини. Перші дослідження хімії чаю були проведені на початку ХХ століття, але і на сьогоднішній день його точний хімічний склад до кінця не встановлений. У чаї міститься близько 500 різних речовин, поєднання яких унікальне і не може бути замінене ніякими іншими, і тим більш – хімічними препаратами. Чайний лист складається з води і сухих речовин, які поділяють на водорозчинні (41-58%), які ще називають екстрактом, і нерозчинні у воді (42-59%) – це баластні речовини, що залишаються після заварювання у вигляді залишку (табл. 1.1) [40].

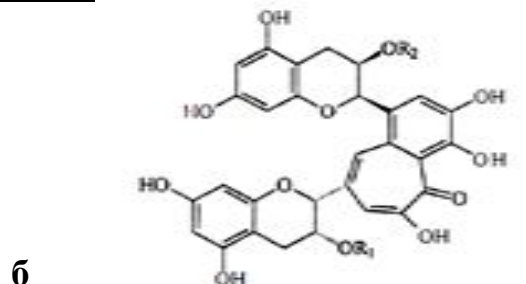
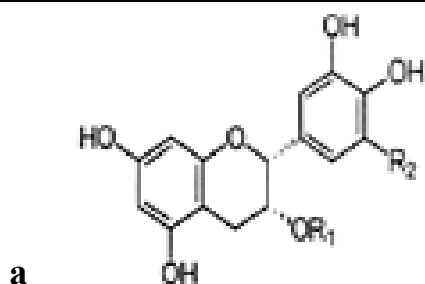
Основну корисність чайного листа і готового чайного напою визначає комплекс фенольних сполук різної природи, таких як похідні флаван-3-олів, флавоноглікозидів (кверцетину, кемпферолу, мірицетину), флавандіолів і фенольних кислот (галової, коричної, хінної, кумарової, хлорогенової) [32, 41-42]. З літератури [32, 43] відомо, що в зеленому чаї переважають похідні флаван-3-олу або катехіни (рис. 1.4, а). Це флавоноїди з найбільшим ступенем відновлення, отже вони володіють найбільшим антиоксидантним потенціалом, схильні до аутоокиснення та

ферментативного окиснення [44]. Взаємодіючи з вільними радикалами, катехіни нейтралізують їх, перетворюючись на стабільні стійкі радикали [45-46].

Таблиця 1.1.

Хімічний склад чаю [40]

Речовини, які екстрагуються	41–58 %	Баластні речовини	42–59 %
Фенольні сполуки (катехіни, флавоноли, антоціани, таніни, тощо)	14–26 %	Білки	20–22 %
Вуглеводи (моносахариди, дисахаріди)	4–5 %	Нерозчинні вуглеводи (целюлоза, крохмаль, геміцелюлоза)	5–18 %
Алкалоїди (кофеїн, гуанін, аденін, теофілін)	2–4 %		
Гідроаскорбінова кислота	2–3 %	Лігнін	6–7 %
Пектинові речовини (гідропектин)	2–3 %	Пектинові речовини (протопектин)	8–9 %
Органічні кислоти (оксалатна, бурштинова, цитратна, молочна тощо)	1 %		
Мінеральні речовини	3–4 %	Інші нерозчинні речовини: жиророзчинні вітаміни (А, К, Е), нерозчинні мінеральні речовини, нерозчинні ферменти	1–2 %
Інші водорозчинні речовини: водорозчинні вітаміни (В1, В2, В3, РР, С, К, U, Р), нітрогенвмісні сполуки (розчинні у воді білки, амінокислоти), ароматичні сполуки, спирти, пігменти (хлорофіл, ксантофіл, каротін)	10–12 %		



Назва ФС		R ₁	R ₂	Назва ФС		R ₁	R ₂
епікатехін	ЕК	Н	Н	Теафлавін	ТФ	Н	Н
епігалокатехін	ЕГК	Галат	Н	теафлавін 3-галат	ТФ3Г	Галат	Н
епікатехін галат	ЕКГ	Н	ОН	теафлавін 3'-галат	ТФ3Г'	Н	Галат
епігалокатехін галат	ЕГКГ	Галат	ОН	теафлавін 3,3'-дигалат	ТФДГ	Галат	Галат

Рис. 1.4. Структурні формули катехінів (а) і теафлавінів (б) [47].

В процесі ферментації чайного листа катехіни піддаються окислювальній біотрансформації в димерні сполуки і в чорному чаї утворюється новий вид поліфенолів – теафлавіни. Теафлавін – продукт димеризації катехіна і галокатехіна, який характеризується унікальною структурою бензпропіна. Структура більшості теафлавінів добре відома (рис. 1.3, б). Теафлавін забезпечує червоно-помаранчевий

колір чаю і відповідає за органолептичні властивості готового напою [47]. Вміст теафлавінів у чорному чаї становить 23 г на 100 г сухої речовини. Похідними сполуками є неотеафлавіни, ізотеафлавіни і теафлавінова кислота. Теафлавіни ефективні проти різних захворювань, включаючи онкологічні, серцево-судинні, діабет та інші. Крім того, до складу чорного чаю входять конденсовані таніни (проантоціанідіни), що утворюються при кислотному гідролізі антоціанідинів; азот-заміщених катехинів; або є продуктом конденсації відповідних амінокислот. Природу деяких полімерних фенольних сполук, які є продуктами окиснення поліфенолів зеленого чаю і в значній кількості присутні в чорному чаї, не вдалося ідентифікувати. В літературі [48] такі сполуки прийнято називати теарубінами. Теарубіни – похідні теафлавінів з більш високою молекулярною масою, з ними пов'язують коричневий колір чорного чаю. З виділених на сьогодні теарубінів слід зазначити продукти реакції гідролізу проантоціанідіна – теафулвіни і теацитрини; ферментативного окиснення галової кислоти – дигаловий ефір; конденсації двох галокатехинів – біофлаванола і теасиненсіна; конденсації катехіна з теогаліном і мірицетином з утворенням еріцетрина [48].

1.4. Реакційна здатність поліфенолів рослинного походження

Поліфеноли мають чітко виражені відновні властивості. Механізм окисно-відновних реакцій можна показати на прикладі одного з найбільш схильних до окиснення представника підкласу флавонолів – кверцетину. Реакція окиснення кверцетину – складний і багатостадійний процес, який перебігає за каскадним механізмом із залученням різних електроактивних груп. При рН 7,7 для кверцетину реєструють три [9, 49] або чотири [50] піки окиснення: при +0,15, +0,30, +0,60, +0,80 В. Перша хвиля при потенціалі приблизно 0,15 В відповідає двохелектронному квазіоборотному окисненню двох ОН-груп у кільці В, який супроводжується відщепленням двох протонів від кожної гідроксильної групи. Інтерпретація інших окисних процесів є поки неоднозначною. Раніше їх пов'язували з окисненням ОН-групи в положенні 3 кільця С і двох гідроксильних груп в кільці В, але останнім часом було показано, що генерований в результаті першого

процесу окислення орто-хінон є нестійким і легко таутомеризується та перетворюється з утворенням декількох продуктів, у яких зберігаються гідроксильні групи кільця В, і які здатні до подальшого окиснення [51]. Серед продуктів окисного розкладання кверцетину ідентифіковані ди- та триоксибензойні кислоти [52].

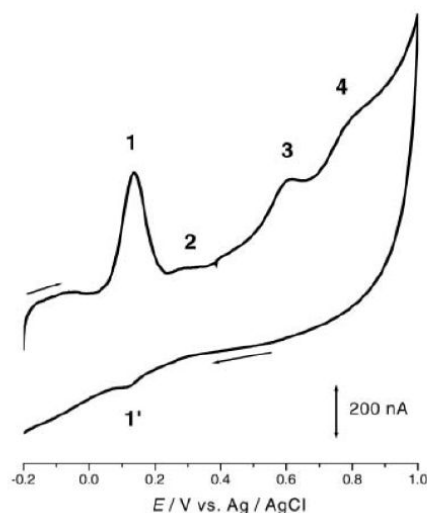


Рис. 1.5. Вольтамперограма кверцетину [52]

У ході окисно-відновної реакції феноли можуть виступати в якості донора протонів або електронів [9]. Яким шляхом буде йти процес, багато в чому залежить від структури поліфенолу, природи вільнорадикальної частинки, умов проведення реакції [53-55]. Вихідний фенол трансформується в один і той же проміжний продукт, іменований феноксильним радикалом. Проміжні продукти окиснення поліфенолів містять у своїй структурі катехольні угруповання і мають спеціальні назви. Похідні, позбавлені одного електрона, називають семіхіноними формами, а двох електронів – хінонними.

Спектр радикальних частинок, з якими можуть взаємодіяти фенольні сполуки, досить широкий. Вони здатні вступати в реакції, як з неорганічними, так і з органічними вільними радикалами. До перших відносяться реакції з радикалами діоксиду азоту, супероксид – аніону, гідроксильним радикалом [56-59]. Вони також здатні взаємодіяти з органічними пероксильними і алкоксильними радикалами різних сполук, а також радикалами ароматичних амінокислот, аскорбат аніону, α -токоферолу та багатьма іншими [60-64].

Великий інтерес викликають реакції поліфенолів з різними формами окисненої аскорбінової кислоти. Аскорбінова кислота дуже легко втрачає електрони з утворенням аскорбат аніон-радикала і потім дигідроаскорбату. У результаті взаємодії дигідроаскорбінової кислоти з поліфенолами може відбуватися регенерація аскорбат аніон-радикала [65-66]. Фенольні сполуки здатні також взаємодіяти з іонами металів змінної валентності, наприклад Феруму(III) та Купрум(II). Фактором, який суттєво впливає на реакційну здатність поліфенолів по відношенню до іонів металів, є рН середовища. При зміні рН значно змінюється відновна здатність фенольних сполук [67-69]. При високих значеннях рН молекули поліфенолів існують переважно в іонізованій формі, що посилює їх відновні властивості [70-71].

На підставі наведених відомостей короткого огляду окисно-відновних реакцій за участю фенольних сполук можна зробити деякі висновки про структурні характеристики поліфенолів, що визначають їх реакційну здатність:

1. Найбільш активними є фенольні сполуки, які мають у своєму складі гідроксильні групи в кільці В і С, а також подвійний С2-С3 зв'язок.
2. Чим більше вільних гідроксильних груп у структурі поліфенолу, тим вище його електронодонорна активність.
3. Реакційна здатність фенолів корелює з їх електрохімічними властивостями.

1.5. Антиоксидантний ефект

Значний інтерес до поліфенолів рослинного походження обумовлений їх антиоксидантними властивостями. Антиоксиданти відіграють важливу роль у регуляції вільно-радикальних перетворень в організмі, істотно впливаючи на його стан. Саме тому важливо проводити дослідження з метою їх виявлення.

Висока реакційна здатність вільних радикалів у фізіологічних умовах призводить до прискорення процесів окиснення, це руйнує молекулярну основу клітини, і викликає в результаті численні патологічні стани. Сполуки, які здатні зв'язувати частинки, що містять неспарені електрони, з утворенням менш активних або зовсім неактивних радикалів, називають **антиоксидантами**. Найбільш

поширеними біоантиоксидантами ряду поліфенолів є флавоноїди, насамперед рутин та кверцетин, які містяться в багатьох рослинах. Антиоксидантний ефект полягає в заміні окисника в ланцюгової реакції вільно-радикального окиснення та запобіганні окисненню ліпідів. Кількісно антиоксидантну активність (АОА) виражають в одиницях ТЕАС (Тролокс – еквівалент антиоксидантної здатності).

Методи дослідження АОА розрізняються за типом джерела окисника та способу фіксації кількості окисненої сполуки (будуть розглянуті нижче). При порівнянні результатів, отриманих різними методами, виникають певні труднощі в їх інтерпретації, пов'язані з відсутністю єдиного стандарту, за яким визначають АОА [72-83].

1.6. Методи визначення фенольних сполук

Єдиного методу для визначення всіх груп фенольних сполук не існує. Слід зазначити не тільки об'єктивну неможливість існування такого методу, але навіть можливості порівняння результатів, отриманих різними методами. Насамперед це пов'язано з великою різноманітністю чисельних груп фенольних сполук, які різняться між собою за будовою та мають різну реакційну здатність. Якісні реакції для визначення поліфенолів засновані на здатності до утворення забарвлених сполук з речовинами різної природи. Найбільш часто використовують такі реакції, як ціанідина проба (проба Синоду); борно-цитратна реакція; реакція зі стибій(III) хлоридом; розчином аміаку та лугів; 1% розчином ваніліну в конц. HCl [84-85].

Сучасні методи кількісного визначення різних груп фенольних сполук в рослинній сировині, лікарських препаратах, продуктах харчування, напоях, тощо повинні мати високу чутливість, специфічність, вибірковість, універсальність, продуктивність, можливість роботи з малими об'ємами проб для автоматизації процесу аналізу, відрізнятися високою точністю і відтворюваністю одержуваних результатів, відповідати цілям і завданням дослідження. Хімічні методи аналізу, такі як гравіметричні та титрометричні, через низьку чутливості практично не використовуються. Сучасним вимогам до аналізу складних систем відповідають фізико-хімічні методи. Однак і тут виникають певні складнощі, пов'язані з тим, що

природні поліфенольні сполуки в залежності від умов проведення аналізу можуть піддаватися трансформації, змінюючи при цьому свій склад і хімічні властивості. Крім того вимоги до методів, які контролюють якість сировини, що містять поліфеноли, постійно зростають, а тому існуючі методики і реагенти не завжди їм задовольняють. У зв'язку з цим пошук нових реагентів для визначення, як суми фенольних сполук, так і окремих їх представників є актуальним завданням аналітичної хімії.

Порівняно рідко для кількісного визначення фенольних сполук застосовують методи полярографії, амперометричного титрування, капілярного зонного електрофорезу [86-90]. Метод **капілярного зонного електрофорезу з електрохімічним детектуванням** використовують для розділення і визначення (-)- епікатехіну, рутину, хлорогенової кислоти і кверцетину [91-93]. **Вольтамперометричні методи** визначення флавонолів в лікарських препаратах засновані на реєстрації висоти хвилі окиснення кверцетину на платиновому електроді в 0,1 моль/л розчині H_2SO_4 або HCl . Однак чутливість визначення в цих методах досить невелика, межа виявлення складає лише $3,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л [94-104]. Електрохімічні методи найчастіше спрямовані на отримання важливої інформації, щодо реакційної здатності фенольних сполук.

Найбільш численні методи і модифікації методів, що згадуються в літературі, використовують спектрофотометричну реєстрацію аналітичного сигналу, як найзручнішу і доступну. Серед **спектрофотометричних** превалюють **методики**, засновані на власному поглинанні поліфенолів в ближній УФ і видимій ділянках спектра, а також використовують реакції окиснення реактивом Фоліна-Денніса або Фоліна-Чокальтеу, утворення комплексних сполук з металами – Sb(III) , Sn(II) , Al(III) , V(IV) та їх комплексними сполуками.

Простотою у виконанні і достатньо високою точністю відрізняються **методики прямої або диференціальної спектрофотометрії** для визначення поліфенолів за максимумом у спектрах власного поглинання в **УФ- та видимій ділянках спектра**. У спектрах поглинання для метанольних розчинів флавоноїдів присутні дві характерні смуги: в області 320-430 нм і 240-285 нм. Ці смуги обумовлені

поглинанням кільця-В і кільця-А в структурі флавоноїду і пов'язані з внутрішньо молекулярними переходами електронів. Відносна помилка прямого спектрофотометричного визначення складає 2-5 % і може бути знижена в диференціальному методі аналізу до 0,5-1,0 %. Робочий інтервал концентрацій спиртових, водноспиртових розчинів становить від 5 до 20 мкг/мл. Методики характеризуються високою чутливістю, але мають низьку селективність [105-110].

Спектрофотометричні методики, засновані на реакції комплексоутворення поліфенолів з іонами різних металів, а також з цитратно-борним реактивом в кислому середовищі, є досить широко поширеними при визначенні загальної кількості фенольних сполук у рослинах [111-117]. Методика спектрофотометричного визначення поліфенолів з борною кислотою характеризуються простотою та доступністю, межа визначення становить 1-10 мкг/мл, відносна похибка не перевищує 3,5 %, але результати, отримані у ході аналізу рослинних об'єктів, є не точними. Тому цю методику можна використовувати лише для приблизної оцінки вмісту поліфенолів [118].

Більшою специфічністю володіють, хоча і не позбавлені недоліків, **спектрофотометричні методики** визначення фенольних сполук, що утворюють забарвлені **комплексні сполуки з іонами металів** [119-128]. Ці комплекси мають максимум в спектрах світлопоглинання в інтервалах довжин хвиль 385-460 нм з алюміній хлоридом, 385-500 нм, з цирконій хлоридом та 400-455 нм з галій нітратом, що дозволяє кількісно визначати вміст поліфенолів 1-2 мкг/мл; 0,9-1,0 мкг/мл, 0,5 мкг/мл відповідно. Отримати близьке до істинного значення вмісту поліфенолів у рослинному об'єкті за реакцією комплексоутворення з металами можливо лише за наявності у цих сполук однакової кількості комплексоутворюючих центрів. Так іони Алюмінію утворюють інтенсивно забарвлені комплекси тільки з деякими представниками поліфенолів, що мають у своєму складі комбінацію гідроксильної і карбонільної груп та/або орто-діокси групи [117-123]. До такого роду сполук відносяться флавони і флавоноли, які переважають у складі багатьох лікарських рослинних препаратів. Незважаючи на зазначені недоліки, методика знайшла широке застосування при встановленні

сумарного вмісту флавоноїдів у рослинній сировині та лікарських препаратах. У якості стандарту використовують кверцетин, кемпферол або їх глікозиди.

Для кількісного визначення суми фенольних сполук у рослинних об'єктах використовують **спектрофотометричну методику з реактивом Фоліна-Чокальтеу або Фоліна-Денніса**, яка ґрунтується на реакції утворення інтенсивно забарвленої форми відновленого 18-молібдовольфрамодифосфата в лужному середовищі, яке створюють насиченим розчином натрій карбонату. При цьому інтенсивність забарвлення при довжині хвилі 760 нм дозволяє судити про загальний вміст фенольних сполук у рослинному об'єкті і АОА [15, 33, 87, 128-138]. Детальніше ця методика буде розглянута далі.

Спектрофотометричні методики дозволяють не тільки визначати вміст індивідуальних представників та груп поліфенолів, суму фенольних сполук у рослинних об'єктах, а й дають змогу оцінити антиоксидантну активність [73, 78-81, 129-142]. Для **оцінки АОА** використовують реакцію комплексоутворення антиоксиданту з 2,2-біс-азіно-3-етілбензтіазолін-6-сульфою (АБТС), у результаті якої отримують катіон-радикал, або з 2,2'-діфеніл-1-пікрілгідразилом (ДФПГ) з утворенням стабільних радикалів. Серед сучасних методів визначення АОА слід зазначити **FRAP** (Ferric Reducing Antioxidant Power), заснований на реакції відновлення Fe(III) до Fe(II). У якості реагенту здатного відновлюватися в присутності антиоксиданту запропонований Fe(III)-трипіридилтриазіновий комплекс (перехід забарвлення від безбарвного до блакитного). Методика проста та експресна, проте утворення комплексу відбувається в кислому середовищі при рН 3,6 і за допомогою методу FRAP не можна визначати речовини, які погано розчиняються у воді [143].

Метод **CUPRAC** (CUPric Reducing Antioxidant Capacity) базується на окисно-відновній реакції антиоксидантів з біс-неокупроїном-міді(II) (Cu(II)-nc), яка перебігає в середовищі аміачно-ацетатного буферного розчину при рН 7. У результаті реакції утворюється помаранчево-жовтий катіон-хелатний комплекс неокупроїну-міді(I) (Cu(I)-nc), з максимумом світлопоглинання при $\lambda = 450$ нм. Метод CUPRAC є універсальним методом для визначення АОА в рослинних

об'єктах, що містять фенольні кислоти, флавоноїди, каротиноїди, антоціани, а також меркаптани, вітаміни С і Е, а також синтетичних антиоксидантів. Час реакції для найбільш активних поліфенолів (наприклад, флавоноїдів), що протікає при кімнатній температурі, становить 30 хв. Визначення фенольних сполук, що мають низьку відновлювальну здатність (наприклад, деяких фенольних кислот) Cu(II) -нс вимагає підігрівання розчину. Метод CUPRAC простий у виконанні і не вимагає дорогого устаткування. За допомогою методу CUPRAC можна визначати, як гідрофільні, так і ліпофільні антиоксиданти. На відміну від методики з 2,2'-діфеніл-1-пікрілгідразилом Cu(I) -нс практично нечутливий до негативного впливу кисню повітря, сонячного світла, вологості і в деякій мірі рН [80-81].

Здатність поліфенолів до комплексоутворення покладені в основу **люмінесцентного методу**, що є на порядок більш чутливим, ніж спектрофотометричний, межа визначення становить 0,05-1 мкг/мл. Флуориметричні методики широко використовують для попередньої ідентифікації біологічно активних речовин у рослинних об'єктах. Якщо ж необхідно кількісно оцінити вміст тих чи інших речовин, то треба спочатку провести операцію розділення за допомогою різних видів хроматографії [87, 144-152].

У роботах [150-152] запропоновані прості, чутливі, експресні люмінесцентні методики, які ґрунтуються на реакції утворення комплексів поліфенолів з іонами Ітрію(III), Скандію(III), Тербію(III). Також показана можливість застосування цих методик для визначення суми ФС та флавоноїдів (кверцетину, рутину, моріну) у рослинній сировині та фармпрепаратах, консерванту пропілгалату в косметичних оліях, антиоксидантів – катехінів у чаї, хлорогенової кислоти в зернах кави. В цих методиках не використовують токсичних реагентів та коштовного обладнання, аналіз рослинної сировини на вміст ФС займає мало часу.

Для визначення АОА флуориметричним методом, наприклад методом ORAC (Oxygen Radical Absorption Capacity), використовують різницю часу флуоресценції комплексу з додаванням та без додавання антиоксиданту. Метод простий у виконанні, проте досить тривалий у часі та потребує дотримання ряду умов, щодо утворення стійких радикалів та їх використання [87, 153].

Методики засновані на **хемілюмінесцентному детектуванні** володіють найбільшою чутливістю і найчастіше використовуються для оцінки АОА. Найбільшого поширення набули методики, засновані на реакції між люмінолом і 2,2-азо-біс-(2-амідінпропаном) (АБАП) у лужному середовищі при рН 8-10. АБАП при нагріванні розкладається на два вільних радикала, а інтенсивність хемілюмінесценції є мірою кількості радикалів. У присутності антиоксидантів кількість радикалів зменшується, а разом з цим падає і інтенсивність хемілюмінесценції [154-156].

З метою виявлення фенольних сполук у рослинних об'єктах широко використовують **хроматографію** на папері, в тонкому шарі сорбенту і метод високоефективної рідинної хроматографії (ВЕРХ) з фотодіодним матричним детектуванням. Виявлення компонентів на хроматограмі здійснюється в УФ світлі. Ці методи дають можливість одночасно визначати у суміші вміст індивідуальних представників фенольних сполук в аналізованих об'єктах, аж до $5\text{-}6 \cdot 10^{-8}$ моль/л, але вимагають коштовного та складного устаткування, спеціальної пробопідготовки (екстракція або дериватизації) і, як результат, малоприсадибні для рутинного аналізу. Крім того дозволяють визначати обмежену кількість фенольних сполук через те, що структура деяких поліфенолів не встановлена, а комерційні стандарти можуть бути недоступні. Зазвичай методами хроматографії не враховується вміст танінів, фенольних дитерпенів і летких фенольних сполук [157-179].

Методи, що використовують біологічні маркери. В [180-183] наведена методика для кількісної оцінки антиоксидантної активності *in vitro* Силіцій гідриду та доступних водорозчинних антиоксидантів. Експеримент включає визначення окисно-відновних потенціалів і рН та клітинну фотосенсибілізацію методом спектрофотометрії.

1.6.1. Методи визначення танінів

Для представників групи конденсованих і гідролізованих танінів існують специфічні методи виявлення і ідентифікації, які вимагають додаткового розгляду. Класичними методами визначення вмісту танінів є гравіметричний і титрометричний

методи. Гравіметричний метод заснований на здатності танінів осаджуватися желатином, іонами важких металів, шкірним (гольєвим) порошком, його недоліком є довготривале визначення.

Титрування розчином желатину, в основу якого покладено здатність танінів осаджуватися білками (желатином). Метод високоспецифічний та дозволяє встановити справжній вміст танінів, але є досить тривалим при виконанні, встановлення точки еквівалентності залежить від людського фактора [184].

Перманганатометричний метод (ГОСТ19885-74) (метод Левенталя в модифікації Курсанова) ґрунтується на реакції окиснення танінів калій перманганатом у кислому середовищі в присутності індикатора і каталізатора індігосульфокислоти. У точці еквівалентності забарвлення розчину змінюється від синього до золотисто-жовтого. Особливості визначення: титрування проводиться в сильно розведених розчинах, при кімнатній температурі в кислому середовищі, перманганат додається повільно, по краплях, при інтенсивному перемішуванні. Метод економічний і простий у виконанні, але недостатньо точний, оскільки калій перманганат окисляє частково і низькомолекулярні фенольні сполуки. До недоліків методу можна також віднести те, що калій перманганат готують як вторинний стандарт, оскільки вихідний реагент важко отримати в хімічно чистому стані; реакції за участю калій перманганату можливі у строго стандартизованих умовах (рН, температура і т. д.) [185].

Комплексометричне титрування трилоном Б з попереднім осадженням танінів цинком сульфатом. Наприклад цей метод використовують для кількісного визначення таніну в сировині сумаху дубильного і скупії шкіряної. У якості індикатора застосовують ксиленоловий помаранчевий [2].

До фізико-хімічних методів кількісного визначення дубильних речовин відносяться спектрофотометричний, амперометричний метод та метод потенціометричного і кулонометричного титрування.

Спектрофотометричний метод визначення заснований на здатності танінів утворювати забарвлені хімічні сполуки з солями Феруму(III) [186], Купруму(I) [187], Купруму(II) [188-190], амоній молібдатом, фосфорно-вольфрамовою

кислотою, реактивом Фоліна-Денніса або Фоліна-Чокальтеу, ваніліном та іншими речовинами. Найбільш вживаними є спектрофотометричні методики визначення танінів, які засновані на їх окисненні у лужному середовищі реактивом Фоліна-Денніса або Фоліна-Чокальтеу (ІСО 14502-1-2010 ГОСТ) [87, 134-138]. У результаті реакції утворюється інтенсивно забарвлені продукти – гетерополісині з максимальною смугою поглинання при 720 нм. Ці методики характеризуються високою точністю, надійністю, відтворюваністю, але вони неселективність відносно великої кількості відновників. Набагато більш селективним реагентом є ванілін, який утворює інтенсивно забарвлені комплекси в кислому середовищі тільки з деякими представниками флавонолів і дигідрохалконів, що мають у своїй структурі одинарний зв'язок у положенні 2,3 за наявності вільних мета-орієнтованих гідроксильних груп кільця-В [190-193]. До такого роду сполук відносяться конденсовані таніни та катехіни. У ході реакції електрофільного заміщення утворюються комплекси, що мають інтенсивне червоне забарвлення з максимумом смуги світлопоглинання при 500-520 нм. Однак застосування ваніліну у якості реагенту для визначення поліфенолів у досліджуваних об'єктах найчастіше дає помилкові результати. Це пов'язано з наявністю в рослинній сировині інших груп поліфенолів, з якими ванілін не реагує.

Для ідентифікації конденсованих танінів у рослинних об'єктах, використовують **тонкошарову хроматографію** з попередньою екстракцією водно-етанольним розчинником. В якості стандартного зразка використовують катехін [195-198].

Сутність **амперометричного методу** полягає у вимірюванні електричного струму, що виникає при окисненні ОН-груп природних антиоксидантів фенольної природи на поверхні робочого електрода при певному потенціалі [199].

Для методу **потенціометричного титрування** 0,02 моль/л розчином калію перманганату визначення кінцевої точки титрування проводиться методом Грана з використанням комп'ютерної програми "ГРАН v.0.5" [200].

Кількісне визначення танінів методом **кулонометричного титрування** полягає у використанні реакції поліфенолу з гіпойодит-іонами, які утворюються за реакцією

диспропорціонування електрогенеративного Йоду з 0,1 моль/л розчину калій йодиду в фосфатному буферному розчині при рН 7,8 на платиновому електроді при постійній силі струму 5,0 мА [201].

З огляду літератури можна зробити висновок, що визначення та вивчення фенольних сполук рослинного походження та їх антиоксидантної здатності є одним з пріоритетних напрямків аналітичної хімії. Спектрофотометричні методики визначення фенольних сполук є основними серед інших методик, включаючи хроматографічні. Оскільки тільки спектрофотометричні методи здатні давати інтегральну оцінку тих чи інших показників, включаючи загальний вміст фенолів та антиоксидантну активність. СФ методики характеризуються простотою виконання, експресністю, високою чутливістю. Спектрофотометрична методика, що ґрунтується на реакції окиснення поліфенолів у лужному середовищі (рН 11,4) гетерополікомплексом структури Доусона – реактивом Фоліна-Чокальтеу є стандартною і майже незамінною для визначення суми фенольних сполук.

1.7. Характеристика гетерополікомплексів, їх структурні особливості

Гетерополікомплекси (ГПК) – комплексні сполуки аніонного типу, що містять у внутрішній координаційній сфері в якості лігандів аніони неорганічних ізополікислот – молібденових, вольфрамових, рідше ванадієвих, ніобієвих та ін. ГПК характеризуються унікальними властивостями і можливостями модифікації їх складу і властивостей.

Гетерополікомплекси структури Кеггіна (12–ГПК) – $XM_{12}O_{40}^{n-}$ ($X = P^V, As^V, Si^{IV}, Ge^{IV}, Ga^{III}$; $M = Mo^{VI}, V^V, W^{VI}$) або їх комбінації застосовують для визначення центральних атомів (X) [202-206]. На практиці також використовуються інтенсивно забарвлені малорозчинні іонні асоціати, які утворюються при взаємодії 12-ГПК з катіонними формами органічних барвників, у тому числі і для концентрування їх сорбцією на твердих сорбентах [202, 204-207].

Проте використання гетерополіаніонів структури Кеггіна для визначення різного роду окисників і відновників не знайшло широкого застосування, на відміну від гетерополіаніонів структури Доусона. Гетерополіаніони структури Доусона

(18-ГПК) мають загальну формулу $[(X^{n+})_2M_{18}O_{62}]^{(16-2n)-}$, де (X^{n+}) – центральний атом (P^V , Si^{IV} , S^{VI} , As^V), M – атоми ліганду (Mo^{VI} , V^V , W^{VI}). Атом ліганду утворює октаедри MO_6 , які оточують центральний атом. ГПК структура Доусона – це похідні від структури Кеггіна, з якою видалений один триплет з утворенням $[X^{n+}M_9O_{34}]^{n-}$, поєднання двох таких залишків утворює 18-ГПК (рис. 1.7).

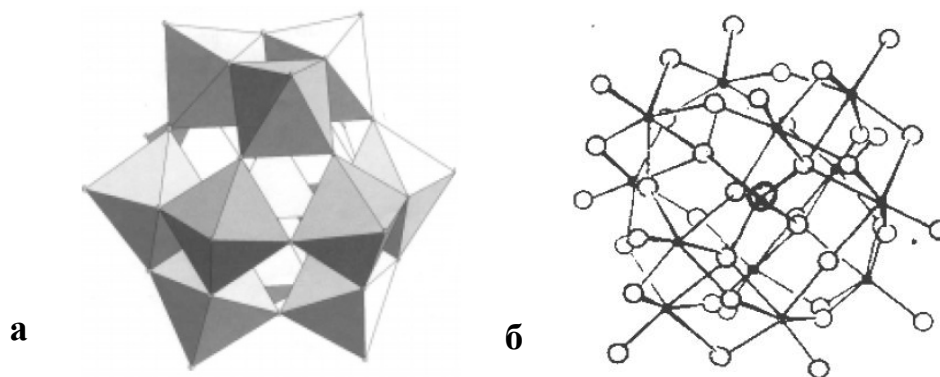


Рис. 1.6. Гетерополіаніон структури Кеггіна $[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$, зображений у вигляді поліедричної моделі (а) та зв'язків М-О (б) [202].

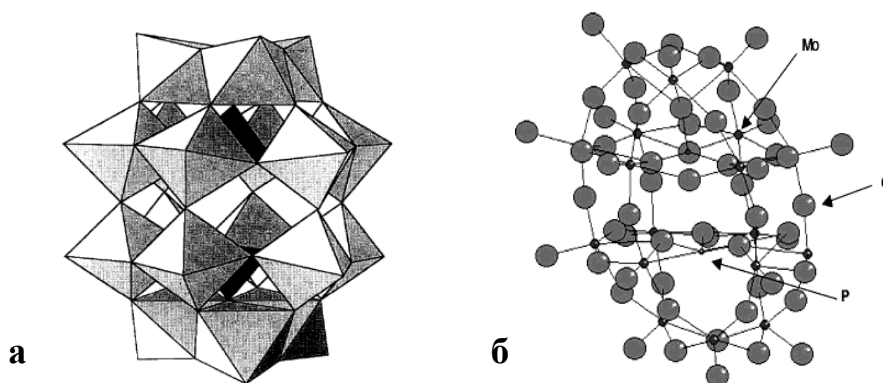


Рис. 1.7. Молібдофосформолібденовий гетерополіаніон структури Доусона $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$, зображений у вигляді поліедричної моделі (а) та зв'язків М-О (б) [202]: Мо – Молібден, Р – Фосфор, О – атоми Кисню.

Гетерополіаніони (ГПА) структури Доусона мають два ізомери – α -ізомер та β -ізомер. У α -ізомері центральний атом, оточений дев'ятьма восьмигранниками $[XM_9O_{31}]^{n-}$, які пов'язані один з одним через Кисень, має D_{3h} симетрію. У β -ізомера один триплет повернутий на $\pi/3$ навколо вісі Х-Х. β -ізомер центросиметричний (D_{3h}), але у наслідок внутрішньої напруги менш стійкий, ніж α -ізомер [202, 204].

ГПА структури Доусона приймають участь в реакціях пов'язаних з переносом електронів. Під дією зовнішнього потенціалу, видимого або УФ- випромінювання, каталізаторів вони здатні приймати або віддавати електрони.

1.8. Окисно-відновні властивості гетерополіаніонів структури Доусона

Дані електрохімічних досліджень свідчать про ступінчатий механізм відновлення 18-ГПА у нейтральному середовищі з прийняттям послідовно двох і більше електронів без руйнування структури гетерополіаніона. Електрони приймають іони-ліганди ГПА (Mo^{VI} , V^{V} , W^{VI}), змінюючи ступінь окислення на одиницю. У результаті утворюються інтенсивно забарвлені продукти реакції відновлення, які називаються загальноприйнятим терміном – «гетерополісині» [202].

Процес відновлення ГПК залежить від рН розчину. Під час відновлення ГПА протонується, у результаті чого збільшується об'ємна густина заряду і відповідно його основність. Ступінь протонізації залежить від рКа отриманої гетерополікислоти. Так у водному розчині вольфрамові гетерополіаніони здатні відновлюватися в залежності від рН розчину з приєднанням одного, трьох або п'яти електронів, а молібденові – з приєднанням двох, чотирьох і шести електронів [202-203]. Дослідження Поупа [202] показали, що молібденовісні ГПА (18-МФК) у кислому або нейтральному середовищі можуть приймати до шести електронів. При цьому в даних умовах молібденові 18-ГПА легше відновлюються (потенціал напівхвилі змінюється від 0,4 до 0,2 В), ніж вольфрамові (потенціал напівхвилі змінюється від 0,1 до 1 В). Серед усіх відомих 18-ГПА окисно-відновний потенціал молібденових найбільший [208]. Для пари $18\text{-МФК}_{\text{ox}}/18\text{-МФК}_{2\text{-e red}}$ він змінюється від 0,6 В при рН 2 до 0,4 В при рН 6, потім залишається постійним. В апротонних розчинниках молібденові ГПА можуть утворювати одноелектронні сині, в яких із зменшенням рН (протонізації аніону) відбувається процес диспропорціонування з утворенням двоелектронної сині [209-213]. Залежність потенціалу 18-МФК від рН дозволяє варіювати окисно-відновними властивостями ГПА. Це в свою чергу дає

можливість застосовувати 18-МФК для селективного визначення широкого кола відновників.

Крім того, як показали автори [202-203, 214-216], змінюючи склад лігандної сфери ГПА, можна змінювати і його окисно-відновні властивості. Відповідно до даних спектроскопічних досліджень [202, 217], відновлення 18-ГПА відбувається за рахунок одного з екваторіальних атомів Молібдену або Вольфраму. У відновленому продукті реакції відбувається делокалізація електрона на дзеркально розташований атом Молібдену(VI). Для різнолігандних 18-ГПА автори [203] вважають, що електрон, локалізований на більш електронегативному металі, який знаходиться в екваторіальному положенні. Це підтверджується наявністю у різнолігандних 18-ГПА більш позитивного потенціалу, ніж у 18-МФК. Автори [217-218] досліджували металзаміщенні 18-ГПА із загальною формулою $K_xP_2W_{17}(M^{n+} H_2O) \cdot yH_2O$ ($M^{n+} = Fe^{3+}, Cu^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{3+}, Mn^{2+}$) і підтвердили, що перехідні метали відновлюються і реокислюються у середині гетерополікомплексу без її деструкції.

1.9. Використання 18-молібдодифосфату в хімічному аналізі

ГПА структури Доусона широко використовують як у кислотному, так і окисно-відновному каталізі, наприклад у синтезі органічних речовин, але вони менш затребувані в аналітичній хімії, у порівнянні з 12-ГПА. 18-ГПА не можна використовувати для визначення центральних атомів, тому що вони утворюються у їх надлишку реагенту. На відміну від ГПА структури Кеггіна, що утворюється на холоді, отримання ГПА Доусона вимагає тривалого кип'ятіння розчину. З іншого боку кеггіновські ГПА практично миттєво руйнуються з утворенням фосфату і молібдату (вольфрамату) у лужному середовищі, у той час як доусоновські ГПК мають достатню стійкість в широкому діапазоні рН, що дозволяє істотно розширити коло визначуваних об'єктів. Крім того, 18-ГПА володіють більш високим окисно-відновним потенціалом (приблизно на 0,2 В більш позитивним), ніж 12-ГПА.

В літературі є відомості щодо використання 18-МФК для модифікації електроду з покриттям із електроноскручених нановолокон полівінілового спирту на

підкладці з індій-олово оксиду [217-218] для визначення різного роду органічних відновників, а також для модифікації скловугільних електродів [208, 219-224].

У попередніх роботах [225-233] встановлено що, реакція взаємодії 18-молібдодифосфату з деякими відновниками, такими як аскорбінова кислота, цистеїн, парацетамол, адреналін, перебігає з великою швидкістю, яка мало залежить від температури. Гетерополісині, що утворюється у ході реакції стабільні протягом тривалого часу та мають більш високі молярні коефіцієнти, а ніж кеггіновські. Методики визначення з 18-МФК характеризуються високою чутливістю, надійністю, селективністю, відтворюваністю одержаних результатів. Показана можливість використання 18-МФК для спектрофотометричного та проточно-інжекційного визначення цистеїну в біологічно активних добавках та кормі [225], епінефрін [226], п-амінофенолу [227-228], аналгіну [229] у лікарських препаратах; аскорбінової кислоти у лікарських препаратах, соках та напоях [230-232], а також СФ методика одночасного визначення відновника – аскорбінової кислоти та окисника – нітрит-іонів при спільній присутності у м'ясних виробках та тест-визначення АК у соках та напоях [233].

1.10. Реактив Фоліна-Денніса та Фоліна-Чокальтеу

У 1912 р. Фолін та Денніс запропонували новий реагент для визначення фенолів та їх похідних з використанням фосфорвольфрамомолібденового ГПК [234].

Чокальтеу вдосконалив синтез реактиву Фоліна-Денніса, збільшивши частку молібдату і замінив натрієві солі на літієві, тим самим зменшивши ймовірність випадання ГПА в осад [135, 235-239]. У порівнянні з реактивом Фоліна-Денніса (ФД) реактив Фоліна-Чокальтеу (ФЧ) дає дещо більшу чутливість і кращу відтворюваність.

Реактив ФД (ФЧ) іноді помилково відносять до ГПК структури Кеггіна або описують як суміш молібденового і вольфрамового ГПК фосфору структури Доусона. У 1920 р. Ву виділив два структурних класи молібденових ГПК Фосфора ($P_2O_5:Mo(W) = 1:18$ и $1:24$ серій) і описав склад реактиву ФД (ФЧ) як суміш

амонійних солей гетерополікіслот брутто-формул $3(\text{NH}_4)_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 13\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3$, $3(\text{NH}_4)_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot 14\text{WO}_3 \cdot 4\text{MoO}_3$ [235-236]. Структура цього ГПК була розшифрована тільки в 1952 р. Доусоном [208]. Віднесення молібдовольфрамів ГПА, які входять до складу реактиву ФЧ, до доусонівських комплексів підтверджується способом синтезу, який включає тривале кип'ятіння розчину (не менше восьми годин), тим, що на відміну від кеггінівських ГПА він є стійким у лужному середовищі. У той час як ГПС, які утворюються при відновленні молібдовольфрамів ГПА Кеггіна з невеликою кількістю атомів молібдену, 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 в залежності від глибини відновлення знаходяться у межах від 10000 до 24000 $\text{моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$. Сучасне представлення формули цього ГПА має вигляд $\text{P}_2\text{Mo}_n\text{W}_{18-n}\text{O}_{62}^{6-}$ ($n=4-5$) [236]. При використанні цього реактиву в аналізі утворюється одна і та ж інтенсивно забарвлена сполука – молібденова синь з максимумом смуги світлопоглинання при 640-760 нм.

Реактив ФЧ (ФД) характеризується вираженими окисними властивостями, що дає можливість використовувати його для визначення різних відновників навіть зі слабо вираженою реакційною здатністю. Це основний реагент для визначення фенольних сполук, але його також активно використовують для визначення органічних речовин, таких як аденіну, аденозину, аланіну, аніліну, бензальдегіду, креатиніну, цистеїну, цитидіну, цитозину, диметиланіліну, дифеніламіну, ЕДТА, фруктози, гуаніну, гуанозину, гліцину, гістаміну, гістидину, індолу, метиламіну, амінобензойної, аскорбінової, нітрілоцтової, сульфанілової та олеїнової кислот, фенілтіомочевіни, білків, піридоксину, сахарозу, тіосечовини, тиміну, тимідину, триметіламіну, триптофану, урацилу, ксантину та ін., а також деяких неорганічних речовин, наприклад гідразину, гідроксиламоній хлориду, ферум(II) сульфату, марганцю(II) сульфату, калій нітриту, натрій цианіду, натрій метабісульфіту, натрій фосфату, натрій сульфату, станум(II) хлориду ін.

Сучасна спектрофотометрична методика визначення фенольних сполук з використання реактиву ФЧ отримала широке використання завдяки роботам

Синглентона і співробітників [135]. Вони встановили необхідне співвідношення луку та реагенту; оптимальний час реакції і температуру; запропонували використовувати галову кислоту в якості стандарту порівняння, проводити вимірювання оптичної густини при 765 нм, крім того удосконалили синтез 18-молібдовольфрамодифосфату. Все це дозволило поліпшити методику визначення поліфенолів за допомогою реактиву ФЧ з метою отримання надійних і добре відтворюваних результатів. У свою чергу, сума фенолів в рослинному об'єкті, знайдена за допомогою реактиву ФЧ, не тільки добре корелюють з даними, отриманими іншим методом, наприклад ВЕРХ, але також дозволяє оцінити АОА.

Головним і найбільш серйозним недоліком реактиву Фоліна-Чокальтеу є його низька селективність відносно великого числа відновників. Це призводить до отримання завищених результатів і неправильної інтерпретації отриманих даних. Крім того, методика з використанням реактиву ФЧ потребує значного надлишку реагенту, що призводить до великого об'єму стічних вод (не відповідає принципам «зеленої хімії»); низька швидкість реакції призводить до невисокої продуктивності методик (неможливо застосування автоматизованих методик аналізу); утворення нерозчинних речовин з компонентами аналізованого зразка; градувальна функція лінійна у вузькому діапазоні концентрацій; необхідність роботи в сильнолужному середовищі; склад реагенту до кінця невідомий і може змінюватися в залежності від умов синтезу [135, 237].

Подолати вище зазначені недоліки спектрофотометричних методик, які виникають при визначенні ФС з реактивом ФЧ запропоновано у якості аналітичного реагенту використовувати ГПК зі зменшеним вмістом Вольфраму ($n = 2-4$) або перейти до 18-молібденового ГПА, враховуючи його більш високу окислювальну здатність.

1.11. Сорбційно-спектроскопічні методики визначення фенолів

Тест-методи застосовуються для попередньої напівкількісної або кількісної оцінки присутності поліфенолів в зразку, а також для проведення попереднього

скринінгу, відбраковування і встановлення фальсифікації. Особливо це важливо в процесі контролю якості харчових продуктів і лікарських препаратів [240-242].

Твердофазна спектрофотометрія є сучасним гібридним методом аналізу, в якому поєднано динамічну хемосорбцію, обумовлену поєднанням модифікованої поверхні з чутливим елементом, з отриманням вихідного сигналу (оптичної густини) на цій поверхні. У методі твердофазної спектроскопії компонент, що визначають, виділяють на твердій фазі сорбенту та проводять реєстрацію аналітичного сигналу безпосередньо в фазі сорбенту. У такий спосіб проводиться попереднє концентрування аналіту, який жорстко закріплюється у твердій фазі сорбенту, це дозволяє попередити витрати енергії збудження, які не пов'язані з випромінюванням, збільшити чутливості методу, а використання готових чутливих елементів зводить до мінімуму пробопідготовку. Визначення ФС у тестовому варіанті дозволяє значно спростити аналіз та скоротити час його проведення.

У роботах [243-245] показано, що ГПК структури Кеггіна є ефективними гетерофазними редокс-реагентами, які іммобілізуються на кремнеземі у формі іонних асоціатів, які використовуються для спектрофотометричного та тест-визначення мікрокількостей Силіцію(IV), Фосфора(V), Стибію(III) та деяких відновників, зокрема гідразину, АК, дофаміну та йодату.

У роботах [246-250] у якості твердофазних редокс-реагентів запропоновані хелатні комплекси Купруму(II) та Феруму(III), іммобілізовані на кремнеземі, які використовувалися для твердофазно-спектрофотометричного та тест-визначення аскорбінової кислоти, анальгін у лікарських засобах, для тест-оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів харчових продуктів рослинного походження. Ця тест-методика дозволяє вибірково визначати вміст похідних гідроксикоричної кислоти у препаратах ехінацеї, а також оцінити АОА біоактивних сполук у чаях та червоних винах.

У роботах [251-253] закріплені на силікагелі реактив Фоліна, молібдофосфорностибієва та деякі інші ГПК були використані, як аналітичні реагенти, для твердофазно-спектрофотометричного та тест-визначення поліфенолів

та АОА. Методика з реактивом ФЧ дозволяє визначати вміст поліфенолів аж до 1,0 та 14 мг/л за стандартами кверцетин та танін, відповідно.

У роботах [254-257] наведені сорбційно-люмінесцентні та тест-методики визначення кверцетину, рутину, моріну, катехинів, хлорогенової та галової кислот, пропілгалату, а також суми ФС, які ґрунтуються як на власній люмінесценції лігандів, так і на люмінесценції сенсibiliзований органічним лігандом іонів Європія(III), Тербія(III), Ітрію(III) та Скандію(III). В якості сорбентів використовували алюміній фосфат, силікагель, сефрадекс.

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 1

1. Наведені відомості про загальні характеристики та класифікацію фенольних сполук рослинного походження, механізм окисно-відновних реакцій та антиоксидантну дію за участю поліфенолів.

2. Систематизовано літературні зведення, щодо методів визначення фенольних сполук з різною реакційною здатністю. Показано, що спектрофотометричні методики визначення фенольних сполук є основними серед інших методик, включаючи хроматографічні. Оскільки тільки вони здатні давати інтегральну оцінку тих чи інших показників, включаючи загальний вміст фенолів та антиоксидантну активність.

3. Гетерополікомплекси структури Доусона вже більше ста років застосовуються, як головні аналітичні реагенти для визначення відновників. Методика з використанням реактиву Фоліна є стандартною і майже незамінною для визначення суми фенольних сполук. Суттєвим недоліком реактиву ФЧ є його низька селективність відносно великої кількості відновників, що призводить до отримання завищених результатів та унеможлиблює інтерпретацію одержаних даних.

4. Для визначення фенольних сполук в рослинних об'єктах запропоновано використовувати 18-молібдодифосфат, для якого окисно-відновний потенціал є найбільшим серед доусоновських ГПК, методи синтезу контрольовані та добре відомі, а сам реагент стійкий в широкому інтервалі рН. Літературні зведення, щодо застосування 18-молібдодифосфату для визначення суми фенольних сполук відсутні.

РОЗДІЛ 2

ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДИК, ОБ'ЄКТІВ ТА ТЕХНІК
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ**2.1. Реактиви та розчини реагентів, буферні розчини, стандартні речовини.****Використане обладнання**

Використали наступні реактиви та розчини: NaOH «ч.д.а.», NH₄OH «ч.д.а.», H₂SO₄ «ос.ч.», HCl «х.ч.», H₃PO₄ «х.ч.», крижана CH₃COOH «х.ч.», CH₃COOH «ос.ч.», 3 % розчин H₂O₂, насич. розчин Br₂, аскорбінову кислоту «х.ч.», Na₂WO₄·2H₂O «ч.д.а.», Na₂MoO₄·2H₂O «ч.д.а.», Na₃P₃O₉ «ч.д.а.», Na₂CO₃ «ч.д.а.» (б/в), NaHCO₃ «ч.д.а.», CH₃COONa·3H₂O «ч.д.а.», AlCl₃·6H₂O «ч.д.а.», Li₂SO₄ «ч.д.а.», NH₄Cl «ч.д.а.», (CH₃COO)NH₄ «ч.д.а.», KH₂PO₄ «ч.д.а.», Na₂HPO₄·2H₂O «ч.д.а.», Na₂B₄O₇ «ч.д.а.», H₃BO₃ «ч.д.а.», KMnO₄ «ч.д.а.», H₂C₂O₄·2H₂O «ос.ч.», (CH₃COO)₂Zn «ч.д.а.», CuCl₂·2H₂O «ч.д.а.», 96% етиловий спирт «х.ч.», метанол «х.ч.», індигокармін «ч.д.а.», 2,9-диметил-1,10-фенантроліна (неокупроїн) «х.ч.», натрій 2,6-дихлорфенол-індофенолят «х.ч.», ванілін «Мрія», Triton X-100, Трилон Б.

Для приготування розчину 10% алюміній хлориду зважували на аналітичних терезах 1,8 г AlCl₃·6H₂O та розчиняли в 10 мл етилового спирту при незначному підігріві на водяній бані.

Розчин ваніліну готували зважуванням на аналітичних терезах 2 г ваніліну та розчиненням їх в 10 мл етанолу при незначному підігріві на водяній бані.

Для приготування 10⁻² моль/л розчину CuCl₂ зважували на аналітичних терезах 0,1742 г купрум(II) хлориду та розчиняли в 100 мл дистильованої води

7,5·10⁻³ моль/л розчин неокупроїну (Nc) готували шляхом зважуванням на аналітичних терезах 0,039 г 2,9-диметил-1,10-фенантроліна та розчиненням його в 25 мл етанолу.

Для приготування 0,1 моль/л Na₂WO₄ зважували на аналітичних терезах 3,3 г перекристалізованого Na₂WO₄, розчиняли в дистильованій воді, доводили об'єм дистильованою водою до 100 мл. **Перекристалізацію Na₂WO₄ проводили наступним чином:** 250г Na₂WO₄·2H₂O розчиняли в 400 мл дистильованої води,

відфільтровували. До фільтрату додавали 350 мл спирту, осадок, що утворився відфільтровували через воронку Бюхнера та висушували на повітрі.

Для приготування **фосфатного буферного розчину (рН 7,4)** в колбу на 1000 мл вносили 71 мл розчину №1 та доводили об'єм до мітки розчином №2. Для приготування розчину №1 (0,067 моль/л KH_2PO_4) зважували 9,08 г KH_2PO_4 , розчиняли в дистильованій воді у колбі на 1000 мл та доводили об'єм до мітки дистильованою водою. Для приготування розчину №2 (0,067 моль/л Na_2HPO_4) зважували 11,87 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, розчиняли в дистильованій воді у колбі на 1000 мл та доводили до мітки дистильованою водою [258].

Приготування боратного буферного розчину рН 9,5. Змішували 79 мл 0,05 моль/л розчину $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ з 21 мл розчину 0,1 моль/л NaOH або 1,55 г H_3BO_3 розчиняли в 7 мл 1 моль/л розчину NaOH , об'єм доводили дистильованою водою до 50 мл [258].

Для приготування **1 моль/л натрій ацетату, який використовувався в якості буферного розчину (рН 4,3)** 13,6 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в дистильованій воді, доводили об'єм дистильованою водою до 100 мл.

Для приготування **буферного розчину амоній ацетату (рН = 7,0)** в колбі на 100 мл розчиняли в дистильованій воді 7,71 г сухої солі $(\text{CH}_3\text{COO})\text{NH}_4$.

Для приготування **20% розчину натрій карбонату** зважували 20 г Na_2CO_3 (б/в), розчиняли в дистильованій воді, доводили об'єм дистильованою водою до 100 мл.

Вміст ФС у рослинних об'єктах визначають у перерахунку на стандартні речовини. До них висуваються наступні вимоги: ця речовина повинна бути доступною, належати до тієї чи іншої групи фенольних сполук, мати певні хімічні властивості, структурні особливості, реакційну здатність, тобто відображати склад зразка, а отриманий вміст бути якомога ближче до дійсного. У якості стандартних речовин використовували для оцінки вмісту флавонолів кверцетин і рутин, полімерних поліфенолів – галотанін, катехинів – ЕГКГ, для інших поліфенолів – галову кислоту.

Для оцінки реакційної здатності ГПК структури Доусона по відношенню до поліфенолів використовували представники основних класів ФС, вказані у таблиці 2.1. Розчини ФС готували розчиненням наважки твердої речовини в 10 мл 96% етилового спирту при незначному нагріванні на водяній бані (40-50 °С). Усі розчини використовували протягом тижня.

Таблиця 2.1

Індивідуальні представники поліфенолів, які були використанні в дисертаційній роботі

Група, до якої належать фенольні сполуки	Фенольна сполука	Молекулярна маса, г/моль	Маса наважки твердої речовини, мг	Молярна концентрація вихідних розчинів, моль/л
Флавоноли	кверцетин	302	30,2	10^{-3}
	морін	302	30,2	10^{-3}
	рутин	610	70	10^{-3}
Флавонони	ліквіритин	420	5	$1,2 \cdot 10^{-2}$
	гесперідин* 92 %	611	5	$7,5 \cdot 10^{-3}$
Оксибензойні кислоти	галола кислота	170	17	10^{-2}
Кумаріни	елагова кислота	302	3	10^{-2}
Оксикоричні кислоти	хлорогенова кислота	354	3,6	10^{-2}
	розмаринова кислота	360	3,6	10^{-2}
Антоціани	ціанідин-3-глікозид	485	5	10^{-2}
Катехіни	епігалокатехін галат	459	5	$1,1 \cdot 10^{-2}$
Полімерні поліфеноли	галотанін	1700	17	10^{-3}

* – гесперідин в дистильованій воді, метанолі та етанолі не розчиняється, тому для його приготування наважку гесперідину розчиняли в 0,1 моль/л NaOH.

Спектри поглинання в УФ і видимій ділянках вимірювали на спектрофотометрах СФ–26 та СФ–46. рН вимірювали на іономірі ЭВ-74 зі скляним робочим та хлорид-срібним електродами. ЕРС ланцюгу вимірювали на іономірі ЭВ-74 з платиновим електродом та хлорид-срібним електродом порівняння. Екстракти рослинної сировини центрифугували на лабораторній центрифугі Type 310 (Mehenica Precyzyjna, Poland).

2.2. Об'єкти аналізу, які були використані в дисертаційній роботі

У додатку 1 наведені літературні дані, щодо складу рослинних зразків, які були обрані нами для визначення в них суми фенольних сполук. В якості об'єктів аналізу використовували:

1. Таблетки, що містять поліфеноли «Квертин» (Борщагівський ХФЗ, Україна) до складу якого входить кверцетин 40 мг/табл. і допоміжні речовини (пектин, глюкози моногідрат, сахароза, ароматизатор апельсиновий, магнію стеарат, тальк); «Аскорутин» (Борщагівський ХФЗ, Україна) до складу якого входить рутин 50 мг/табл, аскорбінова кислота 50 мг/табл. і допоміжні речовини (цукор, крохмаль картопляний, кальцій стеарат, тальк); «Ascorutin таблетка» (Словацька республіка) до складу якого входить рутин 20 мг/табл., аскорбінова кислота 80 мг/табл. і допоміжні речовини (цукор, крохмаль картопляний, кальцій стеарат, тальк).

2. Табульовані препарати на основі рослинної сировини, які містять фенольні сполуки, «Кратал» (Борщагівський ХФЗ, Україна) до складу якого входить таурин, суміш сухих екстрактів глоду та деревію; «Гінкофар» (БІОФАРМА, Україна) в якості основи містить сухий екстракт гінкго білоби; «Мікстура від кашлю дит.» (Тернофарм, Україна), який містить суміш сухого екстракту кореня алтеї та кореня солодки; «Фламін таб 0,05 г» (Здоров'я, Україна), який містить концентрат безсмертника піщаного; «Альтан» – комплексний препарат з речовин поліфенольної природи – похідних елаготанінів (елагової та галової кислот, етилгалат, альнітанін та ін.), отриманий з суплідь вільхи клейкої та вільхи сірої (Борщагівський ХФЗ, Україна); «Осокор»– дієтична добавка, яка містить сухий екстракт гінкго білоби, біофлавоноїди цитрусових фруктів та аскорбінову кислоту, «Формула 3» – дієтична добавка («Сибірське здоров'я», Росія).

3. Лікарські препарати на основі рослинної сировини, яка містить фенольні сполуки: «Настойка глоду» (Віола, Україна); «Календули настойка» (Віола, Україна); «Софори японської настойка» (Віола, Україна); «Солодки кореня сироп» (Луганський ФЗ, Україна); екстракт «Ротокану», який містить суміш рідких

екстрактів ромашки, календули та деревію, а також допоміжні речовини. У круглих дужках вказана фірма-виробник.

4. Свіжовиготовлені соки ріпчастої та червоної цибулі, білокачанної та червонокочанної капусти, імбиру, салату, апельсина, грейпфрута, лимона.

5. Водно-спиртову витяжку з цедри цитрусових (апельсина, грейпфрута, лимона), квіток гібіскуса (чай «Каркаде») і граната, плодів і квітів шипшини, кореня лопуха, зерен кави, листя сумаху, кори дуба.

6. Неферментовані чаї – «Хейліс»; «Грінфілд Flying Dragon»; «Кволіті»; «Піднебесний чай»; «Кертіс Bountea Білий чай» «Ахмад» та ферментовані чаї – «Хейліс» «Грінфілд Голден Цейлон»; «Кволіті»; «Тянь Шань»; «Ліптон Yellow Label»; «Ахмад «Англійський сніданок»; «Bestsellers»; «Аскольд».

2.2.1. Пробопідготовка рослинних зразків та лікарських препаратів

Пробопідготовка табульованих препаратів: розтирали у ступці 5 таблеток, зважували масу наважки рівну масі однієї таблетки, розчиняли в спирті, який підігрівали на водяній бані до 40-50⁰С, відфільтровували та відбирали аліквоту для проведення аналізу (таблиця 2.2) [2]. Готові розчини зберігали не більше доби.

Таблиця 2.2

Приготування розчинів для аналізу з табульованих препаратів

№	Назва препарату	Маса наважки, г	Об'єм спирту, мл	Аліквота для аналізу, мл
1	«Фламін»	0,192	10	0,25
2	«Кратал»	1,1	25	2
3	«Гінкофар»	0,217	10	1
4	«Аскорутин»(Борщагівський ХФЗ)	0,33	25	0,05*
5	«Ascorutin» (Словацька республіка)	0,232	25	0,05*

* – використовували попереднє розведення для цього до 0,5 мл отриманого розчину додавали 9,5 мл спирту, для проведення аналізу відбирали 0,5 мл цього розчину.

Пробопідготовку лікарських препаратів на основі рослинної сировини (настоянок та сиропу) проводили наступним чином: відбирали 1 мл аналізованого

зразку, доводили об'єм до 10 мл спиртом, відфільтровували і відбирали (0,25...1) мл для проведення аналізу [2, 259].

Пробопідготовка свіжовиготовлених соків полягала у попередньому фільтруванні на воронці Бюхнера та центрифугували протягом 5 хв при 4000 обертів/хв на лабораторній центрифугі. Готові розчини зберігали не більше доби [2, 260].

Для проведення **водно-спиртової екстракції рослинних зразків** до 2,5 г подрібненої наважки аналізованих зразків додавали 25 мл етилового спирту, кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 2 год. Отриманий розчин фільтрували через воронку Бюхнера. Екстракти центрифугували 5 хв при 4000 обертів / хв на лабораторній центрифугі. Готові розчини зберігали не більше доби [2, 259, 261].

Для проведення **водної витяжки поліфенолів з чаю**: чай подрібнювали в ступці, 2,5 г зважували на аналітичних вагах, в колбі на 250 мл змішували наважку чаю з 200 мл гарячої дистильованої води (температура приблизно 100⁰С), кип'ятили протягом 45 хв, відфільтровували отриманий розчин через воронку Бюхнера, охолоджували і доводили об'єм до 200 мл. При цьому досягається ступінь вилучення поліфенолів більше 98% [2, 262-264].

Для проведення **етанольної (метанольної) витяжки поліфенолів з чаю**: чай подрібнювали в ступці, 1 г зважували на аналітичних вагах, в колбі на 25 мл змішували наважку чаю з 10 мл етанолу (метанолу) та кип'ятили протягом 2 год зі зворотним холодильником, відфільтровували отриманий розчин через воронку Бюхнера, охолоджували і доводили об'єм до 10 мл [2, 262-264].

2.3. Синтез 18-молібдодифосфату та реактиву Фоліна-Чокальтеу

Синтез 18-молібдодифосфату (18-МФК) загальної формули $(\text{NH}_4)_6\text{P}_2\text{Mo}_{18}\text{O}_{62}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ проводили згідно з методикою, яка наведена в [230] і є найбільш вдалим варіантом основної методики [265]. Слід зазначити, що в літературі [210, 215, 219, 223, 266-270] представлені й інші варіанти синтезу 18-МФК. Основна проблема, яка виникає при синтезі – це складність отримання

досить чистого речовини. Синтезований 18-МФК забруднюють 12-молібдофосфат (12-МФК), який утворюється під час синтезу та амоній хлорид, який використовують для осадження ГПК з розчину. Для зменшення вмісту цих домішок у 18-МФК використовують фракційне осадження [230].

Методика синтезу 18-МФК, яка використовувалася в даній роботі, полягає в наступному: 100 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ розчиняли в 400 мл води та при перемішуванні додавали 15 мл 88,5% H_3PO_4 і 80 мл 37,3% HCl . Утворений жовтий розчин кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 8 год. У процесі синтезу 18-МФК частково відновлюється (розчин набуває зеленуватого забарвлення). Для отримання жовтої форми ГПК розчин окислювали, додаючи 1-2 мл насиченого розчину Br_2 або 1-2 мл 3% H_2O_2 . Для видалення залишків цих окисників розчин кип'ятили ще 10-15 хв без зворотного холодильника. Після охолодження до розчину при перемішуванні вносять невеликими порціями (по 2 г) тверду сіль амоній хлориду до появи порошкоподібного осаду світло-жовтого кольору – 12-МФК, приблизно 5-10 г амоній хлориду. Осад, що утворився відфільтровували на воронці Бюхнера. У фільтрат (температура розчину 25°C) при постійному перемішуванні продовжуємо вносити невеликими порціями (по 5 г) сухої солі амонію хлориду до повного насичення (приблизно 80-100 г). **Важливим є контроль повного розчинення NH_4Cl !** Дрібнокристалічний порошок яскраво-жовтого кольору, який утворився і є 18-МФК, його відфільтровували через воронку Бюхнера. При наступному додаванні до фільтрату NH_4Cl осад не утворюється. Синтезований 18-МФК висушували на повітрі за відсутності речовин-відновників. Вихід 18-МФК становив 40-43 г. При проведенні синтезу 18-МФК було помічено, що уникнути утворення 12-МФК можна за рахунок збільшення часу синтезу до 12-14 год. При цьому якість 18-МФК значно збільшується.

На відміну від реактиву ФЧ, 18-МФК – суха речовина тривалого строку зберігання. Експериментальні данні свідчать про те, що 18-МФК можна використовувати протягом року. При цьому його окисно-відновні властивості майже не змінюються

Водний розчин $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ (18-МФК) з концентрацією $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л готували розчиненням 390 мг солі $(NH_4)_6P_2Mo_{18}O_{62} \cdot 14H_2O$, яку зважували на аналітичних терезах, в 25 мл дистильованої води. Водний розчинів 18-МФК при зберіганні може частково гідролізувати. Для підвищення стійкості 18-МФК приготований розчин підкислювали 1 моль/л розчином HCl до рН 3-4.

Реактив Фоліна-Чокальтеу синтезували за методикою, яка наведена в [135]: розчиняли 100 г $Na_2WO_4 \cdot H_2O$ та 25 мг $Na_2MoO_4 \cdot H_2O$ в 700 мл води додавали 50 мл 85 % H_3PO_4 и 100 мл 37,3 % HCl . Утворений жовтий розчин кип'ятили зі зворотним холодильником протягом 10 год. У ході синтезу може утворюватися осад – ГПК структури Кеггіна, який забруднює вихідну речовину, розчин відфільтровували на воронці Бюхнера. Після чого до фільтрату додавали 150 г Li_2SO_4 та 50 мл H_2O і кип'ятили протягом 10-15 хв. У процесі синтезу реактив ФЧ, як і 18-МФК, частково відновлюється, тому до розчину ГПК додавали 1-2 мл насиченого розчину Br_2 або 1-2 мл 3% H_2O_2 і кип'ятили без зворотного холодильника ще 10-15 хв для видалення домішок цих окисників. Суміш охолоджували та доводили об'єм дистильованою водою до 1 л. Використання літєвих солей замість натрієвих запобігає можливості утворення малорозчинних сполук між компонентами аналізованого зразка і реактивом ФЧ.

Синтезований розчин слід зберігати протягом трьох місяців у темному прохолодному місті (наприклад, у холодильнику) без доступу речовин-відновників.

2.4. Стандартні методики

2.4.1. Спектрофотометричні методики для визначення фенольних сполук у рослинних об'єктах

Спектрофотометрична методика визначення суми фенолів з використанням реактиву ФЧ [135]: у колбі об'ємом 50 мл змішують 25 мл аналізованого розчину, що містить близько 5 мг фенолу, 5 мл реактиву ФЧ, 15 мл 20% розчину Na_2CO_3 , дистильованою водою доводили об'єм до мітки. Через 20 хв вимірюють оптичну густину при 760 нм.

Спектрофотометрична методика визначення суми фенольних сполук з використанням зменшеною концентрації реактиву ФЧ, яка використовувалася у нашій роботі полягає у наступному: в колбі об'ємом 25 мл змішували аналізований розчин, що містить ФС, 0,3 мл реактиву ФЧ, 3 мл 20% Na_2CO_3 , доводили об'єм дистильованою водою до мітки. Через 20 хв вимірювали оптичну густину при 720 нм.

Спектрофотометрична методика визначення флавонолів із застосуванням алюміній хлориду [117]: в колбу на 10 мл вносили аліквоту аналізованого розчину, що містить флавоноли, 0,2 мл 10% AlCl_3 и 0,2 мл 1 моль/л ацетатного буферного розчину (рН 4,3), дистильованою водою доводили об'єм до мітки. Оптичну густину вимірювали через 30 хв при 410 нм (для рутину) або 430 нм (для кверцетину).

Спектральні характеристики розчинів комплексних сполук (рис 2.1), утворених іонами Алюмінію зі стандартними речовинами: кверцетином (крива 1), моріном (крива 2) та рутином (крива 3) мають максимум смуги світлопоглинання в інтервалі 410-430 нм, у той час як для поліфенолів реальних зразків – 360-380 нм (крива 4-6). Визначення флавонолів в рослинних об'єктах проводилися при $\lambda = 410-430$ нм, тому в отриманні результати кожен раз вноситься систематична похибка, а знайдений вміст ФС може відрізнятися від дійсного.

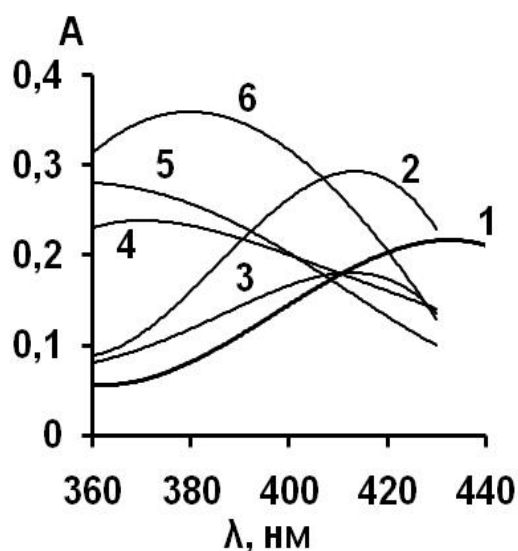


Рис. 2.1. Спектри поглинання розчинів комплексних сполук, які були отриманні в результаті взаємодії алюміній хлориду з кверцетином (1), моріном (2), рутином (3),

сиропом солодки (4), настойкою календули (5), настойкою софори (6).
 $C_{\text{ПФ}} = 10^{-5}$ моль/л, рН = 4,3, $t = 30$ хв, $l = 1$ см, об'єм рослинного зразку 0,1 мл

Градувальні графіки для визначення кверцетину, моріну і рутину лінійні у широкому інтервалі концентрацій і проходять через початок координат (рис. 2.2). При визначення моріну рівнянням градувального графіку має вигляд $A = (1,99 \pm 0,09) \cdot 10^4 \cdot C_{\text{морін}}$, ($R^2 = 0,997$), межа визначення складає 10^{-6} моль/л; для кверцетину – $A = (1,81 \pm 0,08) \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$, ($R^2 = 0,997$), межа визначення – $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л; для рутину – $A = (0,01 \pm 0,008) + (1,85 \pm 0,06) \cdot 10^4 \cdot C_{\text{рутин}}$, ($R^2 = 0,998$), межа визначення – $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

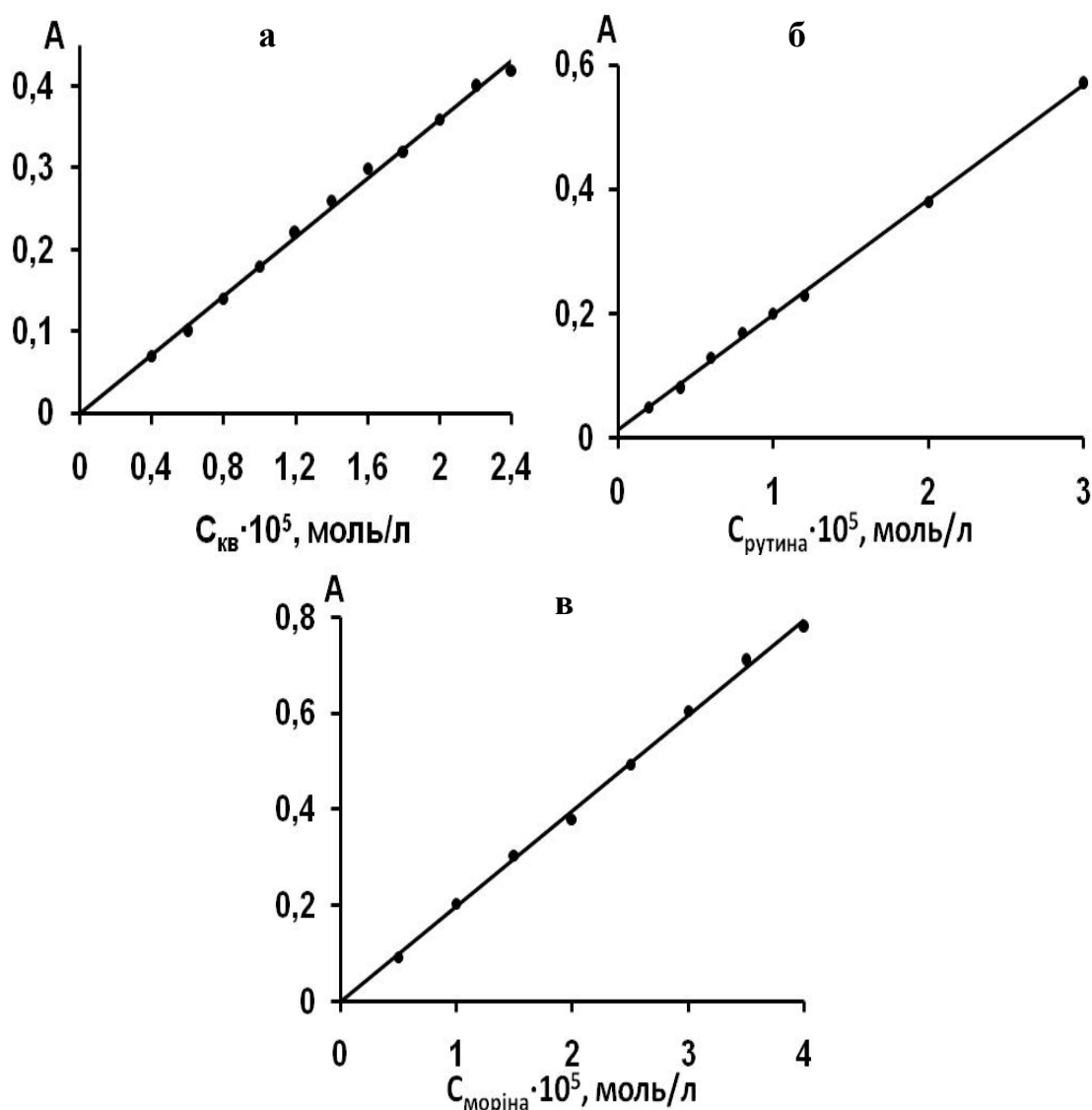


Рис. 2.2. Градувальні залежності визначення кверцетину (а), моріну (б) та рутину (в) з використанням алюміній хлориду. рН = 4,3, $\lambda = 430$ нм (а), $\lambda = 410$ нм (б, в), $t = 30$ хв, $l = 1$ см

Методика визначення вмісту поліфенолів за допомогою ваніліну [191]: до аналізованого метанольного розчину галотаніна або епігалокатехін галата (ЕГКГ) додавали 2 мл етанольного розчину ваніліну та доводили об'єм до 10 мл розчином, що містить етанол і НСІ у співвідношенні 1 : 1. Вміст поліфенолів визначають за величиною світлопоглинання розчинів, яку вимірюють через 15 хв при 500-520 нм.

На рис. 2.3 наведені спектральні характеристики комплексних сполук, отриманих в результаті взаємодії ваніліну з ЕГКГ (крива 2) та галотаніном (крива 1). Максимум смуги світлопоглинання для ЕГКГ відповідає $\lambda = 500$ нм, а для галотаніну $\lambda = 520$ нм.

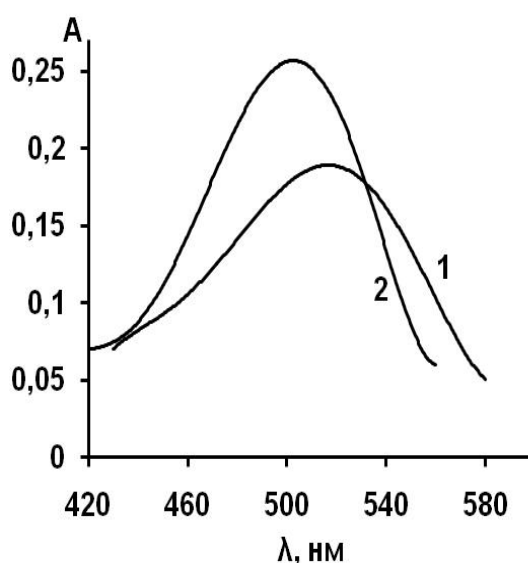


Рис. 2.3. Спектри поглинання комплексних сполук, отримані у результаті взаємодії ваніліну з ЕГКГ та галотаніном. (1) – $C_{\text{ЕГКГ}} = 1,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $l = 1$ см; (2) – $C_{\text{ТК}} = 10^{-5}$ моль/л, $l = 1$ см

Градувальний графік для визначення ЕГКГ з ваніліновим реактивом (рис. 2.4, а) складається з двох лінійних ділянок. Для інтервалу концентрацій $4,4 \cdot 10^{-6}$ – $2,3 \cdot 10^{-5}$ моль/л градувальний графік описується рівнянням $A = (0,04 \pm 0,035) - (7,4 \pm 0,09) \cdot 10^3 \cdot C_{\text{ЕГКГ}}$ ($R^2 = 0,997$), межа визначення складає 10^{-6} моль/л ($l = 1$ см), а для галотаніну (рис. 2.4, б) – $A = (0,03 \pm 0,01) + (2,15 \pm 0,1) \cdot 10^4 \cdot C_{\text{ТК}}$ ($R^2 = 0,997$), межа визначення $5 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

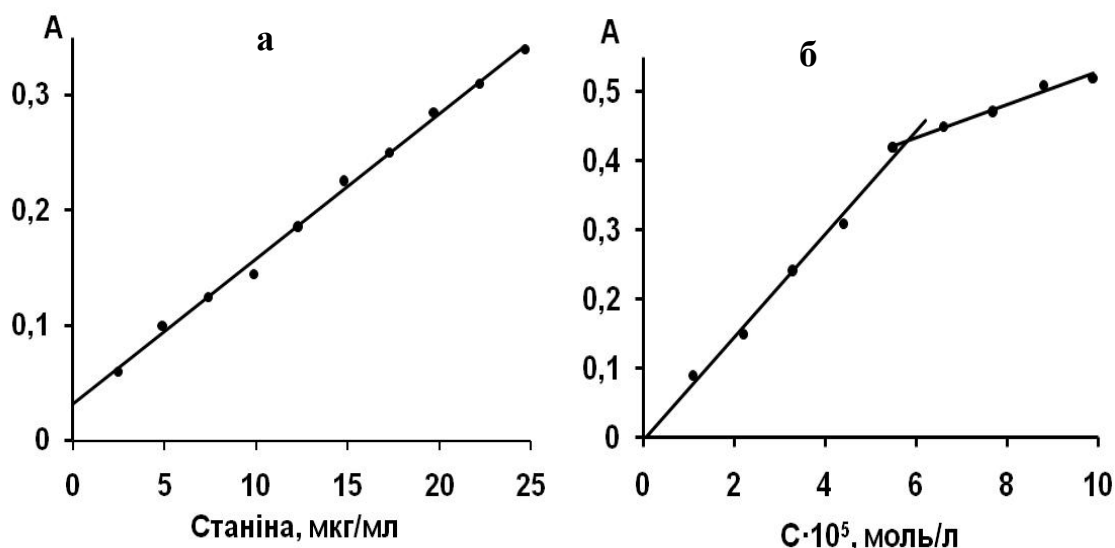


Рис. 2.4. Градувальний графік для визначення галотаніну (а) та ЕГКГ (б) з використанням ваніліну. $\lambda = 520$ нм (а), $\lambda = 520$ нм (б) $t = 30$ хв, $l = 1$ см

Для оцінки антиоксидантної активності використовували **CUPRAC метод [81]**: змішували 1 мл 10^{-2} моль/л CuCl_2 , 1 мл $7,5 \cdot 10^{-3}$ моль/л Nc з аліквотою аналізованого розчину (V_x), який містить поліфеноли, дистильованою водою ($V_{\text{H}_2\text{O}} = 1,1 - V_x$) та 1мл 1 моль/л $(\text{CH}_3\text{COO})\text{NH}_4$ ($\text{pH} = 7,0$), за 30 хв вимірювали оптичну густину при довжині хвилі 450 нм. У якості зразка порівняння використовували галову кислоту. За оптимальних умов побудували градувальний графік для визначення галової кислоти з біс-неокупроїном купруму (II) (рис. 2.5).

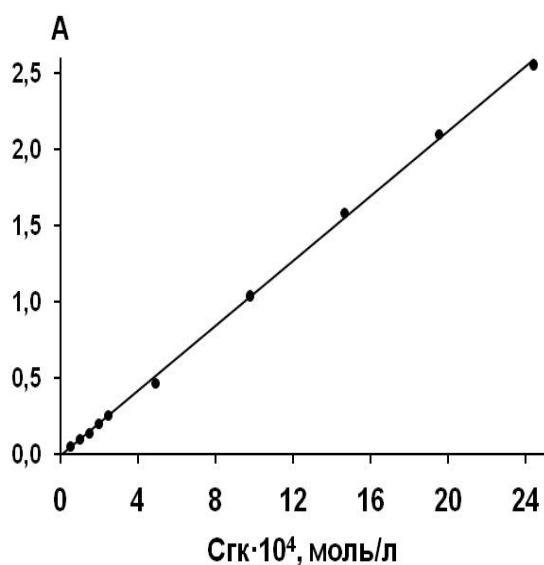


Рис. 2.5. Градувальний графік для визначення галової кислоти з використанням біс-неокупроїну купруму(II). $\text{pH} = 7,0$, $l = 1$ см

Градувальна залежність для визначення галової кислоти описується рівнянням $A = -(0,011 \pm 0,027) + (1,1 \pm 0,023) \cdot 10^4 \cdot C_{ГК}$, ($R^2 = 0,999$), межа визначення складає $2,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

2.4.2. Перманганатометричний метод для визначення поліфенолів у чаях

Перманганатометричний метод (метод Левенталя) ґрунтується на реакції окиснення поліфенолів калій перманганатом у кислому середовищі в присутності індикатора і каталізатора індігосульфокислоти, яка в точці еквівалентності змінює колір від синього до золотисто-жовтого.

Приготування розчину індигокарміну: 0,05 г індигокарміна розчиняли в 2,5 мл конц. H_2SO_4 додавали дистильовану воду до об'єму 50 мл. Розчин, що отримали відфільтровували.

Приготування 0,1 моль-екв/л розчину оксалатної кислоти: зважували на аналітичних терезах точну наважку $H_2C_2O_4 \cdot H_2O$ масою 0,63 г та розчиняли її у гарячій дистильованій воді (температура приблизно $70^{\circ}C$), після охолодження доводили об'єм до 100 мл.

Приготування розчину калій перманганату: 3,16 г $KMnO_4$ розчиняли у невеликій кількості дистильованої води и доводили об'єм до 1000 мл. Розчин зберігали у темному посуді для попередження утворення MnO_2 .

Стандартизація розчину $KMnO_4$ розчином $H_2C_2O_4$: до 10 мл щойно приготованого розчину оксалатної кислоти додавали 10 мл 2 моль-екв/л H_2SO_4 , розчин підігрівали до $70^{\circ}C$ та одразу відтитрували. Кінцеву точку титрування фіксували за зміною кольору розчину, від малинового до рожевого, який не зникав протягом в 2 хв.

2.4.3. Титрометрична методика для визначення аскорбінової кислоти

Відомо безліч методів визначення вмісту аскорбінової кислоти: титрометричні, кольорометричні, спектрофотометричні, хроматографічні та ін. [271]. Для кількісного визначення аскорбінової кислоти застосовували метод візуального титрування, використовуючи окислювально-відновну реакцію з натрій

2,6-дихлорфенол-індофенолятом, відомим також як реактив Тильманса [272]. Дана титриметрична методика використовується у фармакопеї, характеризується хорошою відтворюваністю отриманих результатів. Це найбільш проста по виконанню методика, в якій використовується доступне лабораторне обладнання та матеріали. Проведення експерименту не займає багато часу. Методика з 2,6-дихлорфеноліндофенол набагато більш селективна, ніж йодометрична та інші методики. Приготований розчин натрій дихлорофенол-індофенолята використовували протягом 3 днів та стандартизували безпосередньо перед використанням. Титрування проводили до появи слабо рожевого забарвлення, стійкого протягом декількох секунд.

Приготування $\sim 0,01$ моль/л розчину натрій 2,6-дихлорфенол-індофеноляту (розчин № 1): 50 мг сухої речовини розчиняли в 50 мл розчину, який містить 42 мг натрій бікарбонату. Цей розчин залишали на декілька годин або на ніч, потім доводили об'єм до 200 мл дистильованою водою та відфільтровували.

Приготування $\sim 0,001$ моль/л розчину натрій 2,6-дихлорфенол-індофеноляту (розчин № 2): до 50 мл розчину №1 прибавляють 450 мл дистильованої води. Отриманий розчин стандартизують аскорбіновою кислотою (розчин № 5).

Приготування розчину натрій триметафосфату (розчин № 3): 3 г $\text{Na}_3\text{P}_3\text{O}_9$ подрібнюють у ступці, розчиняли в 8 мл крижаної оцтової кислоти, доводили об'єм дистильованою водою до 100 мл.

Приготування розчину аскорбінової кислоти (АК) з концентрацією $5,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л (розчин № 4): зважували на аналітичних терезах точно 10 мг АК, розчиняли в 10 мл розчину №3. **Приготування розчину аскорбінової кислоти з концентрацією $2,9 \cdot 10^{-4}$ моль/л (розчин № 5):** до 0,5 мл розчину №4 додавали 9,5 мл розчину № 3. Приготовані розчини зберігали не більш однієї доби.

РОЗДІЛ 3

ОСОБЛИВОСТІ ВЗАЄМОДІЇ 18-МОЛІБДОДИФОСФАТУ ТА РЕАКТИВУ
ФОЛНА-ЧОКАЛЬТЕУ З ФЕНОЛЬНИМИ СПОЛУКАМИ**3.1. Синтез і дослідження реакцій відновлення молібдовольфрамівих ГПК
структури Доусона формули $P_2Mo_{18-n}W_nO_{62}^{6-}$ ($n = 2-4$)****3.1.1. Дослідження реакцій утворення та відновлення 15-молібдо-3-вольфрамо-
2-фосфорного ГПК у розчині**

У даній роботі зроблено спробу віднайти більш вдалу аналітичну форму для визначення фенолів серед ГПА структури Доусона. Достатньо повна взаємодія доусонівських ГПК з фенолами спостерігається тільки у лужному середовищі. В той же час ці комплекси, як загалом і усі ГПК, є нестійкими в таких умовах внаслідок лужного гідролізу. Відомо, що значно підвищити стійкість ГПК структури Кеггіна можна за рахунок переходу від монолігандних до різнолігандних ГПК [202]. Такий же прийом був використаний для покращення хіміко-аналітичних властивостей молібденових ГПА структури Доусона. Нами вперше запропоновано у якості реагенту для визначення поліфенолів використовувати молібдовольфраміві ГПК структури Доусона з невеликою кількістю атомів Вольфраму загальної формули $P_2Mo_{18-n}W_nO_{62}^{6-}$ ($n=2-4$) (18-МВФК) з метою підвищення стійкості цих сполук до лужного гідролізу.

Для отримання різнолігандних ГПК у розчині використовували властивість атомів молібдену заміщуватися на атоми вольфраму. Це обумовлено тим, що хімічний зв'язок атомів Оксигену з атомами Вольфраму є більш стійким, ніж з атомами Молібдену. На практиці змішані ГПК отримували змішуванням водних розчинів 18-МФК та натрій вольфрамату. Так при отриманні 15-молібдо-3-вольфрамо-2-фосфату $P_2Mo_{15}W_3O_{62}^{6-}$ молярне співвідношення реагентів склало 1 : 3. Вивчення хіміко-аналітичних властивостей 18-МВФК проводили на прикладі реакції з АК. З метою встановлення переваги різнолігандних ГПК проводили порівняльне дослідження стійкості до лужного гідролізу 18-МФК та 18-МВФК.

У відповідності з літературними даними [203], знайдено, що окиснена (жовта) форма 18-МФК є відносно стійкою в інтервалі рН від 2 до 5. В таких умовах розчин 18-МФК є придатним для визначення відновників приблизно на протязі доби. Ступінь руйнування є незначною. При рН від 6 до 10 18-МФК за 60 хв руйнується приблизно 60–70% ГПК у водному розчині, а при $\text{pH} \geq 10$ достатньо 5 хв для повного гідролізу 18-МФК (рис. 3.1) при концентрації 10^{-4} моль/л. При підвищенні концентрації ГПК ступінь руйнування зменшується. Найвища оптична густина досягається при рН 3,0, який було обрано для зберігання розчинів 18-МФК.

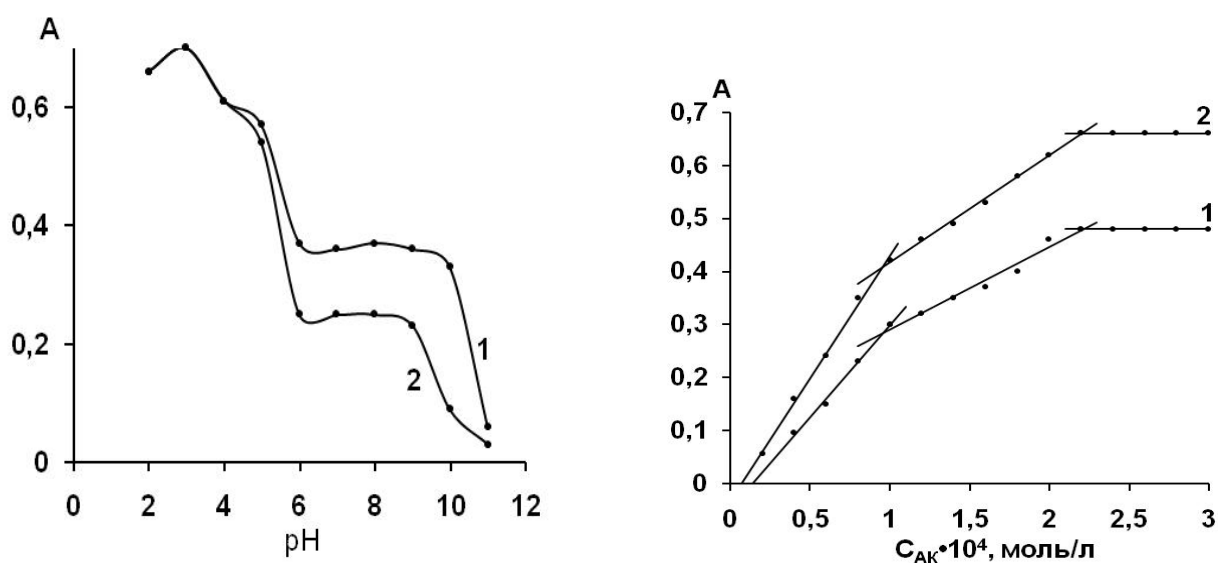
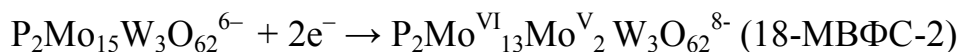


Рис. 3.1. Залежність оптичної густини розчину окисненої форми 18-МФК від рН за умови різного часу зберігання. $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $\lambda = 360$ нм, $l = 0,5$ см, $t = 10$ хв (1), $t = 60$ хв (2)

Рис. 3.2. Криві насичення 18-МФК (1) та 18-МВФК (2) АК. $\lambda = 760$ нм, рН = 4, $t = 15$ хв. (1) – $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л; (2) – $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{Na}_2\text{WO}_4} = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Знайдено, що при відновленні 18-МВФК з малою долею вольфраму ($n = 2-4$) аскорбіновою кислотою утворюються, подібно 18-МФК, спочатку двох-, а потім і чотирьохелектронні ГПС. Криві насичення 18-МФК та 18-МВФК виглядають подібним чином і мають дві точки перетину, які відповідають молярним співвідношенням АК до ГПА 2:1 та 4:1 (рис. 3.2). Враховуючи, що АК є двохелектронним відновником, це призводить до вказаного вище висновку.

Таким чином, у реакції відновлення 18-МФК і 18-МВФК аскорбіновою кислотою до співвідношення АК : ГПК = 1 : 1 та при рН 1-10 утворюються інтенсивно забарвлені двохелектронні гетерополісині (18-МФС-2, 18-МВФС-2). Їх реакції утворення описуються наступними рівняннями:



При рН 1-4 та при співвідношеннях АК : ГПК більше 1 : 1 утворюються чотирьохелектронні гетерополісині (18-МВФС-4, 18-МФС-4). Реакції утворення 18-МВФС-4, 18-МФС-4 описуються наступними рівняннями:

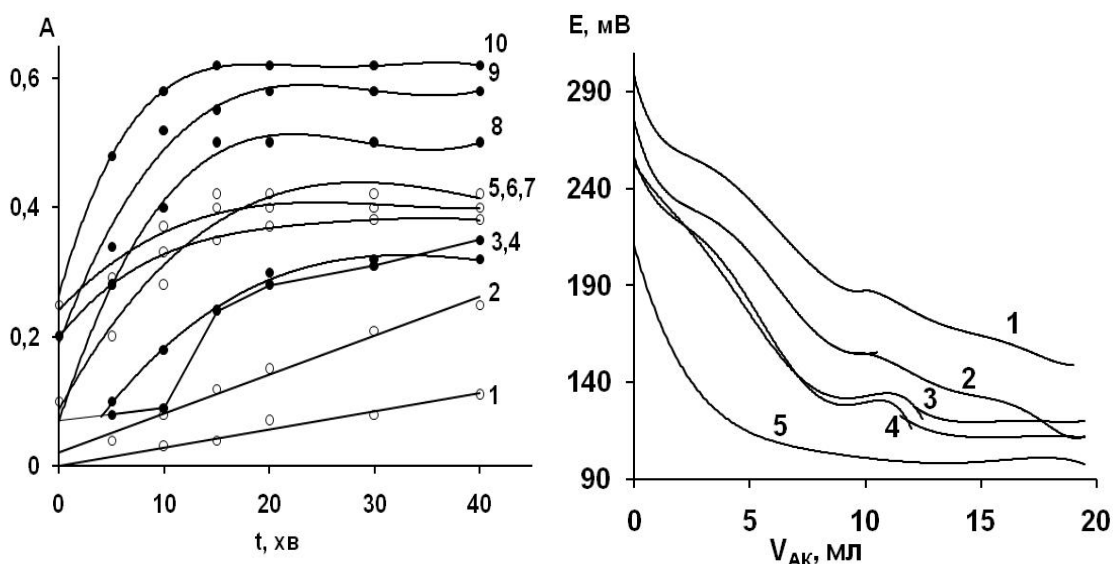


Рис. 3.3. Залежність оптичної густини 18-МФС-2 (1, 2, 5, 6, 7) та 18-МВФС-2 (3, 4, 8, 9, 10) від рН розчину (рН вказаний у дужках). 1 (1); 2 (2); 3 (1); 4 (2); 5 (3); 6 (4); 7 (5); 8 (5); 9 (3); 10 (4). $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 10^{-4}$ моль/л (1, 2, 5, 6, 7); $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{Na}_2\text{WO}_4} = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 10^{-4}$ моль/л (3, 4, 8, 9, 10)

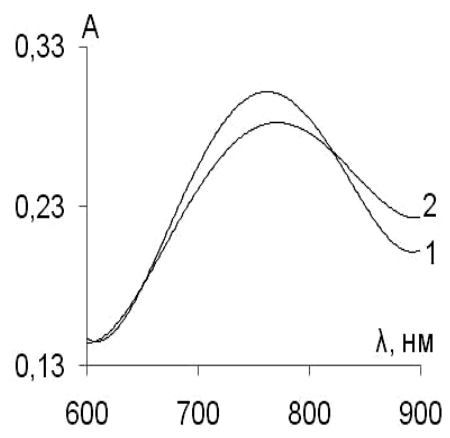
Рис. 3.4. Криві потенціометричного титрування 18-МВФК АК. $V_{18\text{-МВФК}} = 5$ мл, $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-2}$ моль/л, $C_{\text{Na}_2\text{WO}_4} = 3 \cdot 10^{-2}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 10^{-2}$ моль/л

Швидкість реакції утворення 18-МВФС-2 та 18-МФС-2 залежить від рН (рис. 3.3). При рН 1-2 реакція утворення ГПС дуже уповільнена у часі, для її завершення недостатньо навіть 40 хв. Це пов'язано з тим, що при рН < 4 різниця між

окисно-відновними потенціалами редокс-систем ГПА та відновника починає суттєво знижуватися, що й може обумовлювати зниження швидкості реакції. При $\text{pH} \geq 3$ час реакцій утворення 18-МВФС-2 та 18-МФС-2 складає приблизно 15 хв. Криві для 18-МВФС йдуть значно вище, ніж для 18-МФС. Це може слугувати доказом збільшення стійкості при утворенні різнолігандних молібдовольфрамівих ГПС.

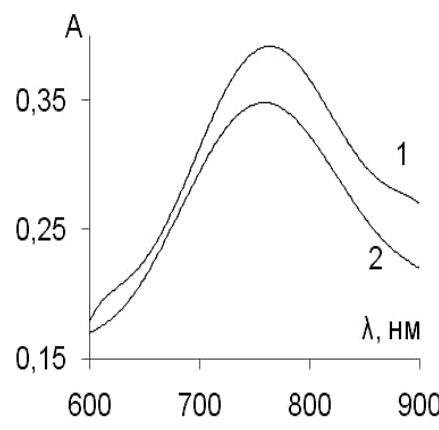
Утворення двох- та чотирьохелектронних гетерополісинеї також підтверджується даними потенціометричного титрування розчинів 18-МВФК АК при різних значеннях pH (рис. 3.4). Нумерація кривих відповідає значенню pH . Перший стрибок титрування відповідає утворенню 18-МВФС-2, другий – 18-МВФС-4. При pH 1-2 необхідно більше часу для утворення ГПС (рис. 3.3), тому перший стрибок дещо перебивається з другим, а стрибок, що відповідає утворенню 18-МВФС-4 є нечітко відображеним. При $\text{pH} = 5$ відсутність другого стрибка можливо обумовлена тим, що 18-МВФК частково розкладається, а у розчині утворюється суміш двох ГПС. Більш чіткі стрибки титрування отримані в області оптимальних значень pH 3-4. Отримані дані потенціометричного титрування дозволили розрахувати формальні окисно-відновні потенціали пар 18-МВФК / 18-МВФС-2 – 0,46 В та 18-МВФС-2 / 18-МВФС-4 – 0,37 В (відносно СВЕ).

Спектри поглинання 18-ГПС-2 (рис. 3.5) та 18-ГПС-4 (рис. 3.6), які утворюються при реакції відновлення 18-МФК і 18-МВФК, є подібними. Максимуми поглинання при однаковому pH майже не відрізняються, що свідчить про подібність електронної будови цих ГПС.



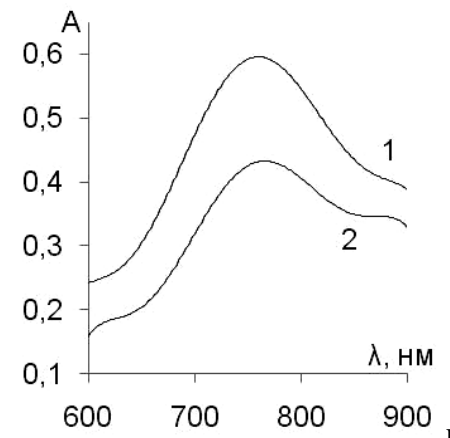
pH = 1

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	760	760
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	5800	6200



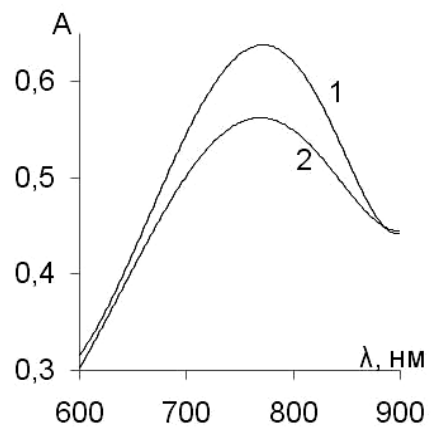
pH = 2

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	760	760
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	6000	7800



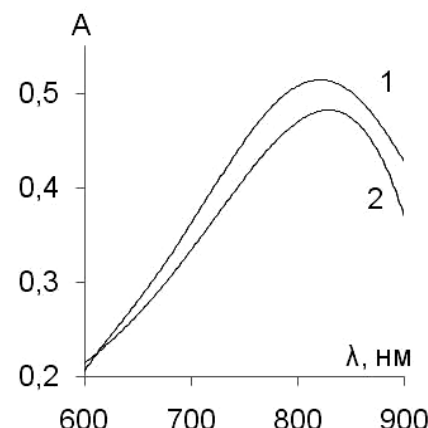
pH = 3

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	760	760
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	8800	13600



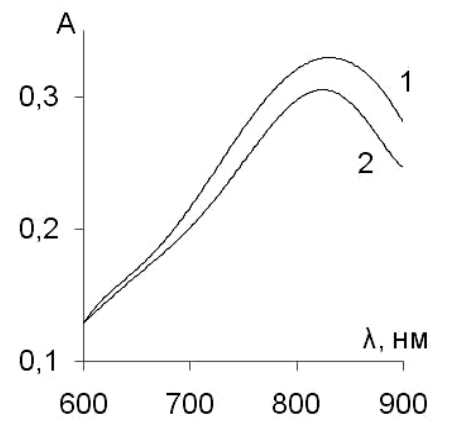
pH = 5

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	780	780
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	11600	13200



pH = 7

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	820	820
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	10400	12000

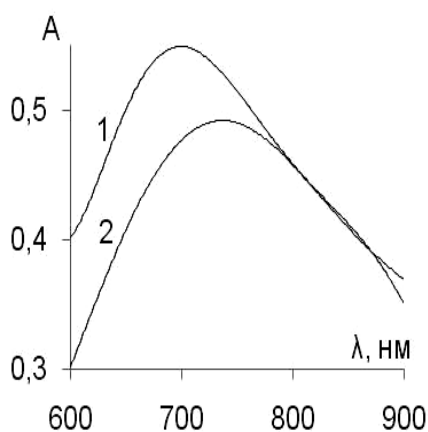


pH = 9

	18-МФС-2	18-МВФС-2
λ_{max} , нм	820	840
ϵ , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	6100	6600

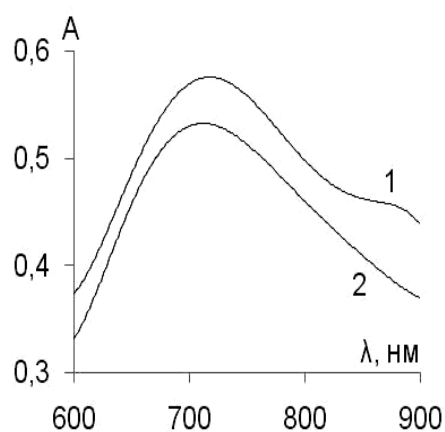
Рис. 3.5. Спектры поглощения двухелектронных ГПС при різних значеннях рН. Час реакції 15 хв. (1) – 18-МВФС-2:

$C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{Na}_2\text{WO}_4} = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 10^{-4}$ моль/л, (2) – 18-МФС-2: $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 10^{-4}$ моль/л



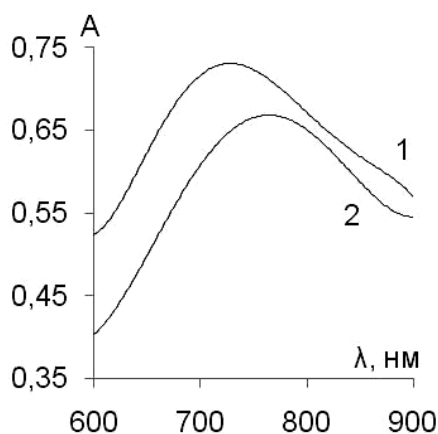
pH = 1

	18-МФС-4	18-МВФС-4
λ_{max} , нм	720	700
ε , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	10000	11200



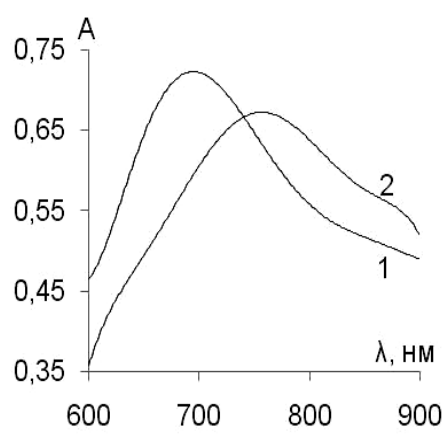
pH = 2

	18-МФС-4	18-МВФС-4
λ_{max} , нм	720	720
ε , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	10800	11600



pH = 3

	18-МФС-4	18-МВФС-4
λ_{max} , нм	740	720
ε , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	12000	14200



pH = 4

	18-МФС-4	18-МВФС-4
λ_{max} , нм	760	720
ε , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	13600	14800

Рис. 3.6. Спектри поглинання чотирьохелектронних ГПС при різних значеннях рН. Час реакції 15 хв. (1) – 18-МВФС-4: $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{Na}_2\text{WO}_4} = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, (2) – 18-МФС-4: $C_{18\text{-МФК}} = 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{АК}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Важливою відмінністю спектрів змішанолігандних ГПС є їх більша інтенсивність. Для інтервалу рН 4-5 молярний коефіцієнт світлопоглинання ГПС у максимумі поглинання при 780 нм для 18-МФС-2 складає 11600 моль⁻¹·см⁻¹·л, а для 18-МВФС-2 – 13200 моль⁻¹·л см⁻¹. Таке збільшення інтенсивності поглинання ми пояснюємо найвірогідніше збільшенням стійкості ГПА, для якого рівновага більше зсунута у бік утворення як окисненої, так і відновленої форм. Також можна припустити, що гетерополісині, які утворилися внаслідок відновлення

різнолігандних ГПК, мають більший молярний коефіцієнт поглинання. При $\text{pH} \geq 9$ інтенсивність забарвлення як для 18-МФС-2, так і для 18-МВФС-2 сильно зменшується. Це пов'язано з тим, що у лужному середовищі відновлена та окиснена форми ГПА руйнуються значно швидше. Введення до розчину ГПА вольфрамат-іонів дещо сповільнює цей процес, але не повністю. Вказані факти свідчать про перспективність використання молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона з невеликою кількістю атомів Вольфраму для визначення відновників і, зокрема, фенолів.

3.1.2. Вплив неіоногенних поверхнево-активних речовин на стійкість

18-молібдодифосфату у розчинах

Раніше було показано [273], що введенням неіонних ПАР вдається суттєво підвищити стійкість молібденових ГПК Фосфору(V) та Арсену(IV). На реакції утворення ГПА Силіцію(IV) неіонні ПАР не мають суттєвого впливу. Це пояснюється тим, що ГПА Силіцію(IV) і без введення НПАР є доволі стійкими комплексами. Оскільки є потреба підвищити стійкість доусонівських ГПК в лужному середовищі, то було досліджено, як впливає введення неіоногенних поверхнево-активних речовин (НПАР) на поведінку окисненої форми 18-МФК. Вплив НПАР на 18-МФК вивчали з використанням НПАР Triton X-100. Показано, що починаючи з $\sim 0,1$ % концентрації Triton X-100 (тобто з концентрації, яка відповідає критичній концентрації міцелоутворення) інтенсивність забарвлення збільшується і є постійною впродовж тривалого часу (табл. 3.1), також змінюється вид спектра ГПК (рис. 3.7). Збільшення світлопоглинання у ближній УФ та видимій ділянках спектра (табл. 3.2) ми у відповідності з раніше висунутою теорією дії НПАР на реакції утворення ГПК ми інтерпретуємо як свідчення підвищення стійкості 18-МФК (рис. 3.8). При $\text{pH} 9$ у присутності НПАР оптична густина зменшується повільно, в той же час за відсутності НПАР руйнація ГПК відбувається дуже швидко.

Таблиця 3.1

Залежність оптичної густини розчину від об'єму НПАР,

$V_{\text{розчину}} = 25$ мл, $C_{18\text{-МФК}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{Triton X-100}} \approx 1$ %, $\text{pH} = 9$, $\lambda = 360$ нм, $l = 1$ см

$V_{\text{НПАР, мл}}$	0	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0,15	0,27	0,3	0,32	0,34	0,35	0,34	0,32	0,31

Таблиця 3.2

Зміна оптичної густини розчину 18-МФК (A_1) та 18-МФК з НПАР (A_2) від

pH, $C_{18\text{-МФК}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{Triton X-100}} \approx 0,1$ %, $\lambda = 360$ нм, $l = 1$ см

pH	2	4	6	8	10
A_1	0,27	0,3	0,25	0,15	0,15
A_2	0,37	0,37	0,37	0,37	0,37

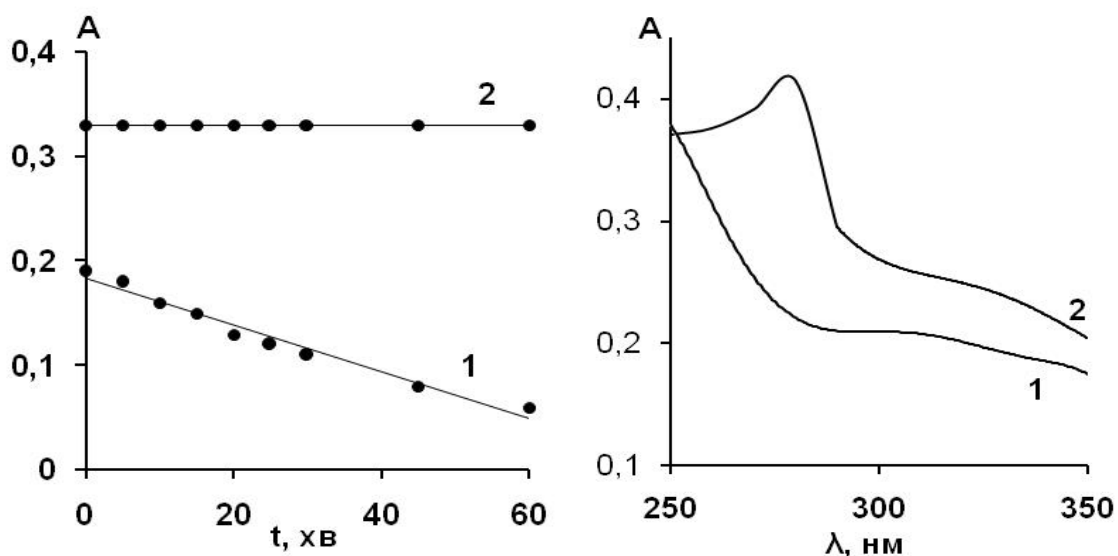


Рис. 3.7. Зміна оптичної густини 18-МФК (1) та 18-МФК у присутності НПАР (2) у часі. $C_{18\text{-МФК}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{Triton X-100}} \approx 0,1$ %, $\text{pH} = 9$, $\lambda = 360$ нм, $l = 1$ см

Рис. 3.8. Спектри поглинання окисненої форми 18-МФК (1) та 18-МФК з НПАР (2). $C_{18\text{-МФК}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{Triton X-100}} \approx 0,1$ %, $\text{pH} = 9$, $l = 1$ см

При дослідженні реакції 18-МФК з АК у міцелярному середовищі НПАР виявилось, що реакція утворення гетерополісині значно уповільнюється. Так при $\text{pH} \leq 7$ для відновлення 18-МФК АК потрібно 10 хв, а при 0,04 % концентрації Triton X-100 час реакції збільшується удвічі. Таке ж явище спостерігали і раніше [273]. Воно пояснюється ізоляцією ГПА від взаємодії з відновниками при попаданні всередину міцели.

3.1.3. Синтез $(\text{NH}_4)_6[\text{P}_2\text{Mo}_{16}\text{W}_2\text{O}_{62}] \times 14\text{H}_2\text{O}$

Утворення молібдовольфрамів ГПК з молібденових шляхом заміщення лігандів може проходити неповністю. Більш надійним способом отримання різнолігандних ГПК певного складу є синтез при стехіометричному співвідношенні молібдену до вольфраму.

У якості прототипу для синтезу використовували методику, наведену Бауером [265]. В колбу для синтезу об'ємом 500 мл поміщали 17,77 г $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,028 г $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, приливали 80 мл дистильованої води, перемішували. При перемішуванні додавали 3,56 мл 76 % ортофосфорної кислоти, 16 мл соляної кислоти (36 %). Отриманий жовтий розчин кип'ятили протягом 8 год зі зворотнім холодильником. Для усунення відновлених форм ГПК (зелений розчин), які випадково утворюються при синтезі внаслідок реакції з домішками відновників у воді та повітрі, від'єднували холодильник, додавали декілька 1-2 мл бромної води, кип'ятили ще декілька хвилин. Розчин при цьому набував насичено-жовтого кольору. Охолоджували його до кімнатної температури. Вносили сухий хлорид амонію (≈ 22 г) до насичення розчину та виділення оранжево-жовтого осаду.

У ході синтезу 18-МФК ми часто спостерігали, як це відмічається і у літературі, що при додаванні перших порцій хлориду амонію спочатку виділяється відмінний за кольором жовтий осад малорозчинної амонійної солі 12-молібдофосфату. Цей осад треба перед осадженням основної частини 18-МФК відфільтрувати і відкинути. Для 18-МФК також треба робити очистку шляхом перекристалізації із суміші вода-діоксан. При синтезі 18-МВФК нами не помічено ознак випадіння жовтих кеггінівських ГПК. Осад відфільтровували на воронці Бюхнера та сушили в ексікаторі з концентрованою сірчаною кислотою. Маса утвореного осаду склала 10,238 г (вихід 69,14 % за молібденом). Таким чином, синтез 18-МВФК проходить з суттєво більшим виходом речовини – 70 % замість приблизно 20-30 % у випадку 18-МФК. Скоріш за все не є потрібною очистка речовини і комплекс можна використовувати одразу після фільтрування і висушування. Таким чином цей синтез є набагато більш економічним і простим.

Підтвердженням того, що отримана речовина належить до групи ізоструктурних з 18-МФК комплексів структури Уелса-Доусона, є подібність у поведінці при синтезі (те, що вибірково осаджується у вигляді солей амонію), подібність спектрів поглинання ГПС та близькі молярні коефіцієнти поглинання, висока швидкість реакції з відновниками.

Для отриманої речовини оцінювали її стійкість до гідролізу як для окисленої, так і для відновленої форм. При вимірюванні спектрів поглинання 18-МВФК у водному розчині на протязі трьох діб виявилось, що спектри у цьому проміжку часу залишаються незмінними. Для 18-МФК вже через добу світлопоглинання розчинів суттєво зменшується. Окиснена форма 18-МВФК є більш стійкою до зберігання у розчині.

Спектри 18-ГПС-2 та 18-ГПС-4, отриманих при відновленні 16-молібдо-2-вольфрамофосфорного ГПК за нестачі та у надлишку АК, показані на рис. 3.9. Вони є подібними до спектрів ГПС, отриманих для 18-МВФК у розчині шляхом лігандного обміну. Спектр 18-ГПС-4 не змінився через добу (рис. 3.9). Відновлені форми ГПК загалом є більш стійкими і це було підтверджено на прикладі дослідженої системи.

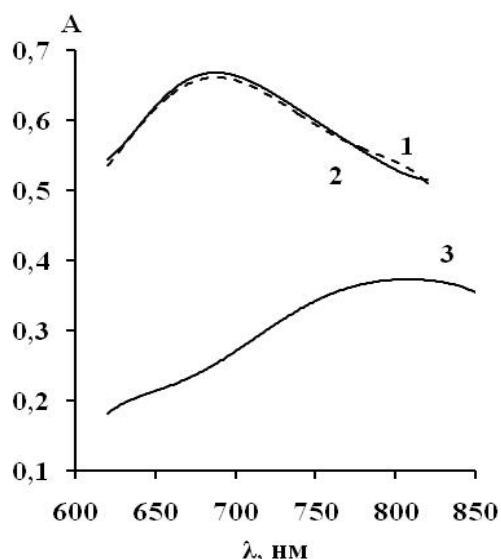


Рис. 3.9. Спектри поглинання чотирьохелектронних (1, 2) та двохелектронних ГПС (3). (1,2) – $C_{AK} = 20 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{18-МВФК} = 0,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, час після змішування реагентів 20 хв та 1 доба, відповідно; (3) – $C_{AK} = 0,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{18-МВФК} = 0,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, час після змішування реагентів 1 доба

За результатами вимірювання оптичної густини розчинів ГПС через 20 хв після змішування реагентів і через 1,5-2 год (табл. 3.3) можна зробити висновок про те, що світлопоглинання розчинів ГПС є повністю стійким на протязі довгого часу, цілком достатнього для отримання добре відтворюваних результатів. В надлишку АК максимум поглинання 18-МВФС знаходиться при довжині хвилі 690 нм, в надлишку 18-МВФК – при 820 нм.

Таблиця 3.3

Залежність оптичної густини ГПС від концентрації реагуючих речовин та часу після змішування реагентів

$C_{AK} \cdot 10^4$, моль/л	$C_{18-МВФК} \cdot 10^4$, моль/л	Час після змішування	A^{820}	A^{690}	ϵ^{820} , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹	ϵ^{690} , моль ⁻¹ ·л·см ⁻¹
0,2	0,8	20 хв	0,191	0,133	9650	6650
		1,5–2 год	0,193	0,133		
0,4	0,8	20 хв	0,380	0,265	9800	7225
		1,5–2 год	0,392	0,269		
20	0,4	20 хв	0,539	0,685	13625	17125
		1,5–2 год	0,545	0,702		
20	0,4	20 хв	0,535	0,683	13750	17750
		1,5–2 год	0,550	0,710		

Значення молярних коефіцієнтів продуктів відновлення синтезованого 16-молібдо-2-вольфрамодифосфату менше, ніж для 18-МВФС-2 та 18-МВФС-4 отриманих шляхом лігандного обміну, але ці значення все рівно є високими, що дає змогу спрогнозувати перспективність їх використання.

Висновок щодо, використання молібдовольфрамівих ГПК структури Доусона загальної формули $P_2Mo_{18-n}W_nO_{62}^{6-}$ ($n=2-4$), отриманих за рахунок реакції лігандного обміну, не є однозначним. Введення невеликої кількості атомів Вольфраму ($n = 2-4$) в молекулу 18-МФК, з одного боку, призводить до збільшення молярних коефіцієнтів на 15-20%, що є свідченням їх більш високої стійкості, а з іншого боку, істотно не змінює швидкість реакцій відновлення ГПК, характер спектрів поглинання двохелектронних ГПС, значення окисно-відновних потенціалів. Крім того присутність вільних вольфрамат-іонів у розчині може сильно зменшити швидкість реакції окиснення фенольних сполук, за рахунок утворення стійких комплексних сполук, а використання додаткових реагентів дещо ускладнює методику. Тому у подальшому для розробки методик визначення фенольних сполук ми віддали перевагу 18-молібдодифосфату, властивості якого раніше були добре

з'ясовані у реакціях з рядом відновників. Нами також були досліджені особливості реакції реактиву Фоліна-Чокальтеу з фенолами. Завдяки цьому стала можливою об'єктивна порівняльна оцінка переваг і недоліків використання цих двох основних реактивів для визначення фенолів на основі ГПК Доусона.

3.2. Дослідження умов взаємодії окремих фенольних сполук з 18-молібдодифосфатом і реактивом Фоліна-Чокальтеу

3.2.1. Вплив кислотності розчину на взаємодію реактиву Фоліна-Чокальтеу та 18-молібдодифосфату з фенольними сполуками

Раніше було встановлено [230], що окисно-відновний потенціал пари 18-МФК / 18-МФС-2 при $\text{pH} > 4$ перестає залежати від кислотності розчину і складає біля $+0,57$ В (відн. СВЕ). Для реактиву ФЧ його редокс-потенціал безперервно знижується при зміщенні pH у лужну область. У залежності від будови фенольних сполук величини їх редокс-потенціалів знаходяться у межах від $+0,23$ В до $+0,75$ В. Сила фенолів, як відновників, зростає при збільшенні pH . Наведені величини редокс-потенціалів свідчать про те, що можливість і глибина взаємодії фенолів з ГПК залежать від pH розчину, що в свою чергу сильно впливає на селективність визначення. Різниця редокс-потенціалів між 18-МФК і фенолами є більшою, ніж для реактиву ФЧ та зростає при зміщенні у лужну область pH . Тому 18-МФК має реагувати з фенолами у менш лужному середовищі.

Знайдено, що взаємодія реактиву ФЧ з фенольними сполуками відбувається у широкому інтервалі кислотності (рис. 3.10). Глибина окиснення фенолів закономірно збільшується при зміщенні pH у лужну область. При використанні реактиву ФЧ (ФД) рекомендується створювати сильнолужне середовище ($\text{pH} 11,4$), тому що тільки за цієї умови спостерігається досить висока швидкість реакції з найменш реакційноздатними фенолами. На кривих залежності світлопоглинання ГПС, які утворюються при відновленні реактиву ФЧ фенолами, від pH розчину майже відсутня ділянка з постійною оптичною густиною, що потребує точного контролю pH аналізованого розчину (рис. 3.10). Встановлення $\text{pH} 11,4$

ускладнюється відсутністю відповідних буферних розчинів, а при використанні сильних основ відбувається швидке руйнування ГПК, що погіршує відтворюваність результатів визначення. У той же час за цих умов швидкість реакції навіть з найбільш реакційноздатними фенолами низька. Так для повного окиснення кверцетину необхідно не менше 10 хв (крива 1, рис. 3.11), за той же час для рутину оптична густина досягає лише 90 % від максимального значення (крива 2, рис. 3.11). Для повного окиснення рутину час реакції повинен бути збільшений до 30 хв.

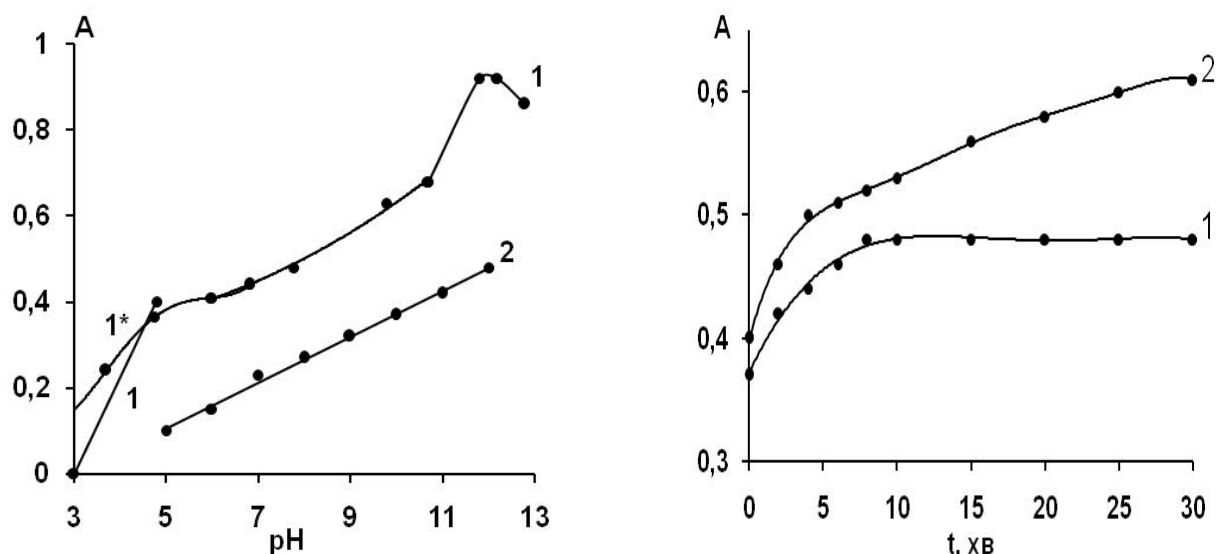


Рис. 3.10. Вплив рН розчину на утворення 18-МВФС при взаємодії рутину (1) та кверцетину (2) з реактивом ФЧ. $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см, $t = 15$ хв; (1) – $C_{\text{рутин}} = 4 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л (крива 1), $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-3}$ моль/л (крива 1*), (2) – $C_{\text{КВ}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л

Рис. 3.11. Залежність оптичної густини ГПС від часу взаємодії поліфенолів з реактивом ФЧ ($C_{\text{ФЧ}} \approx 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $\lambda = 720$ нм, $l = 0,5$ см). (1) – $C_{\text{КВ}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л; (2) – $C_{\text{рутина}} = 6 \cdot 10^{-5}$ моль/л

На відміну від реактиву ФЧ, при $\text{pH} < 3$ 18-МФК не взаємодіє з усіма вивченими фенольними сполуками. Утворення забарвлених продуктів реакції для флаванолів стає помітним при $\text{pH} > 5,5$ (рис. 3.12). Оптимальним для визначення флавонолів, наприклад кверцетину, рутину і моріну можна вважати інтервал рН від 7 до 9, в якому спостерігається кількісне утворення ГПС та швидкість реакції є достатньо високою. В якості робочого рН для визначення флавонолів з 18-МФК

був обраний $\text{pH} = 7,4$. Було показано, що при оптимальному значенні pH на швидкість реакції окиснення кверцетину значний вплив має концентрація 18-МФК. Так, при концентрації 18-МФК $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л ГПС утворюється через 10 хв, а при збільшенні її до $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л для повного окиснення кверцетину потрібно менше однієї хвилини (рис. 3.13 а). У разі рутину (рис. 3.13 б) або моріну зміна концентрації реагенту впливає набагато менше. При більш детальному аналізі кінетичних кривих можна побачити, що процес окиснення поліфенолу грубо складається принаймні з двох стадій. Перша стадія є дуже швидкою і для досягнення 50 % утворення ГПС потрібно менше однієї хвилини. Тобто при використанні приладів для проточно-інжекційного аналізу час визначення можна значно скоротити. Окиснення флавонолів на другій стадії, як вже показано, перебігає набагато більш повільно.

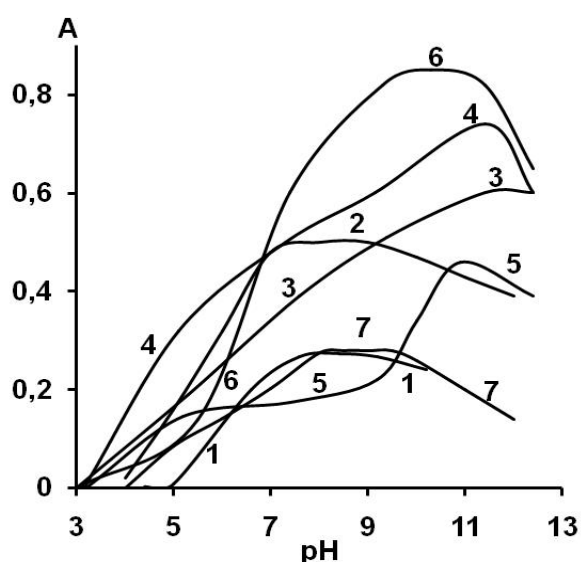


Рис. 3.12. Вплив pH розчину на утворення ГПС при взаємодії 18-МФК з поліфенолами. $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ФС}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм; $t = 15$ хв, $l = 0,5$ см. (1) – рутин, (2) – кверцетин, (3) – ЕГКГ, (4) – елагова кислота, (5) – хлорогенова кислота, (6) – розмаринова кислота, (7) – галова кислота

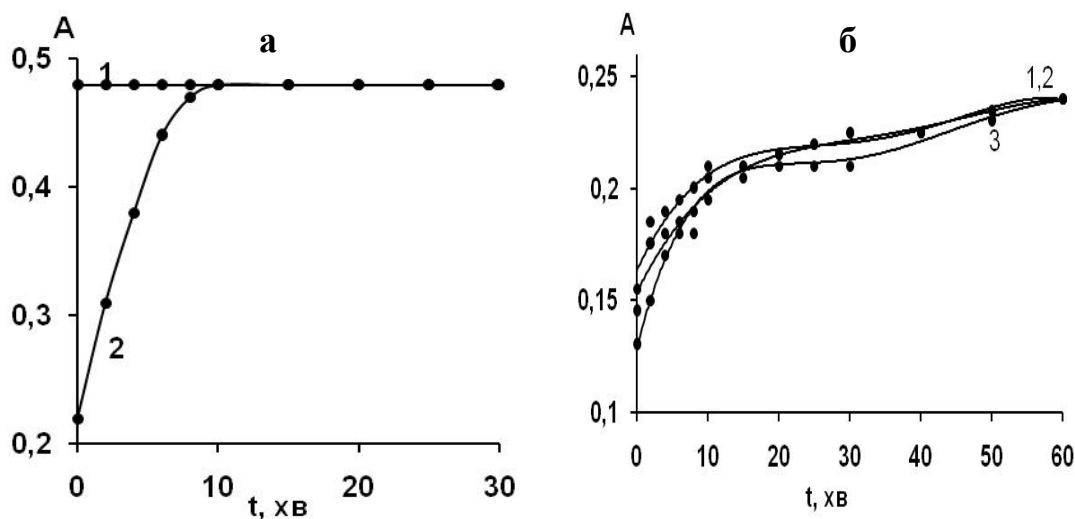


Рис. 3.13. Залежність оптичної густини ГПС від часу окиснення кверцетину (а) та рутину (б) 18-МФК. $C_{\text{ПФ}} = 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см. (а) – $C_{18\text{-МФК}}$, моль/л : $5 \cdot 10^{-5}$ (1 а), $5 \cdot 10^{-3}$ (2 а); $4 \cdot 10^{-5}$ (1 б), $8 \cdot 10^{-5}$ (2 б), $5 \cdot 10^{-4}$ (3 б)

Аналіз кривих рис. 3.12 показав, що рН 7,4, який є оптимальним для визначення флавонолів, не може бути використаний для визначення фенольних кислот та катехінів з використанням 18-МФК. При окисненні галової кислоти (крива 1) ділянка з постійним значенням оптичної густини спостерігається в інтервалі рН 8-10. Для елагової (крива 3), розмаринової (крива 4), ферулової, коричної кислот, а також для катехінів (епігалокатехін галата (крива 3)) та теафлавінів вибір рН ускладнений відсутністю такої площадки. Особливою є поведінка хлорогенової кислоти, окиснення якої відбувається в дві стадії (крива 2). Це також підтверджується кінетичними кривими утворення 18-МФС (рис. 3.14). При рН 7,4 реакція взаємодії 18-МФК з елаговою кислотою закінчується приблизно через 30 хв (крива 1 рис. 3.14, а), а для повного окиснення хлорогенової (крива 2, рис.3.14, а) та розмаринової (крива 3 рис. 3.14 а) кислот необхідно більше 60 хв, для галотаніна (крива 3, рис. 3.14, а) – 120 хв.

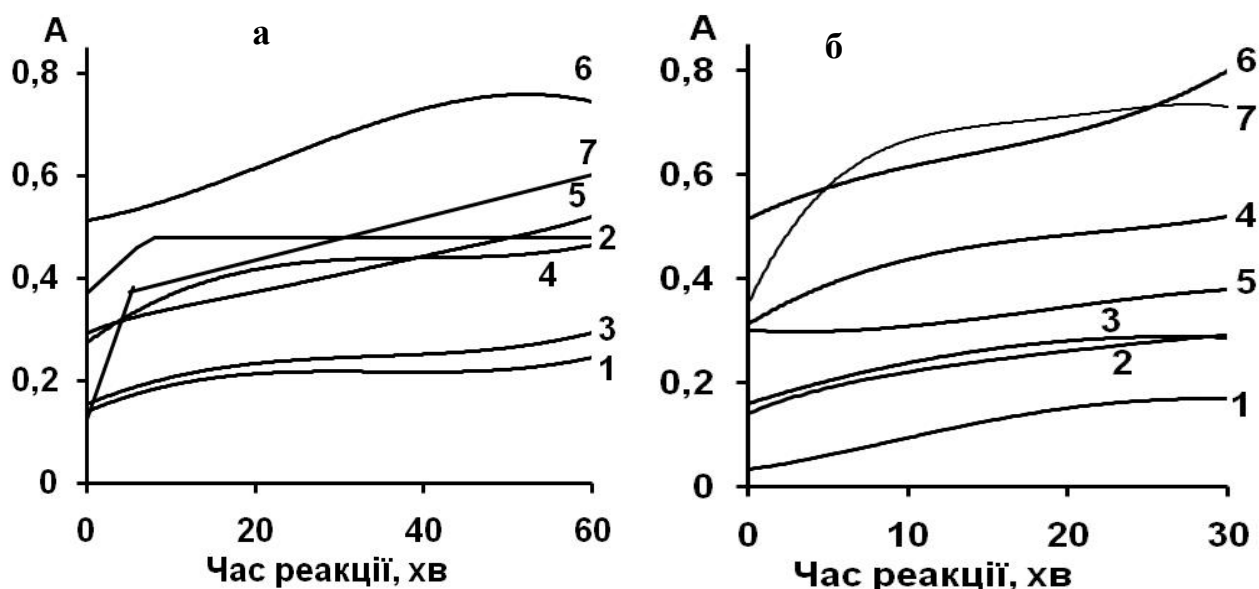


Рис. 3.14. Залежність оптичної густини ГПС від часу реакції при рН 7,4 (а) та 9,5 (б). $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $C_{\text{ФС}} = 2 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $\lambda = 820$ нм, $l = 0,5$ см
 1а – рутин; 2а – кверцетин; 1б – ліквіритин; 2б – гесперідин; 3 – ЕГКГ, 4 – елагова кислота, 5 – хлорогенова кислота, 6 – розмаринова кислота, 7 – галотанін

При $\text{pH} \geq 9$ швидкість реакції окиснення для більшості з вивчених фенольних сполук 18-МФК значно зростає, а час взаємодії зменшується до 15 хв (рис. 3.12, рис. 3.14 б). З іншого боку при $\text{pH} > 10$ (рис. 3.12) для всіх вивчених систем спостерігається зменшення інтенсивності світлопоглинання, що пов'язано з прискоренням процесу руйнування окисненої та відновленої форм 18-МФК. Використання великого надлишку 18-МФК дозволяє компенсувати ці втрати.

Проте використання високої концентрації 18-МФК не завжди є виправданим. Так, наприклад, швидкість реакції окиснення галової кислоти розчином 18-МФК є незмінною приблизно до концентрації $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При рН 9,5 вона закінчується через 15 хв. Якщо ж концентрацію реагенту збільшити до $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, то реакція буде тривати 60 хв (рис. 3.15 а). Така ж закономірність спостерігається і для реакції окиснення галотаніну при рН 7,4. Показано, що введення в розчин надлишку іонів MoO_4^{2-} призводить до зменшення оптичної густини ГПС, що утворилася (рис. 3.15 б). Можливо, молібдат-іони, які утворюються при гідролізі 18-МФК у лужному середовищі утворюють з поліфенолами стійкі комплексні сполуки, які заважають їхній взаємодії з 18-МФК.

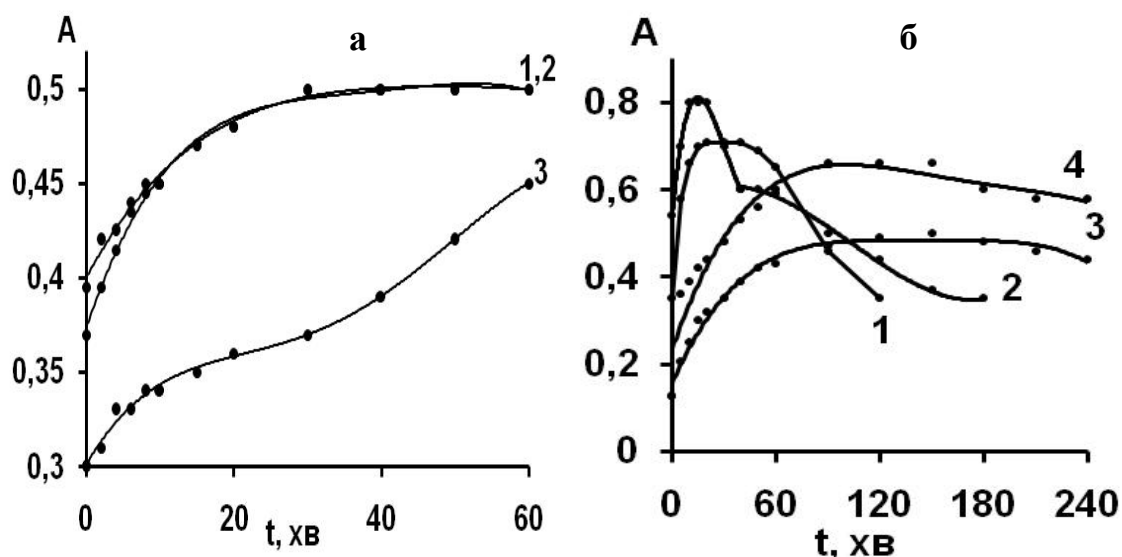


Рис. 3.15. Залежність оптичної густини ГПС, яка утворилася при реакції відновлення 18-МФК галовою кислотою (а) або галотаніном (б), від часу реакції. $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см. (а) – рН = 9,5, $C_{ГК} = 10^{-5}$ моль/л, $C_{18-МФК}$: – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л (1); $1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л (2), $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л (3). (б) – 0,3 мг/мл 18-МФК; 4,3 мкг/мл галотаніна, (1) – рН 9,5, (2) – рН 11,4, (3) – рН 7,4 та 21 мкг/мл Na_2MoO_4 , (4) – рН 7,4

Тому в якості оптимального значення рН для визначення більшості представників класів фенолів можна рекомендувати 9,5. При цьому час реакції складає приблизно 15 хв. Для найменш реакційноздатних фенольних сполук, наприклад монофенолів, він має бути збільшений до 30 хв.

3.2.2. Оптимізація концентрації реагенту

Для визначення поліфенолів з використанням реактиву ФЧ застосовують високу концентрацію реагенту ($\sim 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л) для того, щоб підвищити його окислювальну здатність і компенсувати часткові втрати за рахунок розкладання. Нами було показано, що для визначення флавонолів (кверцетину, моріну, рутину) можна використовувати на порядок меншу, ніж у стандартній методиці, концентрацію реактиву ФЧ.

Точка перегину на кривій молярних співвідношень при насиченні реактиву ФЧ кверцетином ($\lambda = 720$ нм, рис. 3.16) відповідає співвідношенню кверцетин : реактив ФЧ = 1 : 10 ($\sim 10^{-4}$ моль/л). Це ще раз свідчить проте що, у протилежність 18-МФК

реакція реактиву ФЧ з фенолами має суттєво меншу константу рівноваги (для 18-МФК точка перегину на кривій насичення завжди відповідає стехіометричному співвідношенню ГПА до відновника).

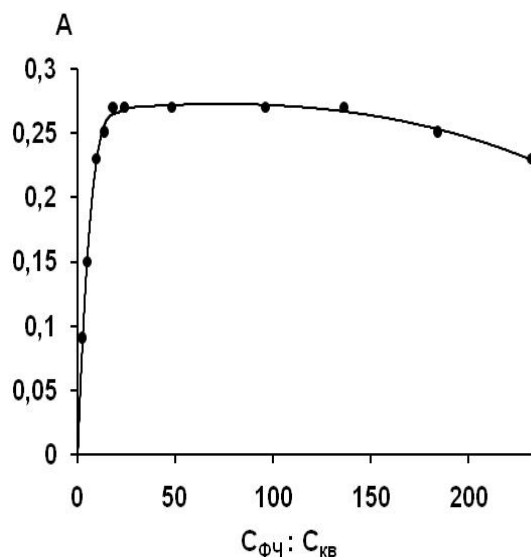


Рис. 3.16. Крива молярних співвідношень реактивів ФЧ : кверцетин.
 $C_{КВ} = 10^{-5}$ моль/л, рН = 11,4, $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см

При використанні концентрації реагенту $\sim 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л спостерігається достатньо висока швидкість реакції окиснення флавонолів при повному утворенні відновленої форми ГПК. Збільшення концентрації реагенту до $\sim 2 \cdot 10^{-3}$ моль/л призводить до зменшення інтенсивності світлопоглинання, що пов'язано зі змінами у спектрі поглинання ГПС, яке полягає у зміщенні максимуму смуги поглинання в довгохвильову область. Це не суперечить літературним даними, згідно яким аналітичну довжину хвилі пропонується обирати в інтервалі від 720 нм до 760 нм.

3.2.3. Встановлення стехіометрії реакції взаємодії 18-молібдодифосфату з фенолами

Знайдено, що у надлишку поліфенола в усіх досліджених випадках утворювалася виключно 18-МФС-2. Раніше було показано, що у надлишку АК утворювалася 18-ГПС-4, а у надлишку хрому (II) – 18-ГПС-6. Вочевидь це пов'язано з тим, що поліфенольні сполуки є досить слабкими відновниками.

Точка перегибу на кривій молярних відносин при насиченні 18-МФК відповідає співвідношенню кверцетин : 18-МФК = 1 : 5 (рис. 3.17 а, крива 1), рутин : 18-МФК = 1 : 2 (рис. 3.17 а, крива 2), галова кислота : 18-МФК = 1 : 3 (рис. 3.17 б, крива 1), та ЕГКГ : 18-МФК = 1 : 5 (рис. 3.17 б, крива 2).

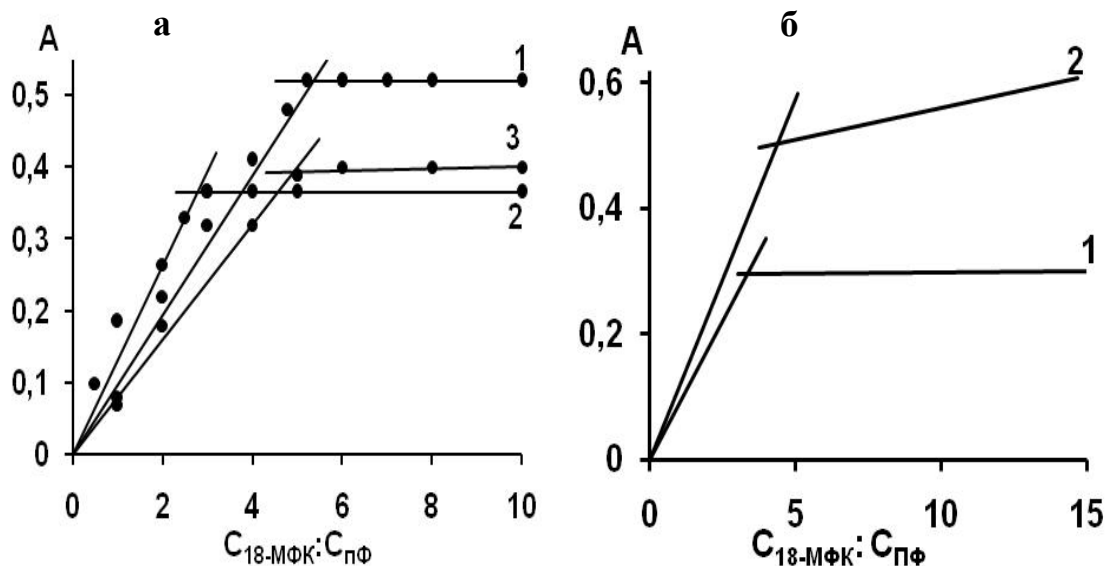


Рис. 3.17. Залежність оптичної густини від співвідношення 18-МФК: поліфенол (ПФ) при насиченні 18-МФК. (а) – $C_{\text{ПФ}} = 10^{-5}$ моль/л, рН = 7,4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см, (1) – кверцетин, (2) – рутин, (3) – морин. (б) – рН = 9,5, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см, (1) – $C_{\text{ЕГКГ}} = 1,1 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (2) – $C_{\text{ГК}} = 10^{-5}$ моль/л.

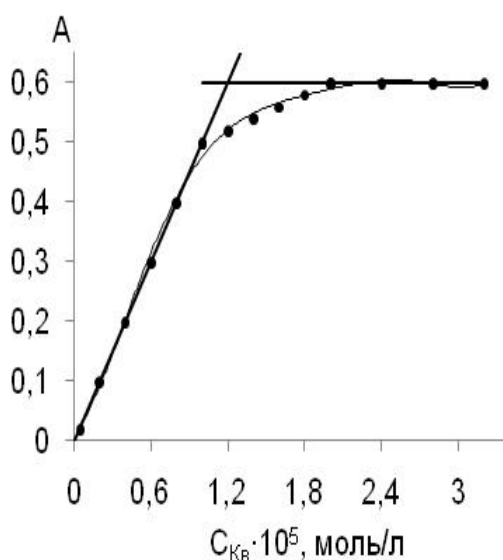


Рис. 3.18. Крива молярних співвідношень для системи кверцетин – 18-МФК при насиченні кверцетином. $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, рН = 7,4, $\lambda = 820$ нм, $l = 1$ см

Умовний молярний коефіцієнт поглинання, розрахований за величиною оптичної густини ГПС в перерахунку на кверцетин склав $5,5 \cdot 10^4$ моль⁻¹·л·см⁻¹, на рутин – $2,4 \cdot 10^4$ моль⁻¹·л·см⁻¹, на галову кислоту – $3,2 \cdot 10^4$ моль⁻¹·л·см⁻¹, а на ЕГКГ – $3,7 \cdot 10^4$ моль⁻¹·л·см⁻¹ при 820 нм. Величина молярного коефіцієнта поглинання 18-МФС-2 дорівнює $\sim 1,08 \cdot 10^4$ моль⁻¹·л·см⁻¹ при 820 нм [231].

Наявність чіткої точки перегибу на кривій насиченні 18-МФК кверцетином (рис 3.18) при співвідношенні 18-МФК: кверцетин = 5: 1 є ще одним доказом запропонованої стехіометрії взаємодії. При дослідженні кінетики реакції окиснення флаванолів стає помітною наявність як мінімум двох стадій – швидкої та повільної. Ми вважаємо, що перша стадія пов'язана з швидким процесом окиснення двох ОН- груп у кільці В з утворенням орто-хіноної групи. Подальше окиснення відбувається більш повільно і потребує таутомеризації та розриву вуглець-вуглецевих зв'язків в кільці С, гідролізу глікозидних груп. Дійсно, в більш лужному середовищі і при тривалому зберіганні оптична густина розчинів ГПС, отримана в результаті реакції окиснення рутина, ЕГКГ, інших поліфенолів продовжує повільно збільшуватися (рис. 3.14 та 3.16, б). 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.

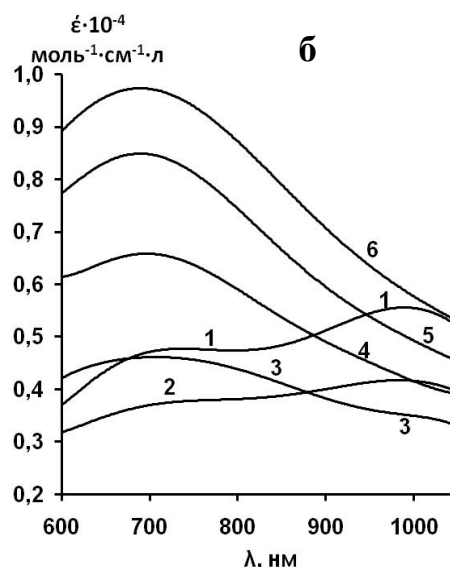
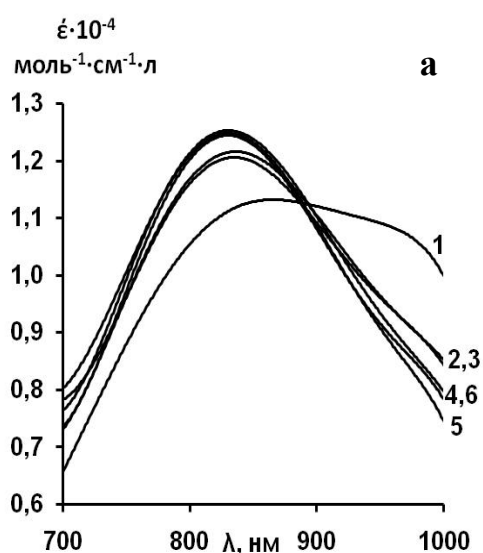
Аналіз наведених експериментальних даних свідчить про те, що при визначенні поліфенолів з 18-МФК, на відміну від реактиву ФЧ, достатньо використовувати невеликий надлишок реагенту. Як оптимальну для визначення фенольних сполук усіх груп запропоновано використовувати концентрацію 18-МФК $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. При цьому досягається досить висока швидкість реакції і повне утворення відновленої форми ГПК. У багатьох випадках можна використовувати і більш низьку концентрацію реагенту, але це призводить до звуження інтервалу концентрацій, які можуть визначатися.

3.3. Вплив на спектри поглинання гетерополісині співвідношення гетерополіаніону до фенолу

Нами вперше помічено та акцентовано увагу на тому, що зміна співвідношення 18-МФК : відновник суттєво впливає на характер спектрів поглинання ГПС (рис. 3.19-3.22). Це було продемонстровано на прикладі взаємодії 18-МФК і реактиву ФЧ з багатьма відновниками, зокрема з рутином, епігалокатехін галатом, аскорбіною та галовою кислотами. Як наслідок, градувальні залежності побудовані при довжині хвилі, яка відповідає максимуму світлопоглинання ГПС, є нелінійними і мають негативну або позитивну кривизну.

При застосуванні 18-МФК лінеаризація градувального графіка призводить до того, що отримана лінійна залежність перетинає вісь ординат в області негативних значень. Молярний коефіцієнт, розрахований для кожної точки, зростає із збільшенням концентрації аналіту. Тим самим в знайдену концентрацію вноситься систематична похибка. При аналізі рослинних об'єктів, внаслідок ряду причин точне визначення загального вмісту поліфенолів не має сенсу. Тому помилка, яка вноситься у результати визначення за рахунок нелінійності градувальної функції, не має принципового значення. Однак при визначенні однієї речовини або суміші, яка містить декількох відновників, наприклад таблеток «Аскорутин», це явище особливо сильно позначається на правильності результатів.

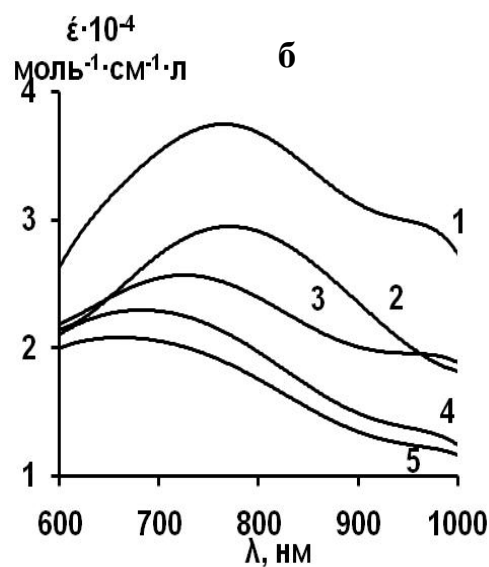
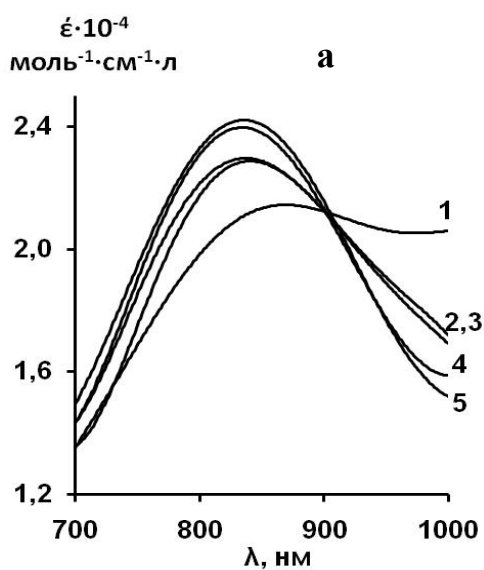
З метою визначення кількості світлопоглинання речовин, були зареєстровані спектри для серії розчинів, де систематично змінювали концентрацію фенолу або АК при постійній концентрації реагенту (серія молярних співвідношень). Для того щоб сума концентрацій обох форм ГПС була постійною в усіх точках (ізомолярна серія) спектри перераховували до однієї обраної концентрації [274]. У результаті спектри поглинання мають вигляд залежності молярного коефіцієнту поглинання від довжини хвилі.



№	1	2	3	4	5	6
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,8	2,4	3,2	4,0	6,4	8,0

№	1	2	3	4	5	6
$C \cdot 10^4$ моль/л	0,4	0,9	1,8	2,7	3,5	7,0

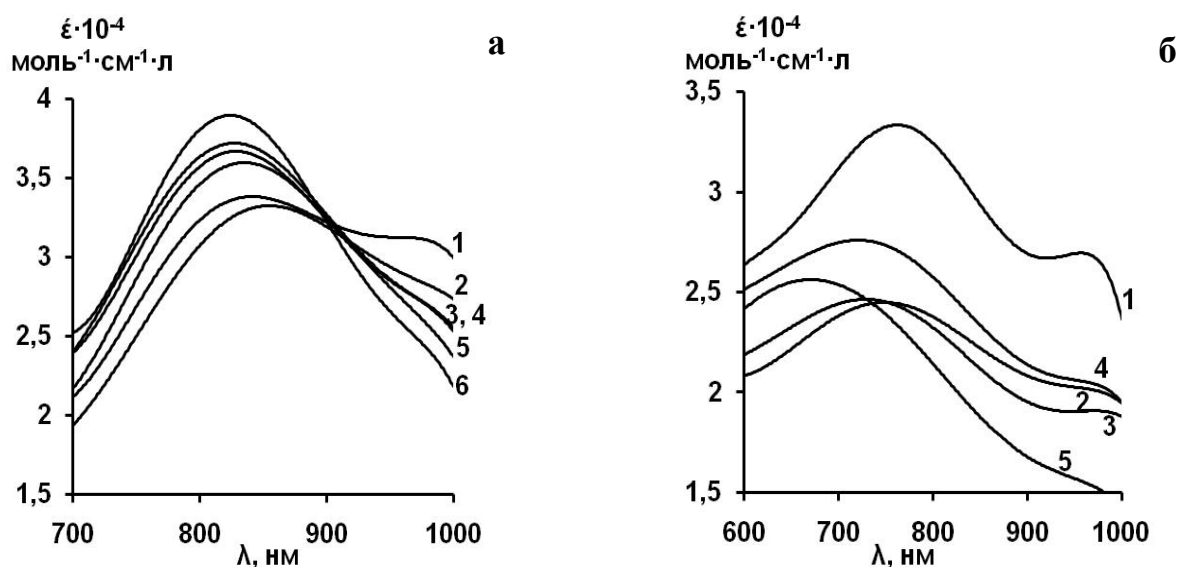
Рис. 3.19. Спектри поглинання гетерополісинеї, отриманих при відновленні 18-МФК (а) і реактиву ФЧ (б) аскорбіною кислотою. (а) – $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 7,4; (б) – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв рН = 11,4



№	1	2	3	4	5
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,8	1,6	2,8	3,6	4,0

№	1	2	3	4	5
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,2	0,4	0,8	4,0	6,0

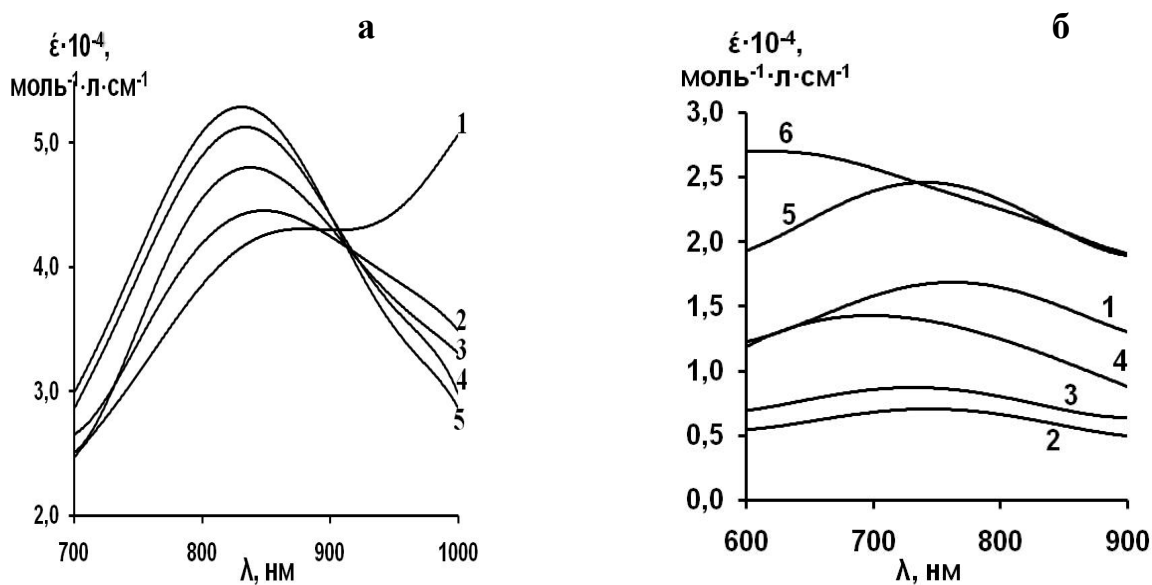
Рис. 3.20. Спектри поглинання гетерополісинеї, отриманих при відновленні 18-МФК (а) і реактиву ФЧ (б) рутином. (а) – $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 7,4; (б) – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв рН = 11,4



№	1	2	3	4	5	6
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,4	0,9	1,3	1,8	2,6	3,1

№	1	2	3	4	5
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,2	0,9	1,8	2,6	3,5

Рис. 3.21. Спектри поглинання гетерополісинеї, отриманих при відновленні 18-МФК (а) і реактиву ФЧ (б) епігалокатехін галатом. (а) – $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 9,5; (б) – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв рН = 11,4



№	1	2	3	4	5
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,6	1,2	2,0	2,8	3,2

№	1	2	3	4	5	6
$C \cdot 10^5$ моль/л	0,4	1,2	2,0	3,6	6,0	8,0

Рис. 3.22. Спектри поглинання гетерополісинеї, отриманих при відновленні 18-МФК (а.) і реактивом ФЧ (б) галовою кислотою. $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, (а) – рН = 9,5, $t = 15$ хв; (б) – $C_{\text{ФЧ}} \approx 2,0 \cdot 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв рН = 11,4

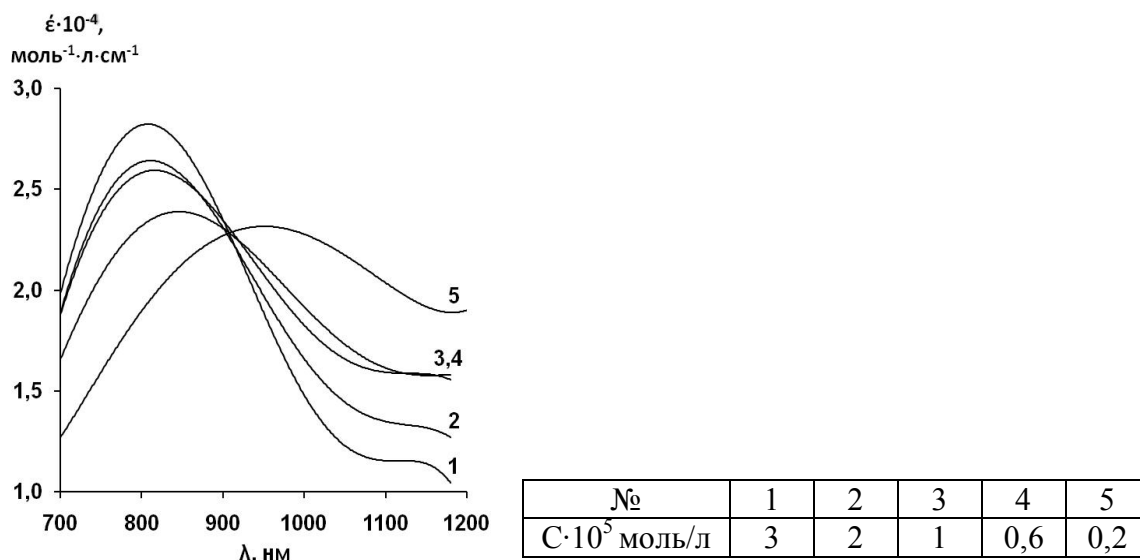
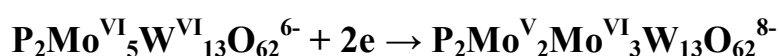


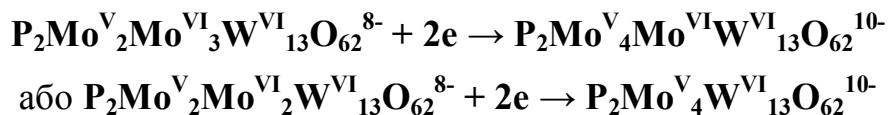
Рис. 3.22 в. Спектри поглинання гетерополісинеї, отриманих при відновленні 18-МФК галовою кислотою. $C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, pH = 7,4, t = 30 хв.

Для системи реактивів ФЧ – відновник аналіз спектрів поглинання (рис. 3.19-3.22) показує, що при збільшенні мольної частки (концентрації) відновника максимум світлопоглинання зміщується від 760-780 нм до 660-680 нм, а також істотно знижується інтенсивність поглинання. Можна припустити, що в даній системі при зміні співвідношення відновник / ГПА відбувається утворення, принаймні, двох форм ГПС. У великому надлишку реагенту переважно утворюється двохелектронна ГПС з максимумом поглинання при 760-780 нм згідно з наступної схеми рівняння реакції відновлення ГПА:

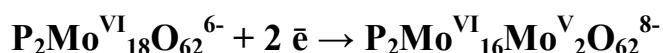


Це припущення підтверджується тим, що максимум поглинання даної ГПС знаходиться в тій же області спектра, що і смуга двохелектронної 18-МФС ($\lambda_{\text{max}} = 820$ нм). Смуги поглинання в цій області обумовлені міжвалентним переносом електрона $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{Mo}^{\text{VI}}$ [202]. Молярні коефіцієнти двохелектронних ГПС, які утворені 18-МФК та 18-МВФК дуже близькі ($\sim 1,1 \cdot 10^4$ моль/(л см)) [230]. Дані вольтамперометрії [238] також підтверджують це припущення. Перша хвиля відновлення ГПА (pH = 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 відносно НКЕ). Другий двохелектронний процес спостерігається лише при $E = -0,1$ В.

При збільшенні співвідношення відновник : 18-МВФК рівновага реакції зміщується у бік утворення чотирьохелектронної ГПС. При зменшенні частки атомів Mo^{VI} в ГПА зростає вклад електронних переносів $\text{Mo}^{\text{V}} \rightarrow \text{W}^{\text{VI}}$, яким відповідають смуги поглинання при $\lambda = 500\text{--}520$ нм [202].



Раніше було показано для 18-МФК [231], що першим продуктом відновлення, ГПС яка утворюється у надлишку реагенту є двохелектронна ГПС. Сили фенолів як відновників у більшості випадків не вистачає для більш глибокого відновлення ГПА навіть у їх великому надлишку. В тім у цій роботі були знайдені докази того, що насправді схема взаємодії відновників з 18-МФК є більш складною. Детальний аналіз отриманих градувальних залежностей, а потім і спектрів поглинання у широкому інтервалі варіювання співвідношень концентрацій відновник : 18-МФК, показав, що у цій системі можуть утворюватися ГПС іншого складу (рис. 3.18-3.22). При $\text{pH} > 5$ максимум світлопоглинання ГПС, яку отримують при відновленні 18-МФК фенолами при співвідношенні приблизно 1 : 1 знаходиться при довжині хвилі 820 нм. Реакція утворення 18-МФС-2 записується у вигляді наступного рівняння:



Однак у великому надлишку реагенту в довгохвильовій області спектра з'являється нова смуга поглинання в області 1000 нм. Її появу ми пов'язуємо зі зміщенням рівноваги у бік утворення одноелектронної ГПС за схемою:



Спектри поглинання 18-МФС перетинаються в ізобестичній точці при 900 нм, що підтверджує припущення про перехід однієї форми ГПС в іншу. Ці спостереження дають можливість отримувати лінійну градувальну залежність при довжині хвилі, яка відповідає ізобестичній точці.

У літературі ми знайшли підтвердження нашого припущення про утворення одноелектронної ГПС [219]. У цій роботі була отримана і вивчена електрохімічними методами, методами ЕПР, ЯМР та іншими ГПС формули $\text{P}_2\text{Mo}^{\text{VI}}_{17}\text{Mo}^{\text{V}}\text{O}_{62}^{7-}$. Спектр

цієї ГПС місти ть дві смуги міжвалентного переносу заряду при 1030 нм ($\epsilon = 5500 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л см}^{-1}$) та 820 нм ($\epsilon = 4100 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л см}^{-1}$). У нашому випадку як раз спостерігається перехід спектру двохелектронної сині у спектр одноелектронної сині з максимумом при 1030 нм.

3.4. Побудова градуювальних залежностей для визначення кверцетину, рутину, епігалокатехін галата, галової та аскорбінової кислот з реактивом Фоліна-Чокальтеу або 18-молібдодифосфатом

З урахуванням визначених у попередній частині роботи оптимальних умов, були побудовані градуювальні залежності для визначення ряду фенольних сполук з використанням реактиву ФЧ і 18-МФК, а також вперше знайдені покращені умови вимірювання оптичної густини при визначенні аскорбінової кислоти з 18-МФК.

Нами уточнені умови побудови градуювального графіку для визначення флавонолів при використанні зменшеної концентрації реактиву ФЧ ($C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$). Показано, що швидкість реакції окиснення фенольних сполук при цьому майже не зменшується. В той же час градуювальний графік набуває нелінійного характеру. Лише його початкова частина може бути задовільно апроксимована лінійною залежністю (рис. 3.23 а, табл. 3.4). Зменшення нахилу градуювальної функції ймовірно відповідає збільшенню частки чотирьохелектронної ГПС, що має при 720 нм менший, ніж у двохелектронної 18-МФС, молярний коефіцієнт. При використанні концентрації реактиву ФЧ, рекомендованої у стандартній методиці, ступінь нелінійності градуювальної функції зменшується. У великому надлишку реагенту переважає двохелектронна ГПС з максимумом світлопоглинання близько 760 нм. Тому при визначенні ФС реактивом ФЧ з концентрацією $2,4 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л}$, вимірювання оптичної густини рекомендуємо проводити при $\lambda = 720 \text{ нм}$, а за умови збільшення концентрації реагенту до $2,4 \cdot 10^{-3} \text{ моль/л}$ – при $\lambda = 760 \text{ нм}$.

Градувальний графік для визначення кверцетину з 18-МФК (рис. 3.23 б) є лінійним в інтервалі концентрацій від $5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л при $l=1\text{см}$ та описується рівнянням $A = 5,47 \cdot 10^4 \cdot C_{\text{кв}}$ ($R^2 = 0,999$).

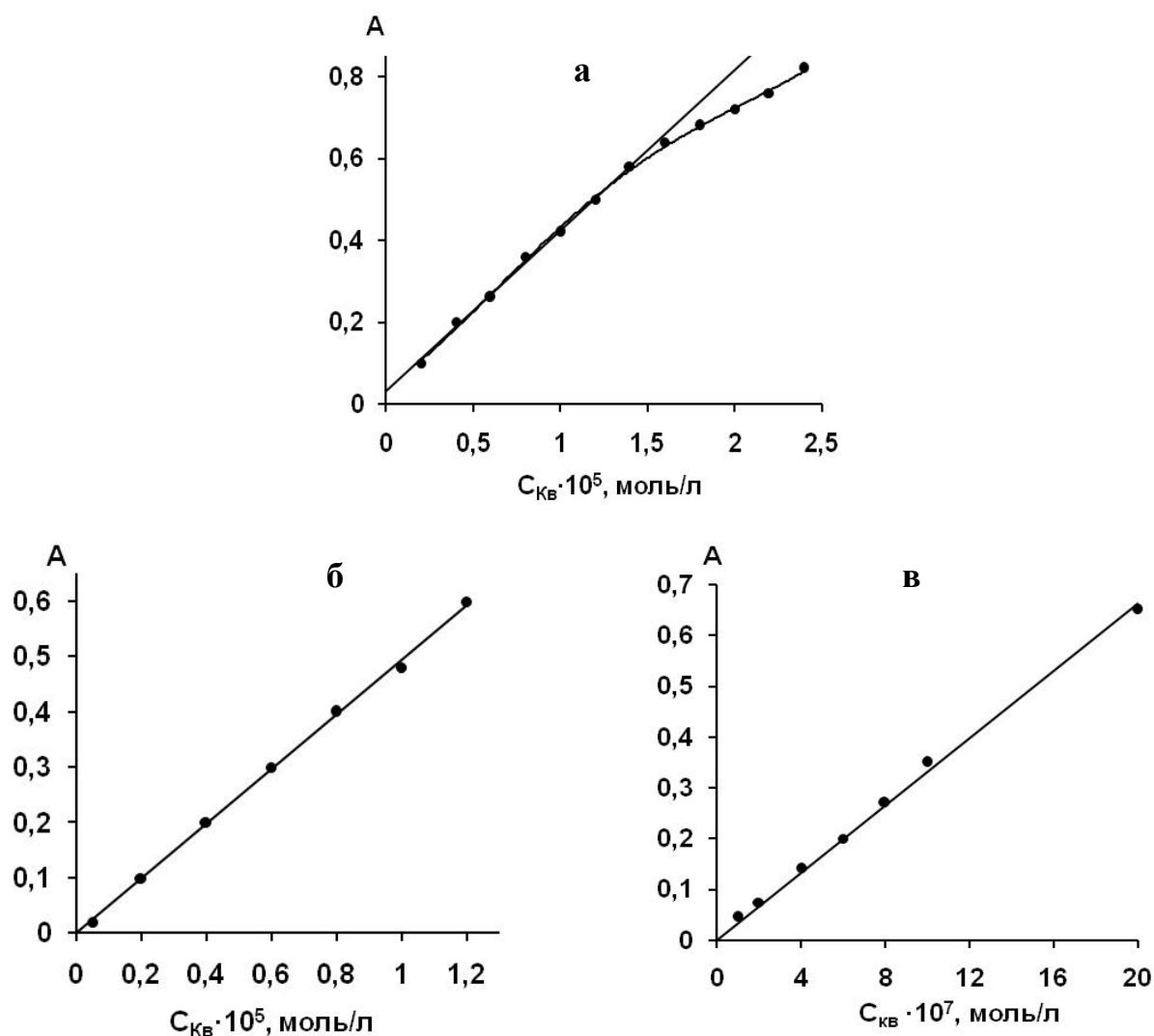


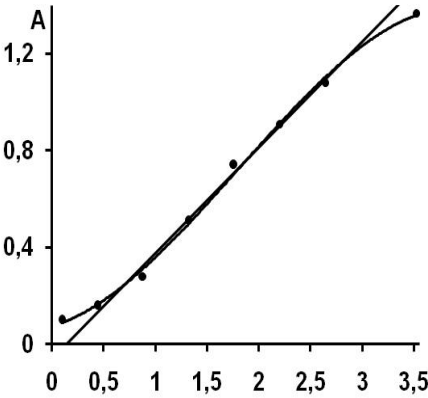
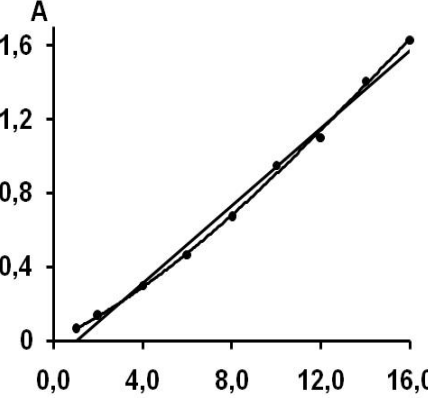
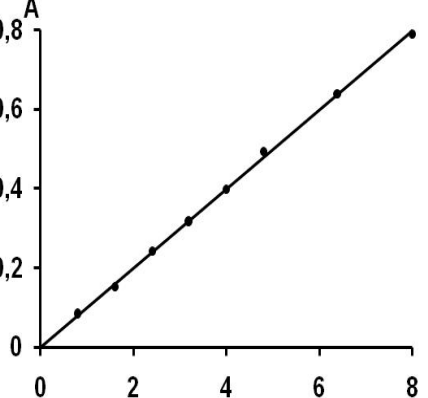
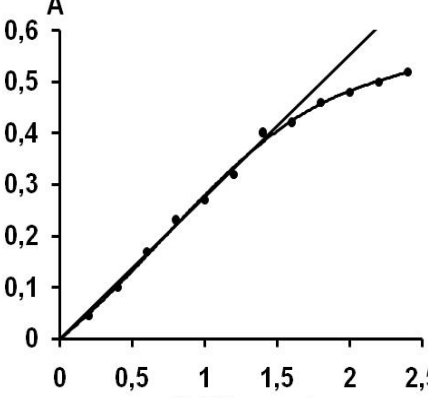
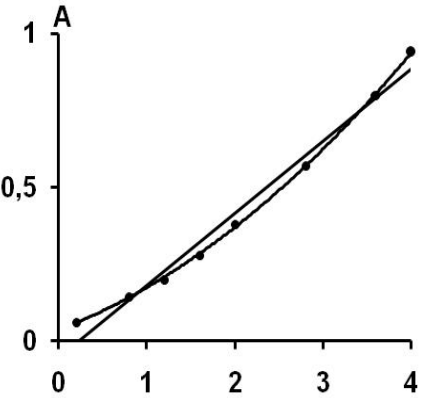
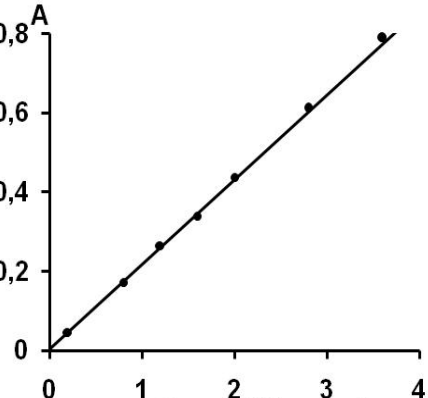
Рис. 3.23. Градувальні залежності для визначення кверцетину з використанням реактиву ФЧ (а) та 18-МФК (б, в). (а) – $\lambda = 720$ нм, рН = 11,4, $l = 0,5$ см. (б, в) – $\lambda = 820$ нм, рН = 7,4, $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $l = 1$ см (б); $l = 5$ см (в)

З метою розширення інтервалу визначаємих концентрацій кверцетину в бік менших концентрацій та визначення максимально можливої чутливості також були отримані дані для побудови градувального графіка з використанням кювети з $l = 5$ см (рис. 3.23 в). Рівняння градувального графіка для цього випадку має вигляд $A = (3,21 \pm 0,13) \cdot C_{\text{кв}} \cdot 10^5$ ($R^2 = 0,998$). Інтервал визначуваних концентрацій кверцетину склав $1 \cdot 10^{-7} - 2 \cdot 10^{-6}$ моль/л, межа виявлення, розрахована за формулою

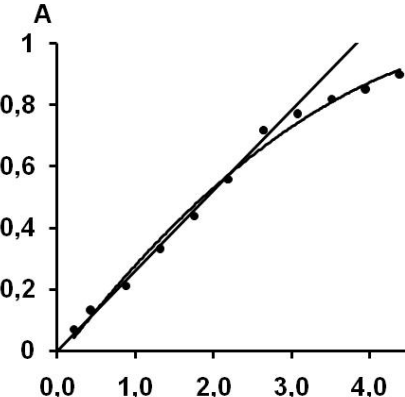
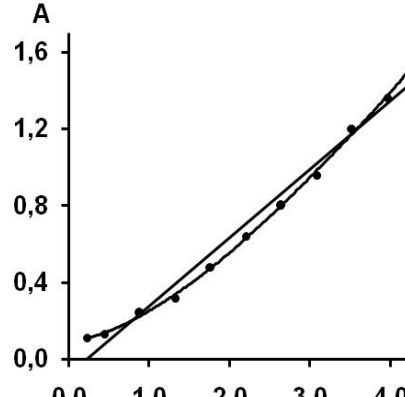
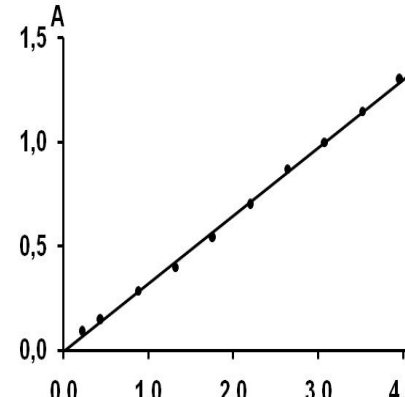
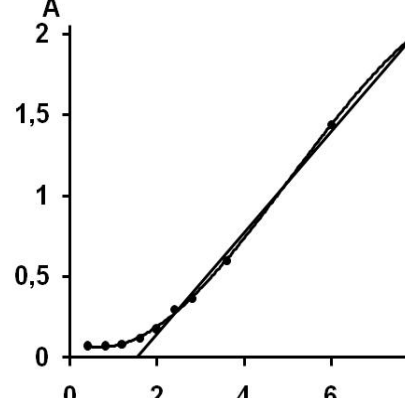
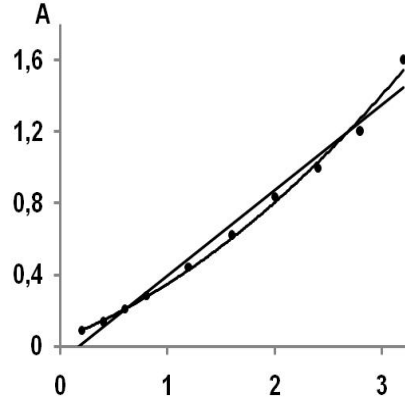
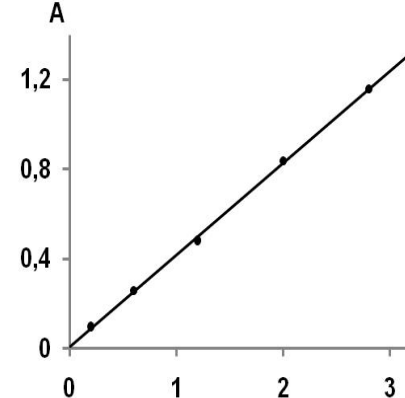
$3S_a/\text{tg}\alpha - 5 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Використання 18-МФК замість реактиву ФЧ при визначенні кверцетину має ряд переваг: реакція займає менше однієї хвилини, методика є набагато більш чутливою, градуювальна функція є лінійною в широкому інтервалі концентрацій.

Для реактиву ФЧ градуювальні графіки є нелінійними при будь-якій довжині хвилі, це призводить до появи систематичних похибок в результатах визначення. Тому реактив ФЧ, на відміну від 18-МФК, не може бути використаний при визначенні індивідуальних речовин у суміші. При використанні як аналітичної довжини хвилі, що відповідає ізобестичній точці градуювальні залежності для визначення рутина, епігалокатехін галата, галової та аскорбінової кислот з 18-МФК виявилися лінійними у широкому інтервалі концентрацій. Усі графіки перетинають вісь ординат у точці, яка незначно відрізняється від нуля.

Градувальні залежності для визначення аскорбінової кислоти та рутину 18-МФК та реактивом ФЧ

$C_{\text{ФЧ}} \approx 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 11,4, $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см, $t = 10$ хв	$C_{18\text{-МФК}} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 7,4, $l = 1$ см, $t = 10$ хв	
	$\lambda = 820$ нм	$\lambda = 900$ нм
 <p data-bbox="123 821 728 896"> $A = (-0,05 \pm 0,07) + (4,36 \pm 0,4) \times 10^3 \times C_{\text{АК}},$ $(R^2 = 0,992),$ межа визначення 2×10^{-5} моль/л </p>	 <p data-bbox="761 821 1366 896"> $A = (-0,1 \pm 0,08) + (1,05 \pm 0,09) \times 10^4 \times C_{\text{АК}},$ $(R^2 = 0,991),$ межа визначення 8×10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="1456 821 2060 896"> $A = (0,002 \pm 0,013) + (9,94 \pm 0,3) \times 10^3 \times C_{\text{АК}}$ $(R^2 = 0,999),$ межа визначення 10^{-6} моль/л </p>
 <p data-bbox="123 1356 728 1473"> $A = (0,015 \pm 0,033) + (2,49 \pm 0,3) \times 10^4 \times C_{\text{рутина}},$ $(R^2 = 0,982),$ межа визначення 10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="761 1356 1366 1473"> $A = (-0,05 \pm 0,07) + (2,35 \pm 0,3) \times 10^4 \times C_{\text{рутина}},$ $(R^2 = 0,979),$ межа визначення 3×10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="1456 1356 2060 1473"> $A = (0,006 \pm 0,018) + (2,13 \pm 0,08) \times 10^4 \times C_{\text{рутина}},$ $(R^2 = 0,998),$ межа визначення 7×10^{-7} моль/л </p>

Градувальні залежності для визначення ЕГКГ та ГК 18-МФК та реактивом ФЧ

$C_{ФЧ} \approx 2,4 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 11,4, $\lambda = 720$ нм, $l = 1$ см, $t = 10$ хв	$C_{18-МФК} = 1,6 \cdot 10^{-4}$ моль/л, рН = 7,4, $l = 1$ см, $t = 10$ хв	
	$\lambda = 820$ нм	$\lambda = 900$ нм
 <p data-bbox="123 821 750 893"> $A = (0,005 \pm 0,04) + (2,54 \pm 0,19) \times 10^4 \times C_{ЕГКГ}$, $(R^2 = 0,992)$, межа визначення 10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="795 821 1422 893"> $A = (-0,08 \pm 0,1) + (3,55 \pm 0,4) \times 10^4 \times C_{ЕГКГ}$, $(R^2 = 0,978)$, межа визначення 3×10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="1467 821 2094 893"> $A = (0,008 \pm 0,03) + (3,28 \pm 0,1) \times 10^4 \times C_{ЕГКГ}$, $(R^2 = 0,997)$, межа визначення 7×10^{-7} моль/л </p>
 <p data-bbox="123 1356 750 1428"> $A = -0,476 \pm 0,08 + (3,12 \pm 0,18) \times 10^4 \times C_{ГК}$, $(R^2 = 0,996)$, межа визначення 3×10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="795 1356 1422 1428"> $A = -0,08 \pm 0,09 + (4,78 \pm 0,56) \times 10^4 \times C_{ГК}$, $(R^2 = 0,978)$, межа визначення 10^{-6} моль/л </p>	 <p data-bbox="1467 1356 2094 1428"> $A = 0,008 \pm 0,02 + (4,11 \pm 0,1) \times 10^4 \times C_{ГК}$, $(R^2 = 0,999)$, межа визначення 5×10^{-7} моль/л </p>

3.5. Оцінка реакційної здатності 18-молібдодифосфату до реакцій з окремими фенольними сполуками, фенолами нерослинного походження та супутніми сполуками

Метою цієї частини роботи було встановлення реакційної здатності 18-МФК по відношенню до найбільш типових представників основних класів фенольних сполук. Оскільки реактив ФЧ є головним загальнозживаним реагентом для визначення загального вмісту фенольних сполук, отримані результати порівнювали з результатами аналізу цим методом.

У табл. 3.5 представлені умовні молярні коефіцієнти поліфенолів, визначені при оптимальних значеннях рН з використанням як аналітичних реагентів ФЧ та 18-МФК.

Таблиця 3.5

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

Фенольні сполуки		18-МФК $\epsilon^{820} \cdot 10^{-4}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$				Реактив ФЧ $\epsilon^{720} \cdot 10^{-4}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л},$ рН = 11,4
		рН = 7,4		рН = 9,5		
		15 хв	30 хв	15 хв	30 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
Флавани	ЕГКГ	3,65	4,0	3,73	5,0	2,46
Таніни	Галотанін	7,0	–	24,0	–	14,0
Антоціани	Ціанідин глікозид	0,08	0,09	0,09	0,12	0,14

Найбільш активними щодо реакції з 18-МФК виявилися флавоноли. Вони реагують з 18-МФК швидко навіть у нейтральному середовищі. Результати визначення співпадають з методом ФЧ, або трохи вище. Фенольні кислоти теж є доволі активними відновниками, але повнота реакції залежить від часу реакції і кислотності. Видно, що повне співпадіння з результатами визначення методом ФЧ у

загальному випадку спостерігається тільки при рН 9,5 та збільшенні часу визначення до 30 хв.

Реакційна здатність флавононів залежить від їх будови. У гесперидині у кільці В є дві гідроксильні групи в орто-положенні, а у ліквіритині тільки одна. Внаслідок цього гесперидин реагує повністю, а ліквіритин тільки в незначному ступеню. Втім ця поведінка є однаковою по відношенню і до 18-МФК, і до реактиву ФЧ. Визначення флавононів, як і фенольних кислот, необхідно проводити при рН 9,5, час реакції 30 хв.

Флавани (катехіни) найкраще реагують з 18-МФК при рН 9,5. У цьому випадку спостерігається добра кореляція (показано нижче) як з результатами визначення з реактивом ФЧ, так і з результатами інших методів.

Полімерні феноли, зокрема таніни, також потребують більш лужного середовища рН 9,5. В цих умовах достатньо 15 хв, щоб забезпечити достатньо повне окиснення цих поліфенолів, як це видно при порівнянні отриманих результатів з методом ФЧ.

Антоціани не реагують ні з 18-МФК, ні з реактивом ФЧ. Тому визначення цієї групи фенольних сполук доцільно проводити іншими методами.

З наведених даних видно, що в більшості випадків молярні коефіцієнти в перерахунку на поліфенол близькі 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 (наприклад, кверцетину або галотаніну) при використанні 18-МФК істотно вище, а отже вище і чутливість методик в порівнянні з реактивом ФЧ. В оптимальних умовах проведення аналізу також була оцінена реакційна здатність речовин, супутніх поліфенолам в рослинних об'єктах, які виявляють відновні властивості (табл. 3.6).

Виявлено, що визначенні поліфенолів 18-молібдодифосфату та реактивом Фоліна-Чокальтеу не заважають високі концентрації пікринової, цитратної, оксалатної, тартратної, сульфосаліцилової і ацетилсаліцилової кислот, о-крезола, кофеїна. Крім того на результати визначення з 18-молібдодифосфату, на відміну від реактиву Фолін-Чокальтеу, при рН 9,5 не впливає наявність фенолу,

п-крезолу, саліцилової кислоти, відновлюючих сахарів, пірідоксіна гідрохлоріда, а при рН 7,4 ще й тіаміна хлориду, фолієвої кислоти та тімолу.

Визначенню поліфенолів з реактивом ФЧ заважають високі концентрації таких активних відновників, як аскорбінова кислота. Для 18-МФК вдається без зусиль знайти область рН, в якій поліфеноли не заважають реакції ГПК з відновниками різної природи. Наприклад, при рН < 5 поліфеноли не заважають окисленню аскорбінової кислоти. Таким же чином можна врахувати вміст у рослинних об'єктах або інших зразках на їх основі тіолів (цистеїну, глутатіону) та інших більш активних, ніж поліфеноли, відновників.

Таблиця 3.6

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

Речовина	18-МФК		Реактив ФЧ
	$\varepsilon^{820}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$		$\varepsilon^{720}, \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1} \cdot \text{л}$
	рН = 7,4	рН = 9,5	рН = 11,4
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 гідрохлорід	20	20	1100
тіаміна хлорид	45	2500	42000
фолієва к-та	180	600	600
тімол	450	1200	1200
каптопріл хлорид	5500	5500	8000
аскорбінова к-та	12000	12000	10000
пірогалол карбонова к-та	10000	28000	28000
гідрохінон	15000	20000	28000

– речовина не реагує з ГПК.

3.6. Спектрофотометричне визначення кверцетину в таблетках «Квертин».

Розроблена методика для визначення кверцетину за допомогою 18-МФК була апробована при аналізі таблеток «Квертин». Перевірку правильності з результатів, одержаних розробленою методикою, проводили шляхом порівняння результатів аналізу із застосуванням запропонованого реактиву 18-МФК з даними, отриманими стандартними методиками, в яких використовують реактив ФЧ і алюмінію хлорид.

У результатах аналізу, представлених у таблиці 3.7, відсутня систематична похибка. По-перше, вміст кверцетину, визначений запропонованою методикою і двома стандартними методиками значимо не відрізняється, оскільки довірчі інтервали середніх арифметичних для всіх трьох методик перекриваються, а, по-друге, вміст кверцетину, гарантований виробником (40 мг/табл.), у всіх трьох випадках потрапляє в довірчий інтервал середнього арифметичного. Всі методики характеризуються високою відтворюваністю (1-2%).

Таблиця 3.7

Результати визначення кверцетину в таблетках «Квертин», 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)

3.7. Спектрофотометричне визначення рутина та аскорбінової кислоти при спільній присутності у штучних сумішах і лікарському препараті «Аскорутин»

Нами вперше розроблено спектрофотометричну методику з 18-МФК, яка дозволяє одночасно визначати поліфеноли та інші відновники (наприклад АК) при сумісній присутності за рахунок варіювання рН (рис. 3.24).

Використання реактиву ФЧ для цієї мети неможливо через нелінійність градуовальної залежності. Розроблена нами спектрофотометрична методика була апробована на штучних сумішах та у таблетках «Аскорутин». 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 світлопоглинання двох дослідів.

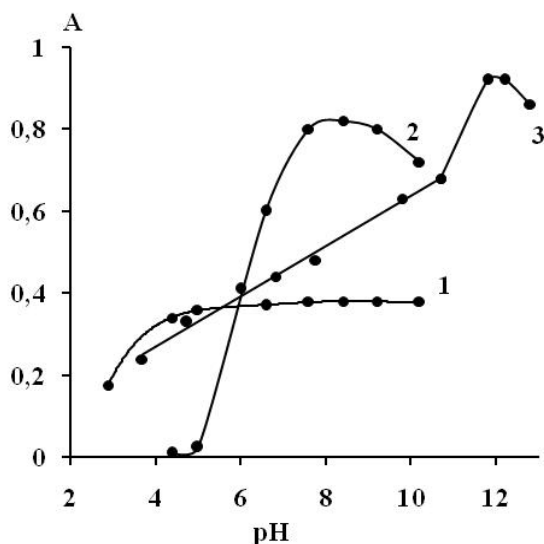


Рис. 3.24. Вплив рН розчину на оптичну густину при відновленні 18-МФК аскорбіною кислотою (1) та рутином (2) та окисненні рутину реактивом ФЧ (3). $C_{18\text{-МФК}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{\text{ФЧ}} = 2 \cdot 10^{-4}$ моль/л $\lambda = 820$ нм, $l = 2$ см, $t = 15$ хв, (1) – $C_{\text{АК}} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, (2, 3) – $C_{\text{рутина}} = 1,5 \cdot 10^{-5}$ моль/л

Оскільки вміст АК в таблетках «Аскорутин» може бути істотно вище, ніж рутина, було оцінено вплив співвідношення АК і рутина в штучних сумішах на точність визначення рутина (табл. 3.8). Концентрація рутина визначається за різницею оптичних густин двох дослідів, тому в результаті вноситься ще більша позитивна систематична похибка, величина якої при збільшенні співвідношення аскорбінової кислоти до рутина зростає аж до $\sim 50\%$. При використанні лінійних градувальних графіків ($\lambda = 900$ нм) загальна похибка визначення, яка визначається тільки випадковою похибкою, не перевищує 2-4% (табл. 3.9). При аналізі реальних зразків «Аскорутину» запропонованою методикою в результатах визначення відсутня систематична похибка (табл. 3.10). По-перше, вміст рутина і АК, одержаний 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 (табл. 3.10). Всі методики характеризуються високою відтворюваністю (1-3%).

Таблиця 3.8

Визначення вмісту аскорбінової кислоти та рутина у штучних сумішах

Введено рутина, мкмоль/л	Введено АК, мкмоль/л	Знайдено рутина, мкмоль/л (S_r)	Знайдено АК, мкмоль/л (S_r)
20	20	20,22 ± 0,32 (0,015)	19,5 ± 0,6 (0,027)
10	20	9,89 ± 0,36 (0,035)	20,36 ± 0,21 (0,010)
10	40	9,58 ± 0,20 (0,020)	40,4 ± 0,6 (0,014)
7,5	60	7,33 ± 0,20 (0,026)	61,4 ± 0,9 (0,014)
10	80	9,8 ± 0,5 (0,048)	81,7 ± 1,6 (0,019)
3,5	60	3,62 ± 0,34 (0,09)	60,9 ± 1,5 (0,024)

Таблиця 3.9

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

Введено		Знайдено ($\lambda = 820$ нм)				Знайдено ($\lambda = 900$ нм)			
$C_{\text{АК}},$ μM	$C_{\text{рутина}},$ μM	$C_{\text{АК}} \pm \Delta,$ μM	%	$C_{\text{рутина}} \pm \Delta,$ μM	%	$C_{\text{АК}} \pm \Delta,$ μM	%	$C_{\text{рутина}} \pm \Delta,$ μM	%
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

Таблиця 3.10

Результати визначення аскорбінової кислоти та рутина в таблетках «Аскорутин» запропонованою та стандартними методиками (мг / таблетка ± Δ , n = 5, P = 95%)

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

^a Визначення з використанням 2,6-феноліндофенолу. ^b Визначення з AlCl_3 .

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 3

Розділ присвячено вивченню особливостей взаємодії та реакційної здатності 18-МФК та реактиву ФЧ по відношенню до окремих представників ФС. На підставі отриманих експериментальних даних зроблені висновки:

1. Окиснена (жовта) форма 18-МФК є стійкою в інтервалі рН 2-5, а а відновні властивості фенолів значно зростають у лужному середовищі. Збільшити стійкість 18-МФК за цих умов можливо, якщо замінити його на потрійний комплекс загальної формули $P_2Mo_{18-n}W_nO_{62}^{6-}$ ($n=2-4$) або додаючи до розчину окисненої форми ГПК НПАР.

2. В результаті систематичного вивчення особливостей взаємодії 18-МФК з фенольними сполуками встановлено, що він у порівнянні з реактивом ФЧ та 18-МВФК з меншою часткою Вольфраму ($n=2-4$) є більш сильним окисником по відношенню до фенолів, інтервал оптимальних значень кислотності зсунутий в ділянку менших значень рН. Відмінності у складі ГПА істотно не впливають на величини ефективних молярних коефіцієнтів ГПС в реакціях з представниками різних класів поліфенольних сполук.

3. 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, а з реактивом ФЧ – тільки при рН більше 10. Для визначення менш реакційноздатних ФС (полімерних поліфенолів, катехінів, оксибензойних кислот) оптимальною є область рН вище 9,0.

4. При визначенні ФС з 18-МФК достатньо використовувати невеликий надлишок реагенту. З метою розширення інтервалу визначуваних концентрацій ФС, як оптимальну запропоновано використовувати концентрацію 18-МФК $2 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Це значення на порядок менше аніж у стандартній методиці з реактивом ФЧ.

5. 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 градувальних залежностей. У розчинах 18-МФС співіснують одно- ($\lambda_{\max} \approx 1000$ нм) та двоелектронні ГПС ($\lambda_{\max} = 820$ нм), а для реактиву ФЧ відбувається перехід від двох- ($\lambda_{\max} = 760$ нм) до

чотирьохелектронної ГПС ($\lambda_{\max} \approx 620$ нм). На відміну від реактиву ФЧ у спектрах ГПС, одержаних при відновленні 18-МФК фенольними сполуками, спостерігається ізобестична точка ($\lambda = 900$ нм), що дозволяє ліанірезувати градувальні залежності.

6. У більшості випадків молярні коефіцієнти ГПС, які утворюються при відновленні 18-МФК та реактиву ФЧ, у перерахунках на поліфеноли близькі 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 (кверцетин та галотанін) при використанні 18-МФК істотно вище, а отже вище і чутливість методик в порівнянні з реактивом ФЧ.

7. Визначення поліфенолів з 18-МФК в цих умовах не заважають високі концентрації відновлюючих сахарів, простих монофенолів, сульфат-іонів, саліцилової кислоти, вітамінів В-групи та деяких інших речовин. Крім того при використанні 18-МФК стає можливим роздільне визначення поліфенолів та більш активних відновників шляхом варіювання рН, що дозволило розробити методику одночасного визначення рутина та аскорбінової кислоти при спільній присутності.

РОЗДІЛ 4

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ, КОЛЬОРОМЕТРИЧНЕ ТА ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ
СУМИ ФЕНОЛЬНИХ СПОЛУК З ВИКОРИСТАННЯМ
18-МОЛІБДОДИФОСФАТУ**4.1. Порівняльна характеристика результатів спектрофотометричного визначення загального вмісту фенолів у рослинних об'єктах з використанням алюміній хлориду, 18-молібдодифосфату та реактиву Фоліна-Чокальтеу**

У попередньому розділі нами були розглянуті особливості взаємодії двох аналітичних реагентів структури Доусона – 18-молібдодифосфату і реактиву ФЧ з індивідуальними представниками різних класів фенольних сполук, характерних для рослинних об'єктів, а також з речовинами, які можуть спричинити заважаючий вплив на визначення фенолів. Був зроблений висновок про подібність реакційної поведінки цих двох речовин. Враховуючи різноманітність фенолів у рослинах і наявність у них відновників нефенольного походження було доцільно підтвердити зроблені висновки на прикладі аналізу досить великого числа об'єктів, у тому числі рослинних зразків і ряду лікарських препаратів на основі природних компонентів.

Спектрофотометрична методика для визначення суми флавоноїдів з використанням 18-молібдодифосфату. В мірну колбу на 25 мл вносять аліквоту аналізованого розчину, 0,8 мл $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л 18-МФК, 5 мл фосфатного буферного розчину з рН 7,4, доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Оптичну густину вимірюють через 15 хв при 820 нм або 900 нм.

Спектрофотометрична методика для визначення суми фенольних сполук з використанням 18-молібдодифосфату: в мірну колбу на 25 мл вносять аліквоту аналізованого розчину, 0,8 мл $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л 18-МФК, 3 мл боратного буферного розчину з рН 9,5, доводять об'єм дистильованою водою до мітки. Оптичну густину вимірюють через 15 хв при 820 нм або 900 нм. Якщо ж у зразку, який аналізують, переважають прості феноли, час реакції має бути збільшений до 30 хв.

Відповідність результатів визначення запропонованими методиками з 18-МФК у рослинних об'єктах загальному вмісту фенолів підтверджено результатами

аналізу, які було отримано з використанням реактиву ФЧ та хлориду алюмінію (табл. 4.1-4.4). У тому випадку, коли у рослинах серед інших фенольних сполук переважали флавоноли: рутин у софорі, апігенін у ромашці («Ротокан»), ізокверцетин у календулі, лутеолін та апігенін у деревію, кемпферол, кверцетин та ізорамнетин у гінго білобі («Гінкофар»), а також флавонони: гесперидин у цедрі лимона, нарінгенін у плодах та цедрі грейпфрута, результати визначення усіма трьома методиками виявилось настільки близькими, що різниця між ними була практично відсутньою. Зрозуміло, що умовні молярні коефіцієнти отримані з різними реагентами в загальному випадку не можуть співпадати, але для результатів визначення флавонолів довірчі інтервали перекривалися.

Таблиця 4.1

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 pH=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)

Було показано, що для більшості випадків при аналізі препаратів на основі рослинної сировини та біологічно активних добавок, які містять різні групи фенольних сполук, з використанням алюміній хлориду отримують сильно занижені результати у порівнянні з 18-МФК та реактивом ФЧ. Це пов'язано з наявністю в цих зразках таких груп фенольних сполук, які або не реагують з алюміній хлоридом або поглинання їх комплексів знаходиться в УФ області. В плодах глоду – катехінів, фенольних кислот, аскорбінової кислоти; в квітах гібіскуса – фенольних кислот; в квітах граната – танінів; в корені солодки – ліквіритину (окси-групи в положенні 3 і 5 відсутні) і галотанінів; в календулі – галової кислоти. Двократне заниження результатів визначення фенолів у «Фламіні» (препараті на основі квітів безсмертника) обумовлено тим, що в ньому приблизно в рівних частках присутні флавоноли і фенольні кислоти, серед яких переважає хлорогенова кислота.

Особливо велика різниця в результатах аналізу для препаратів, в яких частка флавонолів мала. При аналізі «Мікстури від кашлю» на основі коренів алтея і солодки або «Краталу» (екстракти глоду і деревію) метод з хлоридом алюмінію не враховує наявність катехінів, лейкоантоціанів, фенольних кислот, в препараті «Альтан» і квітах шипшини – елаготанінів, у зелених чаях – катехінів, у каві – хлорогенової кислоти, сумасі – фенольних кислот і галотанінів, соках цитрусових – аскорбінової кислоти, в корі дуба – фенольних кислот та елаготанінів.

Таблиця 4.2

Сумарний вміст фенолів у препаратах на основі рослинної сировини і біологічно активних добавках у перерахунку на рутин, знайдений з використанням 18-МФК, $AlCl_3$ 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

При визначенні поліфенолів в квітах гібіскуса і граната, плодах шипшини з алюміній хлоридом в спектрах поглинання спостерігаються дві смуги з максимумом поглинання при 410 нм (комплекс Алюмінію з флавонолами) та 520 нм (власне поглинання антоціанів), які слабо перекриваються. Антоціани не окислюються ні 18-МФК, ні реактивом ФЧ. Тому оцінка вмісту поліфенолів в цих зразках з використанням реакції з 18-МФК і реактивом ФЧ враховує внесок флавонолів, фенольних кислот і танінів, а в разі алюміній хлориду – тільки флавонолів.

При аналізі деяких препаратів, таких як БАД «Формула-3», а також соків овочів (червоної цибулі, імбиру, білокачанної капусти) іон Алюмінію утворює малорозчинні сполуки з компонентами, що входять до їх складу. Наведені дані підтверджують висновок про те, що кореляція результатів визначення суми поліфенолів, отриманих з використанням 18-МФК та реактиву ФЧ, з результатами

методики, яка використовує хлорид алюмінію, спостерігається тільки у тому випадку, якщо у рослинах домінують флавоноли, які мають гідроксильні групи в положенні 3 та/або 5.

Таблиця 4.3

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

Зразок	$AlCl_3$	18-МФК рН=7,4	18-МФК рН=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 4.4.

Сумарний вміст фенолів в свіжовиготовлених соках овочів та фруктів у перерахунку на рутин, знайдений з використанням 18-МФК, $AlCl_3$ та реактиву Фоліна-Чокальтеу, мг / 100 мл, n = 6, P = 0,95.

Рослинні об'єкти	$AlCl_3$	18-МФК рН=7,4	18-МФК рН=9,5	Реактив ФЧ
Апельсин	6,0	49,1	75,8	78,3
Грейпфрут	1,9	52,0	–	75,8
Лимон	2,5	44,0	–	84,0
Цибуля ріпчаста	3,2	16,5	–	33,2
Цибуля червоний червона	мутний розчин	57,7	–	88,3
Імбир	мутний розчин	52,6	–	63,1
Капуста білокачанна	мутний розчин	7,1	13,7	40,9
Капуста червонокачанна	немає забарвлення	83,6	–	219,4
Салат «Айсберг»	–	43,8	–	79,6

(–) – немає даних.

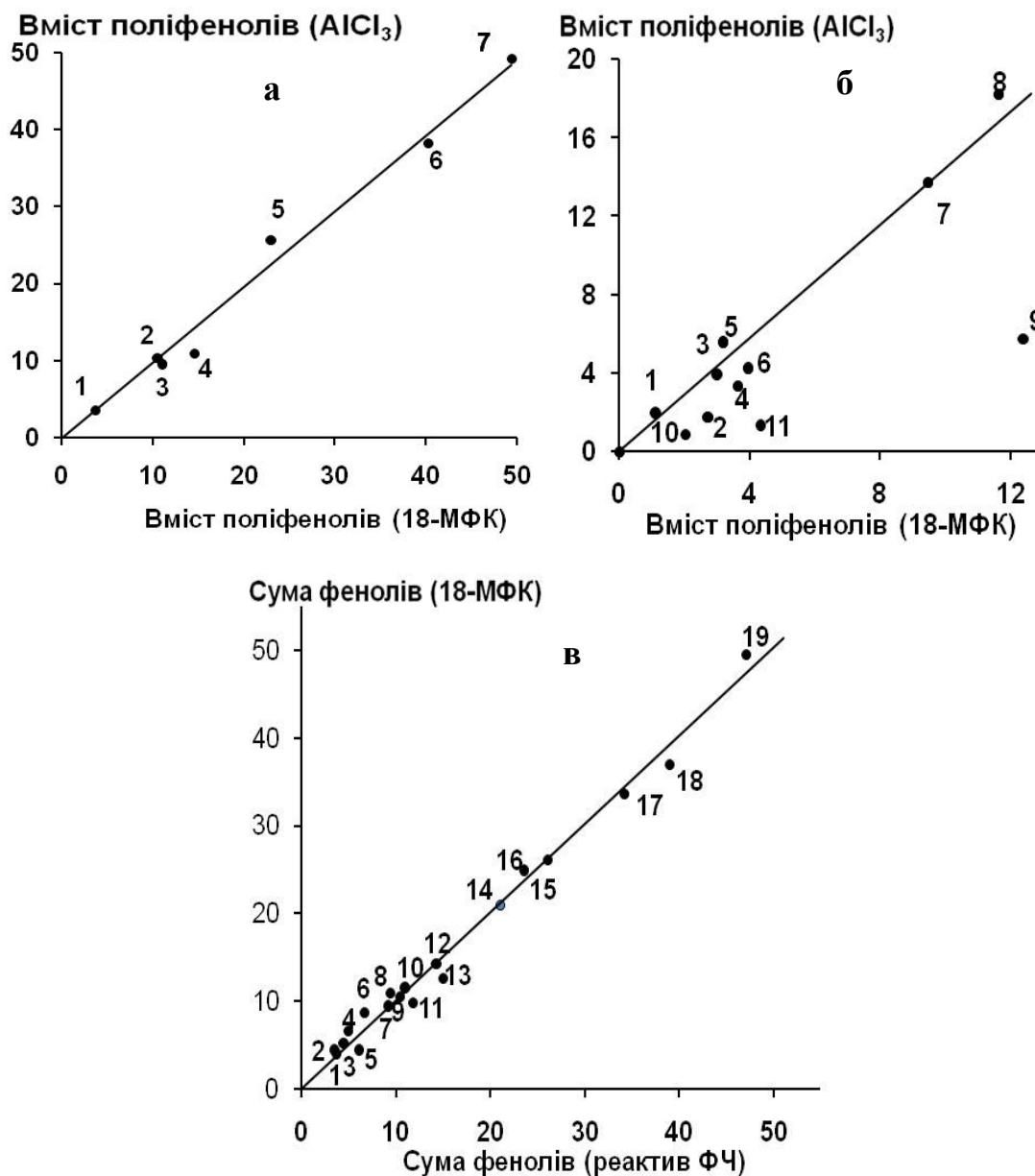


Рис. 4.1. Кореляційні залежності загального вмісту поліфенолів у рослинних об'єктах, знайденого з використанням 18-МФК і алюміній хлориду (а, б), 18-МФК та реактиву Фоліна-Чокальтеу (в)

На рис. 4.1а наведено вміст поліфенолів в перерахунку на кверцетин в препаратах: (1) – «Гінкофар» (мг/табл.); (2) – «Софора японська» (мг/мл); (3) – Ротокан» (мг/мл); (4) – «Календула настойка» (мг/10 мл); (5) – «Ascorutin», Zentiva, Чехія (мг/табл.); (6) – «Квертин» (мг/табл.); (7). – «Аскорутин» (мг/табл.), Борщаговський ХФЗ, Україна. В скобках наведені використані одиниці вмісту поліфенолів в перерахунку на кверцетин.

На рис. 4.1б наведено вміст поліфенолів в перерахунку на кверцетин в препаратах: (1) – «Мікстура від кашлю» (мг/г порошку); (2) – «Настойка глоду» (мг/10 мл); (3) – «Ротокан» (мг/мл); (4) – «Календула настойка» (мг/10 мл); (5) – «Солодка корені, сироп» (мг/10 мл); (6) – «Софора японська» (мг/мл); (7) – «Гінкофар» (мг/табл.); (8) – «Фламін 0,05 г» (мг/табл.); (9) – «Кратал» (мг/табл.); (10) – Чай зелений «Кволіті» (г/100 г сухої речовини); (11). – «Ascorutin» (мг/табл.). В скобках наведені використані одиниці вмісту поліфенолів в перерахунку на кверцетин.

На рис. 4.1в наведено вміст поліфенолів в перерахунку на рутин в (1) – плодах шипшини, (2) – шовковиці, (3) – апельсині, (4) – гранаті, (5) – грейпфруті, (6) квітках шипшини, (7) – лимоні, (8) – «Ротокан», (9) – «Фламін 0,05 г », (10) – «Софорі японській», (11) – «Настоянки глоду », (12) – « Календули настоянці», (13) – «Солодки корені, сиропі », (14) – корі дуба, (15) – «Мікстурі від кашлю дитячої», (16) – гібіскусу, (17) – «Осокорі», (18) – «Гінкофар», (19) – «Кратал». У дужках вказано позначення на графіку.

Як видно з таблиць 4.1-4.3 і рис. 4.1в, для більшості досліджених рослинних зразків результати аналізу, отримані з використанням 18-МФК і з реактивом ФЧ, добре корелюють між собою. Для об'єктів аналізу, наведених у табл. 4.1 і 4.2, коефіцієнт кореляції залежності сумарного вмісту фенолів, розрахований для методики з 18-МФК при рН 7,4 та для реактиву ФЧ, становить 0,955. Тангенс кута нахилу цієї залежності незначимо відрізняється від одиниці ($0,97 \pm 0,06$), а вільний член від нуля ($0,3 \pm 0,7$) (в дужках вказані значення коефіцієнтів b і a в рівнянні регресії прямої лінії та їх стандартні відхилення, розраховані методом найменших квадратів). Для даних таблиці 4.3 (за виключенням частини даних для 18-МФК, отриманих при рН 9.5) аналогічна кореляційна залежність описується наступним рівнянням: $C(18\text{-МФК}) = 2,3 \pm 2,2 + (0,825 \pm 0,025) \times C(\text{реактив ФЧ})$, $R^2 = 0,996$. Настільки ж висока ступінь кореляції спостерігається і для узагальнених даних, отриманих для об'єктів аналізу з усіх трьох таблиць (рис. 4.1). Коефіцієнт кореляції складає 0,988.

Слід відмітити, що значення вмісту поліфенолів для методик, що порівнюються, не тільки добре корелюють, а й близькі за абсолютною величиною. Це пояснюється тим, що умовні величини молярних коефіцієнтів для великої групи поліфенолів в середньому мало відрізняються один від одного. Наведені чисельні приклади аналізу реальних рослинних препаратів переконливо доводять близькість хімічної поведінки 18-МФК і реактиву ФЧ відносно фенолів, обумовлену аналогією в структурі і близькістю окисно-відновних потенціалів цих гетерополікомплексів. Ці приклади підтверджують, що 18-МФК є аналітичним реагентом альтернативним реактиву ФЧ і може бути з успіхом використаний замість нього, особливо в тих ситуаціях, де проявляються його переваги.

pH 7,4 може бути рекомендований для визначення суми фенолів лише у тому випадку, якщо в зразку переважають флавоноли (софора, календула, гінгко білоба). Якщо загальний вміст поліфенолів поряд з флавонолами визначається присутністю оксікоричних кислот, то результати визначення також є дуже близькими при використанні обох реагентів («Ротокан», «Фламін», «Мікстура від кашлю», гібіскус, гранат, кава). Невелика частка флаванів у такій суміші фенольних сполук суттєво не впливає на близькість результатів («Кратал»). Такий же висновок справедливий і у випадку, якщо до складу рослинного препарату поряд з флавонолами входять елагова кислота або елаготаніни («Альтан», шипшина).

При аналізі спиртових витяжок з цедри та соку цитрусових фруктів, а також соків овочів (капусти білокачанної та червонокочанної, цибулі, імбиру, салату) вміст поліфенолів, визначений з 18-МФК при pH 7,4, виявляється істотно меншим, ніж з реактивом ФЧ, а при pH 9,5 приблизно однаковим. Це пов'язано з тим, що для 18-МФК умовні молярні коефіцієнти поліфенолів, а також швидкість хімічної реакції при pH 7,4 і 9,5 можуть сильно відрізнятися. Прикладом служить визначення суми фенолів у цитрусових, де переважає гесперидин, сумасі, корі дуба, в яких у великій кількості містяться оксибензойні кислоти, полімерні поліфеноли, в гліді і зеленому чаї – катехинів. З наведеного можна зробити висновок, що при визначенні поліфенолів з недостатньо високою реакційною здатністю при використанні 18-МФК необхідно проводити аналіз при $\text{pH} > 9,0$.

Для «Мікстури від кашлю», таблеток «Кратал» і «Альтан» невелике завищення результатів аналізу з 18-МФК у порівнянні з реактивом ФЧ може бути пояснено відмінністю у величинах умовних молярних коефіцієнтів. Так, для галотаніну, який міститься в «Альтані», умовний молярний коефіцієнт при використанні 18-МФК становить $2,4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$, а для реактиву ФЧ – $1,4 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{л} \cdot \text{см}^{-1}$. Умовний молярний коефіцієнт для катехінів при взаємодії з 18-МФК приблизно в 1,5 рази вище, ніж з реактивом ФЧ. Тому формально вміст поліфенолів в зеленому чаї, розрахований для методики з 18-МФК при рН 9,5, є більш високим.

Найбільш складно знайти ймовірні причини розбіжностей результатів визначення розглянутими реагентами в тому випадку, якщо при використанні реактиву ФЧ виходить суттєве завищення знайденого вмісту суми фенолів порівняно з 18-МФК (солодка, глід, грейпфрут, капуста білокачанна та червонокачанна, цибуля, імбир, салат), оскільки повна інформація про реакційну здатність обох реагентів по відношенню як до окремих представників поліфенольних сполук, так і речовин нефенольного походження поки відсутня. Можливо розбіжності у результатах визначення вмісту поліфенолів, знайденого з використанням 18-МФК та реактиву ФЧ у капусті білокачанній та червонокачанній, цибулі, імбиру, салаті пов'язані, з тим, що у цих овочах у великій кількості містяться оксibenзойні кислоти, полімерні поліфеноли, амінокислоти, відновлюючі сахари, які при рН 9,5 мають менший умовний молярний коефіцієнт для реакції з 18-МФК.

Правильність результатів і вибору стандарту при побудові градуовального графіка для запропонованої методики підтверджується і порівнянням отриманих результатів аналізу рослинних об'єктів з типовими значеннями вмісту суми поліфенолів, знайденими в літературі (табл. 4.5). Вміст поліфенолів, одержаний з використанням запропонованого нами реагенту 18-МФК, знаходиться в інтервалі концентрацій, типових для даного рослинного об'єкта, або є досить близьким до нього, за умови використання одного і того ж самого стандарту (рутину або галової кислоти). В окремих випадках отримані розбіжності щодо вмісту ФС у рослинних об'єктах були більш суттєвими. Це може бути обумовленим залежністю складу

рослинного об'єкта від країни походження, частини рослини, яка аналізувалася, часу збору тощо.

Таблиця 4.5

Порівняння сумарного вмісту поліфенольних сполук, знайденого з використанням 18-МФК в деяких рослинних об'єктах аналізу в перерахунку на рутин, з літературними даними

Зразок	Літературні дані	Знайдено з 18-МФК
Апельсин, мг / 100 г	517 – 621	530
Грейпфрут, г /100 г	0,38 – 1,08	0,44
Зелений чай, мг / г	145	264
Квіти гібіскуса, мг / г	78 (з антоціанами) 54 (без антоціанів)	26
Софора японська, мг / г	270	530
Глід настойка, мг / мл	1,8 – 2,2	1,1
Календула, мг / г	148	145
Лопух, мг / г	4,9	2,5

Примітка: значення вмісту поліфенолів отримані з додатку 1 та перераховані на рутин

Сукупність переваг 18-МФК у порівнянні з реактивом ФЧ, які наведені в табл. 4.6, дозволяють зробити висновок щодо корисності цього реагенту при визначенні ФС. Відмінності у будові, складі, окисно-відновних властивостей цих ГПК є незначними, що дозволяє отримувати результати визначення загального вмісту ФС у рослинних об'єктах, які добре корелюють між собою. 18-МФК, як і реактив ФЧ, є універсальним реагентом для визначення сукупності ФС будь-якої будови. Слід зазначити, що сфера застосування 18-МФК при визначенні ФС ширше і не обмежується лише оцінкою сумарного вмісту. На противагу реактиву ФЧ можна визначати індивідуальні представники фенолів, проводити одночасне визначення одних фенолів у присутності інших фенолів або досить сильних відновників нефенольної природи.

В той же час те, що кількісна взаємодія 18-МФК з ФС на відміну від реактиву ФЧ може проходити в слабко лужному та нейтральному середовищі, дозволяє розрізнити вплив відновників фенольної та нефенольної природи. Наявність відновлюючих сахарів, амінокислот, протеїнів, вітамінів групи В, амінів у рослинних об'єктах призводить до того, що з реактивом ФЧ отримують завищенні

результати. Це може дуже сильно спотворити оцінку АОА, харчової корисності, здатності конкретного рослинного препарати бути добрим профілактичним засобом у боротьбі зі старінням організму, утворенням ракових клітин, захворюваннями серцево-судинної системи тощо. Усі вище названі речовини або не мають відношення до корисних речовин, або ефекти, які вони спричиняють є набагато менш корисним.

У цій роботі вперше показані причини того, що при використанні реактиву ФЧ завжди отримують нелінійні градууювальні залежності, а для 18-МФК градууювальні залежності, побудовані при довжині хвилі, яка відповідає ізобестичній точці, є лінійними у широкому інтервалі концентрацій. В окремих випадках може стати у нагоді висока швидкість реакції ФС з 18-МФК. Наприклад в автоматизованому проточному аналізі низька швидкість призводить до того, що довжину реакційної спіралі роблять дуже довгою (до 13 м) [135]. До того ж, довгий час знаходження в проточній системі сильно збільшує дисперсію забарвленої зони, що призводить до значного погіршення чутливості.

Таблиця 4.6

Порівняльна характеристика 18-МФК та реактиву ФЧ, як аналітичних реагентів при визначенні ФС

Параметри, за якими порівнювали	18-молібдодифосфат	18-молібдовольфрамодифосфат (реактив Фоліна-Чокальтеу)
Хімічна формула	$P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$	$P_2Mo_nW_{18-n}O_{62}^{6-}$ (n=4-5)
Синтез	Умови синтезу контрольовані та добре відомі	Склад вихідної речовини може змінюватися в залежності від умов синтезу
Оптимальне значення рН	7,0 – 10,0	11,4 ± 0,1
Час реакції	1 – 30 хв	15– 60 хв
Концентрація реагенту	Надлишок реагенту не потрібен, достатньою є конц. 18-МФК, яка відповідає стехіометрії реакції	Необхідно використовувати великий надлишок реагенту
Спектри поглинання	Спектр поглинання ГПС залежить від співвідношення реагент : аналіт. При $\lambda = 900$ нм є ізобестична точка, у якій молярний коефіцієнт не залежить від цього співвідношення. Градувальні залежності є строго лінійними при 900 нм. Закон Бера зберігається в широкому інтервалі концентрацій.	Спектр поглинання гетерополісині залежить від співвідношення реагент : аналіт. Максимум смуги поглинання ГПС коливається в межах від 640 до 760 нм. Градувальні залежності є нелінійними при будь-якій довжині хвилі.
Межа визначення, кверцетину, мкмоль/л	0,05 (l = 5 см)	1,0 (l = 1 см). При менших концентраціях градувальна залежність є сильно нелінійною.
Реакційна здатність по відношенню до фенольних сполук	Дія реактиву є більш вибірковою по відношенню до фенольних сполук. Може бути врахований вміст більш сильних відновників, (аскорбінова кислота, тіоли)	При оцінці суми фенольних сполук враховується вміст багатьох інших відновників нефенольної природи (відновлюючі сахари, протеїни, оксикислоти, тіамін, відновники середньої сили).
Утворення осадів	Не спостерігається	Можливе
Визначення індивідуальних поліфенолів	Можливе	Неможливе
Однчасне визначення двох відновників	Можливе	Неможливе
Придатність до створення тест-методик	Придатний	Малопридатний
Можливість автоматизації	Повністю придатний	Обмежено

4.2. Спектрофотометричне визначення загального вмісту поліфенольних сполук у чаях

В даній частині роботи з використанням у якості аналітичного реагенту 18-МФК розроблені методики спектрофотометричного визначення суми фенольних сполук у чаях та роздільного визначення танінів і флавоноїдів у чорних чаях.

Для оцінки правильності розроблених методик аналізу зелених та чорних чаїв ми обирали ті методи, які є загальноновизнаними для даної групи ФС. Для визначення суми ФС у чаях застосовують декілька методів: метод перманганатометричного титрування у присутності індикатору індигосульфокислоти (метод Левенталя), спектрофотометричний метод з застосуванням реактиву Фоліна-Чокальтеу. Ці методи використовуються у якості державного стандарту.

Для вилучення фенольних сполук з зелених та чорних чаїв у випадку методу Левенталя використовували водну витяжку з висушеної наважки чайного листа. При використанні 18-МФК намагалися варіювати спосіб вилучення, у якості екстрагенту застосовували, як воду, так і спирти (метанол, етанол).

Результати аналізу чаїв, отримані з використанням методу Левенталя та 18-молібдодифосфату наведені у табл. 4.8 та на рис. 4.2 а. Вміст поліфенолів у зелених чаях знайдений методом перманганатометричного титрування добре корелює з результатами, отриманих з використанням 18-МФК (рис. 4.2 б), коефіцієнт кореляції складає 0,952. Можна припустити що, глибина окиснення (кількість електронів, які віддає фенол) катехінів, які переважають у зелених чаях, є приблизно однаковою для обох реагентів.

Для чорних чаїв вміст фенольних сполук, знайдений методом Левенталя, є набагато більшим ніж той, що отримують при аналізі з 18-МФК і крім того спостерігається погана кореляція між результатами обох методів (рис. 4.2 в). Це пояснюється тим, що на відміну від 18-МФК, калій перманганат може окислювати не тільки поліфеноли, а також і прості фенольні сполуки та інші відновники нефенольної природи, при чому ступень окиснення може сильно варіюватися в залежності від природи фенола та часу окиснення. Власне інтенсивне забарвлення розчинів чаїв ускладнює точне визначення точки еквівалентності, що погіршує

відтворюваність отриманих результатів. На відміну від методу Левенталєя спектрофотометрична методика визначення поліфенолів у чаях з використанням 18-МФК є набагато більш експресною. Титрометричний метод з калій перманганат є недостатньо вибіркоким по відношенню до поліфенолів. Результати аналізу, отримані з використанням 18-МФК, є більш точними ніж перманганатометричним титруванням, а оцінка харчової цінності та АОА є більш об'єктивною.

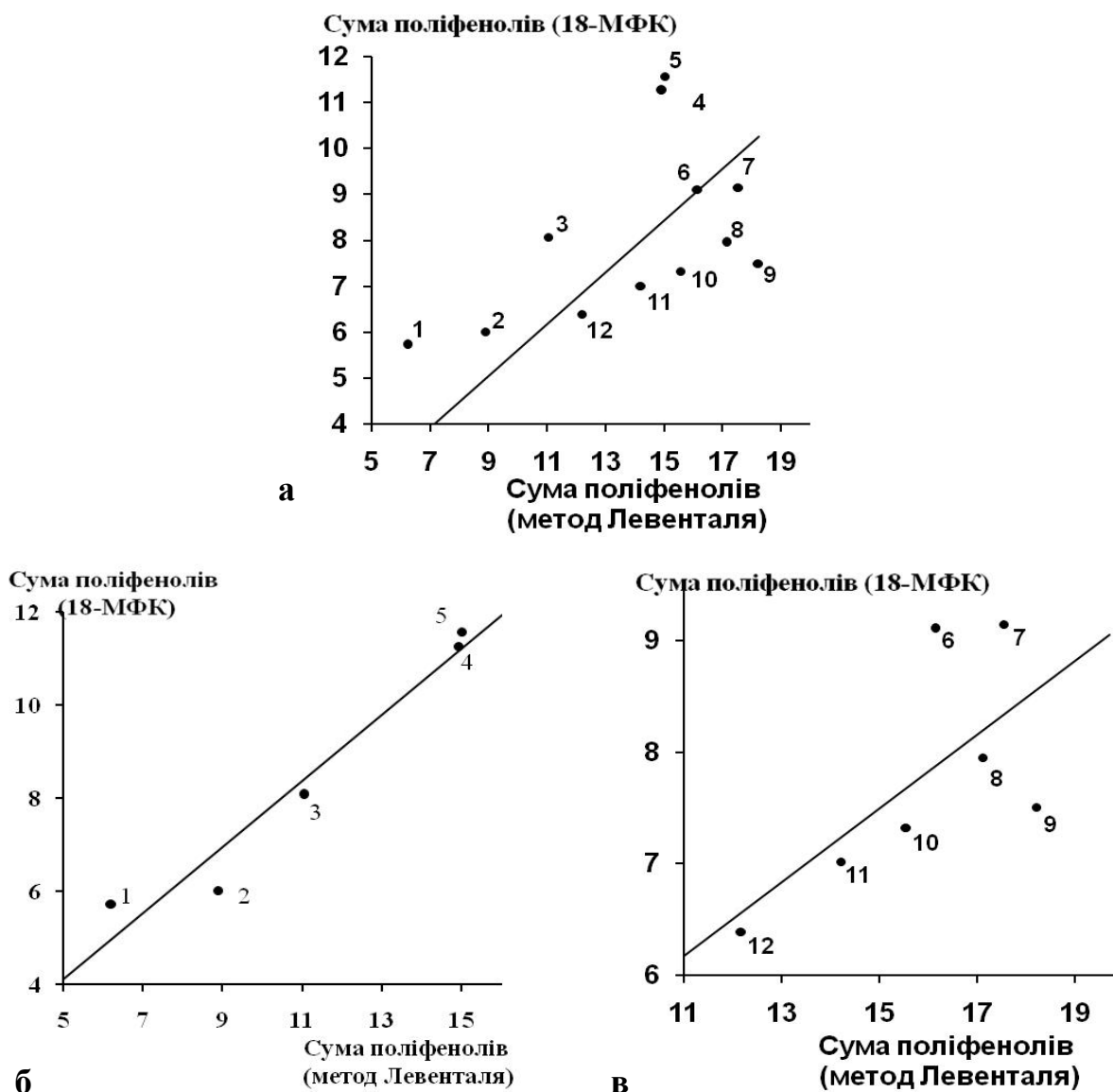


Рис. 4.2. Кореляційна залежність загального вмісту поліфенолів у чаях (а), зелених чаях (б) та чорних чаях (в), знайденого з використанням 18-МФК та калій перманганату. Зелені чаї: «Qualitea» (1), «Hyleys» (2), «Curtis Bountea White Tea» (3), «Greenfield Flying Dragon» (4), «Поднебесный чай» (5). Чорні чаї: «Bestsellers» Английский к завтраку» (6), «Ahmad «Английский завтрак» (7), «Greenfield Golden

Ceylon» (8), «Qualitea» (9), «Lipton Yellow Label» (10), «Тянь Шань» (11), «Huleys» (12). У дужках наведено номер відповідної точки на графіку

Для вибіркового визначення танінів, що містяться у чорних чаях, та катехінів, які переважають у зелених чаях, у якості аналітичного реагенту широко використовують ванілін. Отриманий нами досвід та літературні дані вказують на те, що при використанні ваніліну є необхідним суворе дотримання ряду умов. Результати аналізу сильно залежать від того, який розчинник застосовують для витяжки поліфенолів з чаїв (метанол чи етанол), чим підкислюють – сірчаною чи соляною кислотою, ступеню чистоти препарату ваніліну. Показано, що краще використовувати метанольну витяжку, тому що для етанольної витяжки в окремих випадках утворення забарвлених комплексних сполук не відбувається. Підкислення краще проводити соляною кислотою для отримання більш стабільних результатів та досягнення максимального значення світлопоглинання.

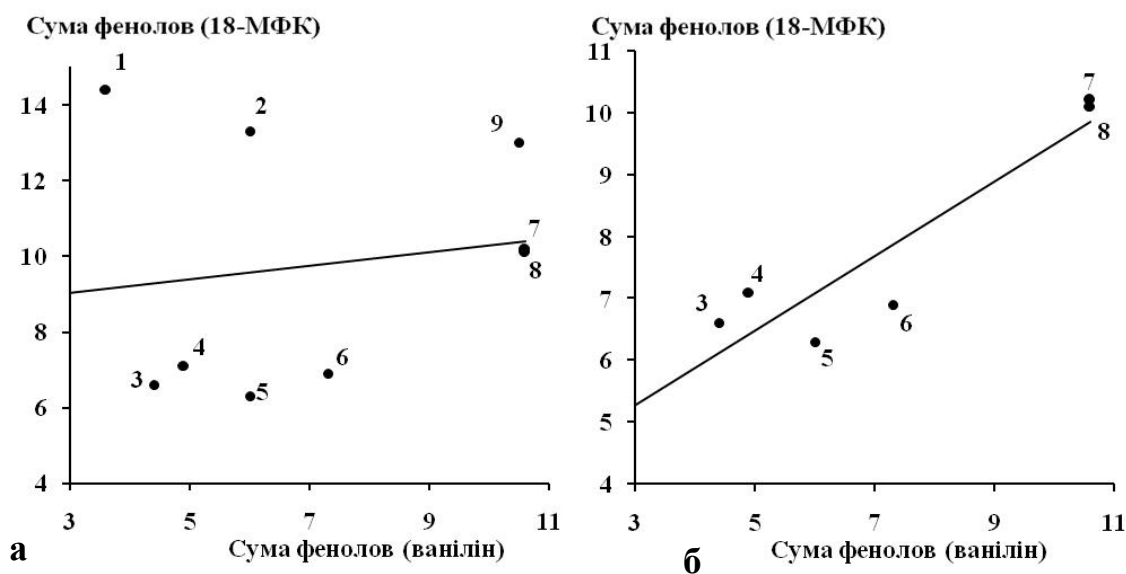


Рис. 4.3. Кореляційна залежність загального вмісту поліфенолів у чаях (а) та чорних чаях (б), знайденого з використанням 18-МФК та ваніліну. Зелені чаї: «Поднебесный чай» (1), «Greenfield Flying Dragon» (2), «Ahmad» зелений чай листовий» (9). Чорні чаї: «Тянь Шань» (3), «Bestsellers» Английский к завтраку» (4), «Huleys» (5), «Lipton Yellow Label» (6), «Greenfield Golden Ceylon» (7), «Аскольд» (8). У дужках наведено номер відповідної точки на графіку

При дотриманні цих умов результати визначення танінів у чорних чаях з ваніліном та з 18-МФК мають задовільний ступінь кореляції $R^2 = 0,848$ (рис. 4.3 б, табл. 4.8), що є ще одним підтвердженням правильності результатів визначення суми фенолів, які отримують з запропонованим нами реагентом. Доволі складно пояснити незадовільну кореляцію між результатами двох методів при аналізі зелених чаїв (рис. 4.3а т. 1, 2, 9, табл. 4.8). Можливо це пов'язано з тим, що ступень проходження реакції ваніліну з фенолами сильно варіюється в залежності від їх будови. Зрозуміло, що при спробі знайти відповідність між об'єднаними результатами аналізів, як чорних, так і зелених чаїв також був отриманий незадовільний ступінь кореляції ($R^2 = 0,024$). Треба прийняти до уваги, що ванілін не вступає в реакцію з флавонолами, фенольними кислотами та деякими іншими ФС. Цей фактор також додатково спотворює результати визначення сумарного вмісту ФС.

При використанні 18-МФК стає можливим одночасне спектрофотометричне визначення окремих груп поліфенолів при сумісній присутності. В літературному огляді показано важливість визначення окремих груп ФС у чаях. Основними групами ФС у чорних чаїв є флавоноли та таніни. Відомо, що для розділення танінів широко використовується їх здатність осаджуватися желатином або іонами металів (Cu^{2+} , Zn^{2+} і т.п.). Для визначення флавонолів у присутності танінів з 18-МФК попередньо осаджували таніни аміачно-амонійним комплексом цинку при рН 9,5. Визначали вміст флавонолів при рН 7,4 за градувальним графіком, побудованим для цього рН. Вміст танінів визначали за різницею двох дослідів (сумарного вмісту ФС та вмісту флавонолів).

Методика спектрофотометричного визначення флавонолів у чорних чаях з попереднім осадженням танінів. З метою отримання аміачного комплексу Цинку(II) до 4 мл 1 моль/л розчину цинк ацетату додавали аміачний буферний розчин (рН 9,5) до повного розчинення осаду $\text{Zn}(\text{OH})_2$, який утворюється (приблизно 46 мл). 5 мл цього розчину змішували з 5 мл водної витяжки чаю та витримували протягом 45 хв. Осад, що утворився, відокремлювали від розчину центрифугуванням при 4000 обертів/хв протягом 5 хв. До 2,5 мл освітленого

розчину чаю додавали 5 мл 0,1 моль-екв/л розчину Трилон Б, який використовувався нами для маскуванню надлишку іонів Цинку. Відбирали 1 мл отриманого розчину та проводили спектрофотометричне визначення поліфенолів з використанням 18-МФК та реактиву ФЧ (табл. 4.7).

Таблиця 4.7

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

	Назва чаю	Вміст танінів, 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

– немає даних

* метанольна витяжка з чаю

Методика з 18-МФК дає можливість більш правильно визначати вміст флавоноїдів, підтвердженням чого є близькість результатів отриманих з 18-МФК та з алюміній хлоридом. У той самий час вміст флавоноїдів, 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.).

Правильність методики визначення суми фенольних сполук у чаях з 18-МФК підтверджується тим, що результати визначення вмісту поліфенолів у чорних чаях у перерахунку на галотанін (рис. 4.4а) та у зелених чаях у перерахунку на ЕГКГ (рис. 4.4б), знайдені з використанням 18-МФК та реактиву ФЧ, добре корелюють між собою, коефіцієнт кореляції складає 0,991 та 0,985 для чорного та зеленого чаю відповідно. Для зелених чаїв абсолютні значення вмісту поліфенолів, знайдені обома методиками, є близькими, а для чорних чаїв вони закономірно відрізняються приблизно у півтори рази (табл. 4.8). Це свідчить про те, реакційна здатність 18-МФК та реактиву ФЧ по відношенню до ФС є приблизно однаковою. Отримані

результати також свідчать про те, що ступінь вилучення ФС при використанні у якості екстрагенту води або метанолу є повним. Тобто природа розчинника суттєво не впливає на результати визначення. У деяких випадках при проведенні метанольної витяжки з чаю ми спостерігали утворення нерозчинного осаду, тому перевагу ми віддаємо води для екстракції ФС з чаю.

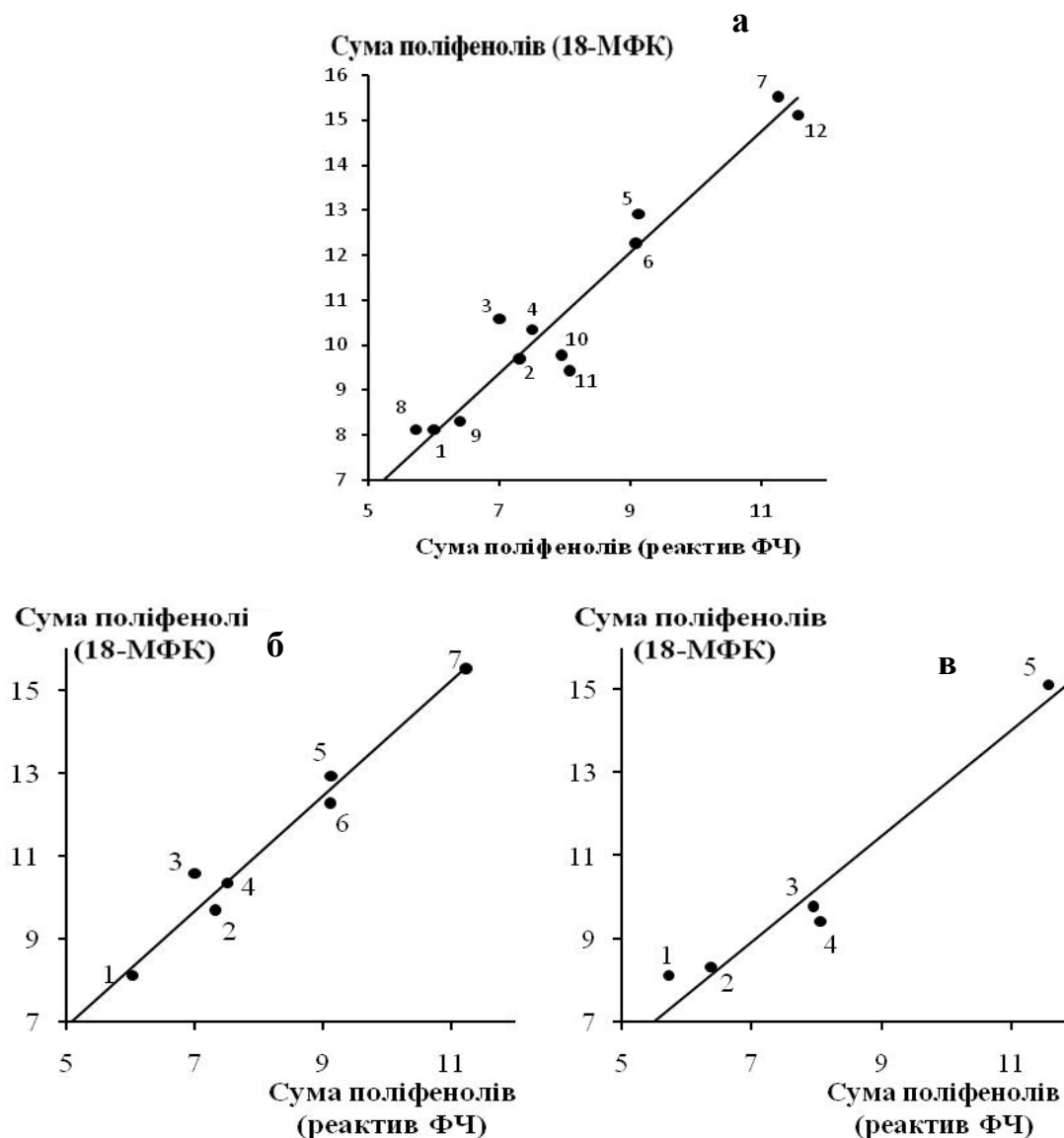


Рис. 4.4. Кореляційна залежність загального вмісту поліфенолів у чаях (а), чорних (а) та зелених (б) чаях, знайденого з використанням 18-МФК та реактиву Фоліна-Чокальтеу. Чорні чаї: «Huleys» (1), «Lipton Yellow Label» (2), «Тянь Шань» (3), «Qualitea» (4), «Ahmad «Английский завтрак» (5), «Bestsellers» Английский к завтраку» (6), «Greenfield Golden Ceylon» (7). Зелені чаї: «Qualitea» (1), «Huleys» (2), «Greenfield Flying Dragon» (3), «Curtis Bountea White Tea» (4), «Поднебесный чай» (5). У дужках наведено номер відповідної точки на графіку

Таблиця 4.8

Сумарний вміст поліфенолів у зелених та чорних чаях, знайдений з використанням 18-МФК, реактиву ФЧ, КМnO₄, ваніліну, мг поліфенолу / 100 г чаю, n = 5, P = 0,95

№	Назва чаю	Ферментативний вид чаю	Водна витяжка			Метанольна витяжка		
			Вміст поліфенолів у чаях, г поліфенола / 100г чаю			Вміст поліфенолів у чаях, г поліфенола / 100г чаю		
			18-МФК	реактив ФЧ	Левенталія	18-МФК	реактив ФЧ	ванілін
1	«Qualitea»	зелений	10,8	11,7	11,3	–	–	–
2	«Huleys»	зелений	12,2	11,7	15,1	–	–	–
3	«Curtis Bountea White Tea»	білий	15,2	14,9	18,1	–	–	–
4	«Greenfield Flying Dragon»	зелений	11,4	11,2	15,0	13,3	10,1	6,0
5	«Поднебесный чай»	зелений	11,7	10,9	15,1	14,4	14,7	3,6
6	«Ahmad» зелений чай листовий»	зелений	13,0	13,3	18,3	13,0	13,3	10,5
7	«Аскольд»	чорний	6,6	9,9	14,7	10,1	11,1	10,6
8	«Huleys»	чорний	6,4	8,1	12,2	6,3	6,5	6,0
9	«Lipton Yellow Label»	чорний	7,3	9,7	15,6	6,9	6,2	7,3
10	«Greenfield Golden Ceylon»	чорний	8,0	9,6	17,1	10,2	9,9	10,6
11	«Bestsellers» Английский к завтраку»	чорний	9,1	12,2	16,2	7,1	8,2	4,9
12	«Тянь Шань»	червоний	7,0	10,6	14,2	6,6	10,2	4,4
13	«Ahmad «Английский завтрак»	чорний	9,1	12,9	17,5	–	–	–
14	«Qualitea»	чорний	7,5	10,4	18,2	–	–	–

Примітка: вміст поліфенолів у зелених чаях розрахований на ЕГКГ, а у чорних – на галотанін

«–» немає даних

4.3. Кольорометричне та тест-визначення поліфенолів у рослинних об'єктах

Відомо, що гетерополісини здатні швидко і необоротно сорбуватися ППУ [275]. Стійкість забарвлення ГПС у фазі ППУ і висока константа розподілу є передумовою для створення простих і зручних візуально-тестових та кольорометричних методик визначення відновників різної природи. Існує два основних способи проведення сорбційно-спектроскопічних визначень. Вони полягають або в тому, що забарвлена речовина утворюється безпосередньо при взаємодії відновника з реагентом, попередньо закріпленим у фазі сорбенту, або спочатку аналіт переводять у забарвлену речовину і тільки після цього відбувається процес сорбції. Нами було перевірено обидві можливості і знайдено, що більш задовільним є другий спосіб.

Реакція взаємодії поліфенолів з 18-МФК, попередньо імпрегнованим на ППУ, є сильно уповільненою у часі і має погіршену відтворюваність. Було знайдено, що головним чином в реакцію з поліфенолами вступає тільки та частина 18-МФК, яка десорбується з ППУ. Ця частина є відносно невеликою, кількість її може змінюватися, що і пояснює погану відтворюваність одержаних результатів. Крім того для сорбції ГПС, яка утворюється за рахунок реакції з 25 мл $1,6 \cdot 10^{-5}$ моль/л розчину ГК, є необхідним внесення принаймні трьох кубиків ППУ імпрегнованого 18-МФК, що зрозуміло є дуже незручним для проведення рутинного аналізу.

Тому у цій роботі ми вперше запропонували інший порядок проведення визначення поліфенолів з використанням 18-МФК у якості аналітичного реагенту. Спочатку отримували ГПС у розчині при оптимальному значенні рН для даної групи поліфенолів або інших відновників, а потім проводили сорбцію одержаної ГПС на ППУ при кислотності, яка є оптимальною для її сорбції.

Сорбція ГПК структури Доусона вже вивчалась у роботі [275], але дані були отримані для ГПК, який утворювався у фазі сорбенту з розчину компонентів - фосфату, молібдату і кислоти. Достеменно невідомо, чи мав цей комплекс структуру Доусона. Нами було досліджено залежність сорбції на ППУ 18-МФС-2, що

утворилася при відновленні аскорбіновою кислотою 18-МФК, розчин якого було приготовлено з синтезованого препарату (рис. 4.5 а).

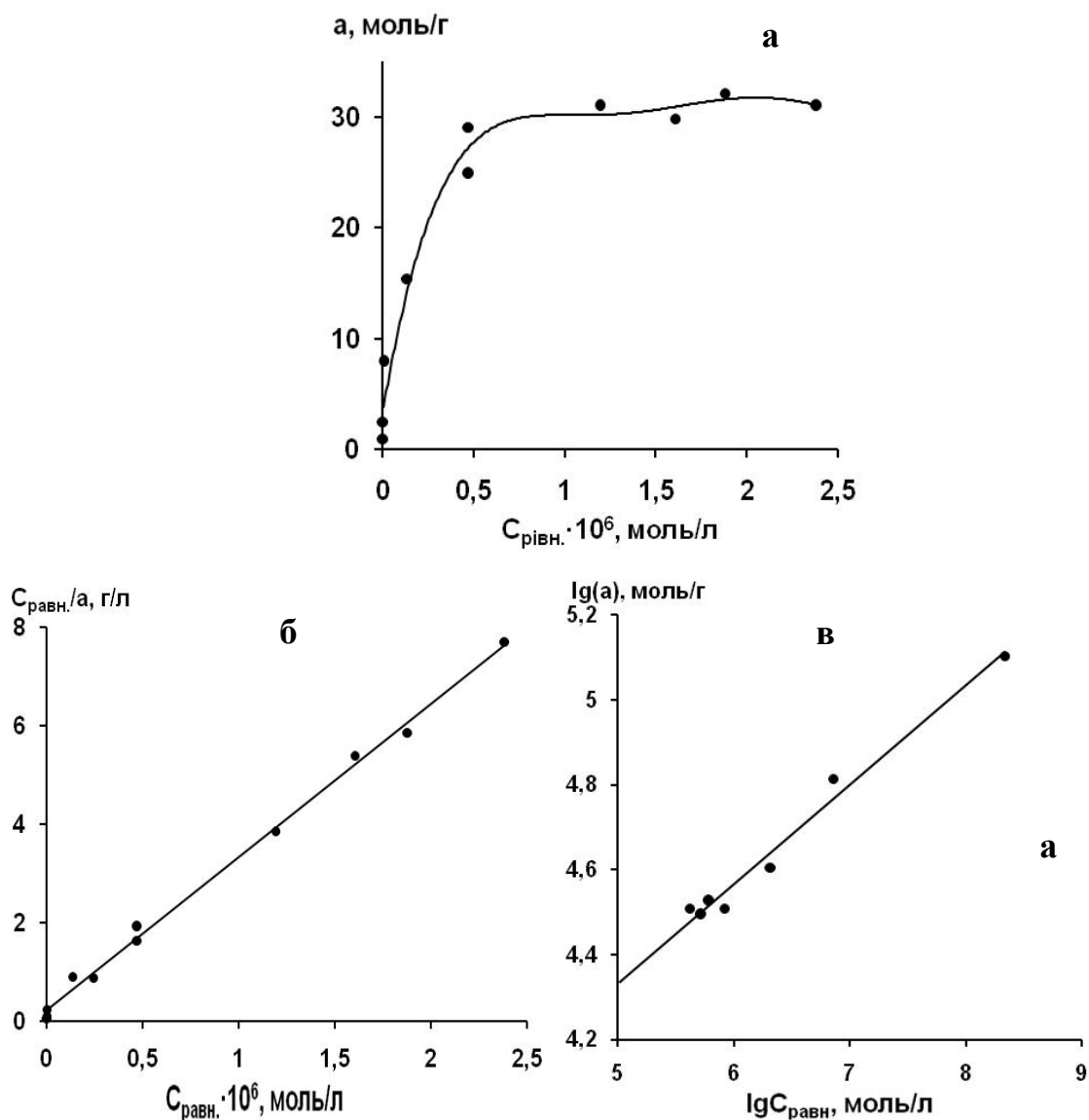


Рис. 4.5. Вихідна ізотерма сорбції 18-МФС-2 на ППУ (а) та залежність, лінеаризована в координатах ізотерми Ленгмюра (б) і Фрейндліха (в)

Залежність величини сорбції від рівноважної концентрації 18-МФС-2 у розчині задовільно лінеаризується у координатах ізотерми Ленгмюра (рис. 4.5 б) та Фрейндліха (рис. 4.5 в), що дозволяє розрахувати значення основних констант сорбції (таблиця 4.9). Більша величина коефіцієнту кореляції (R^2) для лінеаризованого рівняння ізотерми мономолекулярної сорбції підтверджує те, що сорбція 18-МФС-2 на ППУ краще описується рівнянням Ленгмюра. Максимальна ємність ППУ за ГПС склала 34 мкмоль/г, що є у добрій відповідності з аналогічною

величиною 65 мкмоль/г, отриманою у роботі [275]. Розрахована константа сорбції виявилась меншою ($K_L = 5,93 \cdot 10^4$), ніж для жовтого ГПК структури Доусона сорбованого в інших умовах ($K_L = 7,7 \cdot 10^5$).

Таблиця 4.9

Значення сорбційних констант, розрахованих з використанням рівнянь Ленгмюра і Фрейндліха

Лінійна форма рівняння	Сорбційні параметри		Коефіцієнт кореляції, R^2
Ленгмюра $1/a = 2,95 + 0,45/(C_{\text{рівн.}} \cdot 10^8)$	$1/a_{\infty} = 4,83$ $a_{\infty} = 33,96$ мкмоль/г	$K_L = 1/(\text{tga} \cdot a_{\infty})$ $K_L = 5,93 \cdot 10^4$	0,995
Фрейндліха $\lg A = 0,233 \cdot \lg C_{\text{рівн.}} + 0,164$	$n = 1/\text{tga}$ $n = 4,35$	$\lg K_F = 0,164$ $K_F = 1,46$	0,980

a – кількість адсорбованої 18-МФС-2 на ППУ, мкмоль/г; a_{∞} – гранична адсорбційна ємність, мкмоль/г; $C_{\text{рівн.}}$ – рівноважна концентрація 18-МФС-2, мкмоль/л; K_L – константа сорбційної рівноваги процесу сорбції, л/моль; n – константа ізотерми Фрейндліха, що показує ефективність сорбції; K_F – константа ізотерми Фрейндліха, яка характеризує сорбційну ємність (л) $^{1/n} \cdot (\text{ммоль})^{1-1/n}/\text{г}$.

Експериментально було встановлено, що високий ступінь сорбції відновленої форми 18-МФК відбувається тільки в кислому середовищі (рис. 4.6), оптимальним є значення рН 1,5-2,3 для ППУ на основі етерів та рН 2,3-2,8 для ППУ на основі суміші етерів та естерів. Час сорбції залежить від концентрації 18-МФС-2. Так, для розчинів 18-МФС з концентрацією 10^{-4} моль/л час сорбції становить приблизно 20 хв (рис. 4.7), а для менш концентрованих розчинів цей час можна скоротити до 15 хв.

Для сорбції ГПК на ППУ запропоновано декілька механізмів серед, яких найбільш обґрунтованим виглядає гіпотеза, запропонована Ханом і Чоу [276-277]. Ці вчені для сорбції на ППУ ряду аніонних комплексних сполук запропонували катіон-хелатний механізм. Згідно з ним поліетерні ланцюги здатні координувати катіони лужних металів за механізмом, який є схожим на зв'язування краун-етерами. Таким чином фаза ППУ перетворюється на катіонний полімер, який може утворювати іоно-асоціативний зв'язок з великими за розміром та достатньою гідрофобністю аніонами. Хоча для екстракції гетерополіаніонів загальноприйнятим

є гідратно-сольватний механізм, Хан і Чоу відмовилися від нього на тій підставі, що вони спостерігали те, що 12-молібдофосфат структури Кеггіна сорбувався у широкому інтервалі кислотності. В той же час за гідратно-сольватним механізмом витягнення ГПА може відбуватися тільки у сильнокислому середовищі. Як видно з отриманих нами результатів, для сорбції ГПС, які отримують з 18-МФК, є необхідним створити достатньо високу концентрацію іонів водню. 18-МФК є стійким у широкому інтервалі рН і не руйнується при рН > 2-3. Тому участь іонів водню є ключовою умовою. Втім падіння ступеню сорбції при рН > 3 можна пояснити і іншим чином. Відомо, що при рН < 4 18-МФК починає протонуватися і спочатку приєднується один протон. При рН < 3 приєднується другий протон і заряд 18-МФК зменшується з -6 до -4, що може бути достатнім, щоб збільшити виграш енергії при переході 18-МФК чи 18-МФС з розчину у фазу ППУ.

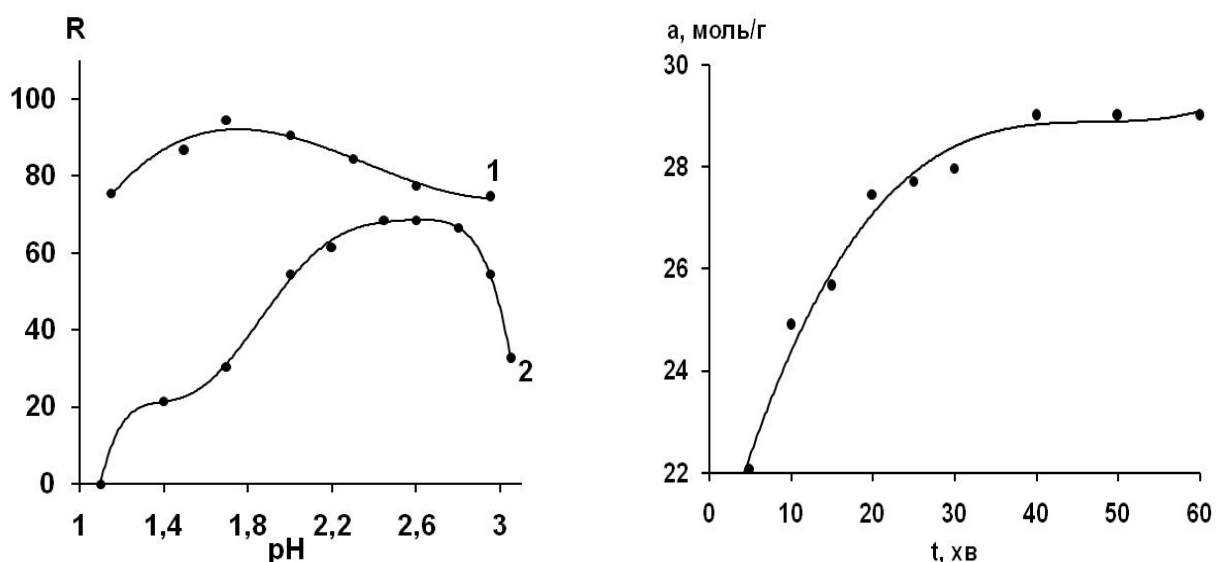


Рис. 4.6. Залежність кольорометричної координати R від рН. (1) – ППУ на основі етерів, (2) – ППУ на основі суміші етерів та естерів. $C_{18\text{-МФС-2}} = 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв

Рис. 4.7. Залежність кількості сорбованої 18-МФС-2 на ППУ від часу сорбції $C_{18\text{-МФС-2}} = 10^{-4}$ моль/л, рН = 2

Розроблено візуально-тестову та кольорометричну методики визначення суми ФС у рослинних об'єктах. Визначення суми поліфенолів відбувається у дві стадії.

На першій стадії отримують ГПС при рН 7,4 (фосфатний буфер) або 9,5 (боратний буфер), а на другій – суміш підкислюють до рН $2,0 \pm 0,2$ і сорбують ГПС на ППУ.

Методика побудови градуовальної залежності для кольорометричного визначення поліфенолів. У колбу на 25 мл вносять приблизно 15 мл дистильованої води, 1 мл боратного буферного розчину, певний об'єм ГК (0,1, 0,2 ... 1,5 мл $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) та 0,5 мл 18-МФК з концентрацією $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л (кінцева концентрація 18-МФК 10^{-4} моль/л) рН $\approx 9,15$, через 15 хв до розчину ГПС додавали 0,5 мл 1 моль/л HCl (рН ≈ 2) і дистильованою водою доводять об'єм розчину до позначки. Розчин ГПС переносять у конічну колбу об'ємом 50 мл переливають, занурюють очищений і висушений кубик ППУ масою (100 ± 2) мг, притискають скляною паличкою до стінок колби з метою видалення бульбашок повітря із ППУ і струшують протягом 15 хв. Повноту сорбції контролюють шляхом вимірювання залишкової оптичної густини вихідного розчину, величина якої не повинна перевищувати значення 0,03. Після сорбції кубик ППУ віджимають, промивають дистильованою водою і висушують на повітрі.

Вміст поліфенолів розраховують за тест-шкалою або градуовальним графіком залежності модифікованої функції Кубелки-Мунка $(255-R)^2/2R$ [273] від концентрації стандартної речовини (галова кислота, ГК) (рис. 4.9). В табл. 4.10 наведені основні параметри запропонованих методик, які були розраховані за рівнянням градуовального графіку при визначенні ГК: $(255-R)^2/2R = (56 \pm 2) + (30 \pm 4) \cdot C_{ГК} \cdot 10^5$ або $R = (415,45 \pm 28,85) + (65,58 \pm 5,65) \cdot \lg C_{ГК} \cdot 10^5$.

Таблиця 4.10

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	
	Кубелки-Мунка	R-lgC	Кубелки-Мунка	R-lgC	Кубелки-Мунка	R-lgC
АК	0,2–17,6	0,4–17,6	0,48	0,61	0,995	0,993
ГК	0,1–2,0	0,3–5,1	0,17	0,75	0,988	0,983

Раніше було запропоновано декілька методів одночасного визначення аскорбінової кислоти і поліфенольних сполук, один з яких описаний у даній роботі.

Загальним їх недоліком є те, що у тому випадку коли аскорбінова кислота міститься у великому, тобто більш ніж 10-разовому надлишку до поліфенолу, визначення становиться неможливим. Тому ми запропонували знешкоджувати вплив АК, після її вибіркової взаємодії з 18-МФК при рН 3,0, шляхом сорбції на ППУ. Застосування такого прийому дозволяє визначати поліфеноли у присутності будь-якого надлишку аскорбінової кислоти.

На першій стадії визначають вміст АК. В аналізованому розчині створюють рН 3.0, при якому гарантується відсутність впливу поліфенолів. Вся ГПС, яка утворюється при реакції АК з 18-МФК, сорбується на ППУ. В аналізований розчин вносять стільки кубиків ППУ, скільки їх необхідно для повної сорбції ГПС. Вміст АК розраховують за тест-шкалою (рис. 4.10) або градуювальним графіком залежності модифікованої функції Кубелки-Мунка від концентрації АК $255-R)^2/2R = (46 \pm 8) + (27 \pm 2) \cdot C_{AK} \cdot 10^5$. У якості альтернативи можна визначати вміст АК за залежністю координати кольору R від логарифму концентрації АК за рівнянням $R = (373,04 \pm 19,96) + (57,71 \pm \pm 4,30) \cdot \lg C_{AK} \cdot 10^5$ (рис. 4.9) або, що ще простіше, за світлопоглинанням ГПС у розчині.

На другій стадії до аналізованого розчину додають нову порцію 18-МФК для компенсації її втрат на реакцію з АК та сорбцію на ППУ. рН доводять до 9,3-9.5 додаванням боратного буферного розчину з рН 9,5. Вміст ФС визначають за градуювальним графіком для спектрофотометричного визначення ГК.

Методика побудови градуювального графіку для кольориметричного визначення АК. У колбу на 25 мл додають приблизно 15 мл дистильованої води, аліквоту АК (0,1, 0,2 ... 1 мл 10^{-3} моль/л і 0,15, 0,2, 0,25 мл $0,01$ моль/л АК) і 0,5 мл $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л 18-МФК (кінцева концентрація 18-МФК 10^{-4} моль / л, рН ≈ 4). Через 15 хв до розчину ГПС додають 0,2 мл 1 моль/л HCl (рН ≈ 2) і дистильованою водою доводять до позначки. Далі визначення АК проводять аналогічно ГК.

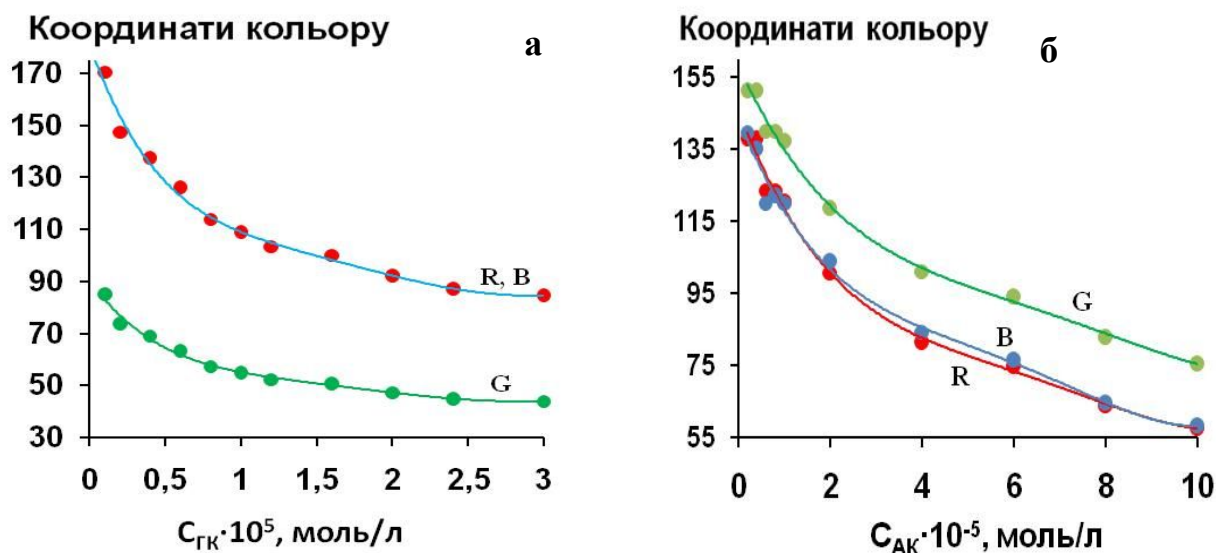


Рис. 4.8. Залежність координат (R, G, B) від концентрації ГК (а) та АК (б)

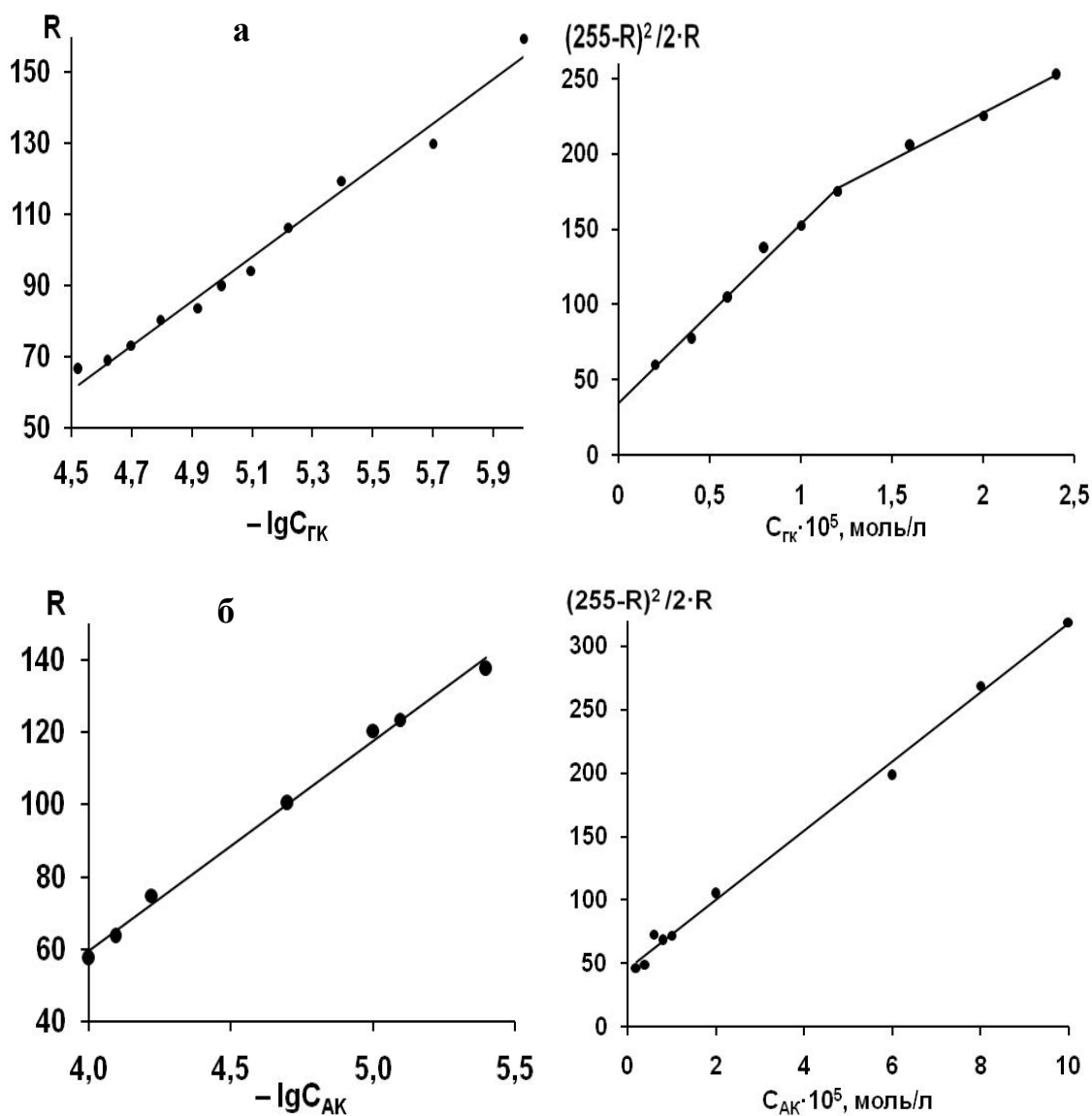


Рис. 4.9. Залежність кольорометричної координати R від концентрації ГК (а) та АК (б). $C_{18-МФС-2} = 10^{-4}$ моль/л, $t = 15$ хв, $pH = 2$

Колір зразків ППУ на тест-шкалі (рис. 4.10), змінюється від світло-сірого до темно-синього.

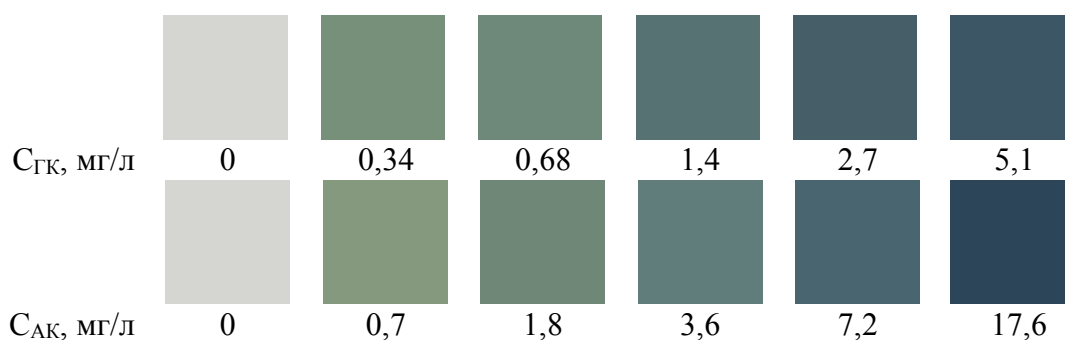


Рис. 4.10. Тест-шкали для визначення ГК та АК. $C_{18-МФК} = 10^{-4}$ моль/л, час утворення і сорбції ГПС по 15 хв

Сорбційно-спектроскопічні методики для визначення суми поліфенолів з 18-МФК були апробовані для аналізу соку цитрусових фруктів (лимону, апельсину). Для перевірки правильності запропонованих методик отримані дані порівнювали з результатами, отриманими стандартними методиками для визначення АК та суми поліфенолів (табл. 4.11, 4.12). Дані усіх трьох методик при визначенні вмісту фенольних сполук у соках лимону та апельсину знаходяться у задовільній відповідності. Методика с 18-МФК характеризується при цьому кращою відтворюваністю.

Таблиця 4.11

Сумарний вміст фенолів в свіжовиготовлених соках лимону та апельсину у перерахунку на ГК, знайдений з використанням з 18-МФК, реактиву Фоліна-Чокальтеу та біс-неокупроїнату Купруму (II), мг/100 мл, n = 6, P=0,95.

Рослинний об'єкт	Сума фенольних сполук, мг ГК/100 мл соку		
	CUPRAC метод	Реактив ФЧ	18-МФК (СФ)
Апельсин	9,0 ± 1,5 (0,17)	8,6 ± 1,2 (0,12)	8,3 ± 0,7 (0,06)
Лимон	14,5 ± 3,1 (0,21)	16,8 ± 5,2 (0,28)	12,9 ± 0,2 (0,05)

Правильність визначення вмісту АК з 18-МФК було підтверджено порівнянням з результатами, отриманими стандартним титриметричним методом з використанням у якості титранту 2,6-феноліндофенолу. Вміст поліфенолів, розрахований після проведення сорбційного відділення ГПС, яка утворилася в реакції з АК, повністю відповідає вмісту поліфенолів, розрахованому безпосередньо у вихідному аналізованому розчині з хлоридом алюмінію. Вміст поліфенолів,

розрахований за реакцією з реактивом Фоліна-Чокальтеу більше приблизно на 30-50 %. Завищене значення результату аналізу можна пояснити тим, що цитрусові містять деякі речовини, які не відносяться до антиоксидантів, але реагують з цим реагентом, таких як вітаміни групи В або каротин.

Таблиця 4.12

**Вміст аскорбінової кислоти та фенолів у перерахунку на рутину
свіжовиготовлених соках лимону та апельсину, знайдений з використанням
запропонованої та стандартних методик, мг/100 мл, n = 6, P=0,95.**

Рослинний об'єкт	Вміст аскорбінової кислоти, мг АК/100 мл соку (S_r)			Вміст поліфенолів, мг рутину/100 мл соку(S_r)		
	2,6-фенол- індофе- нолом	18-МФК (СФ)	18-МФК (тест- метод)	AlCl ₃	18-МФК (СФ)	18-МФК (тест-метод)
Апельсин	7,9 ± 0,1 (0,10)	5,2 ± 0,5 (0,06)	6,0	6,5 ± 1,0 (0,13)	8,5 ± 1,5 (0,13)	6,7
Лимон	29,5 ± 0,4 (0,10)	21,5 ± 4,2 (0,14)	21,9	8,5 ± 1,2 (0,12)	12,0 ± 2,6 (0,16)	8,2

Реакцію з 18-МФК було застосовано для оцінки вмісту суми поліфенольних сполук у коньячних виробках, що може бути застосованим при оцінці їх фальсифікації. У більшості випадків вміст поліфенолів, визначений обома методиками є дуже близьким (довірчі інтервали методик перекриваються). Втім, для зразків коньяків Коктебель, Тиса, Потёмкин вміст ФС, розрахований за методикою з реактивом ФЧ був суттєво вищим. Це також може бути свідченням наявності в аналізованих зразках речовин нефенольного походження (наприклад, відновлюючи сахарів), які здатні реагувати тільки з реактивом ФЧ. Вміст поліфенолів, розрахований обома методиками загалом не протирічить даним, які містяться у літературі. Як зазначалося, за вмістом поліфенолів важко визначити кількість років витримки, або якість коньяку, хоча зі збільшенням років витримки вміст поліфенолів закономірно зростає [278-279]. До фальсифікованих можна віднести коньяк марки «Коктебель». Зрозуміло, що цей висновок потребує додаткової перевірки із застосуванням інших показників якості.

Сумарний вміст фенолів в коньяках у перерахунку на ГК, знайдений з використанням 18-МФК, реактиву Фоліна-Чокальтеу, мг/л $\pm \Delta$, n = 4, P=0,95.

Коньяк	Вміст поліфенолів, мг ГК / л коньяка (Sr), знайдений		
	СФ методикою з використанням		Кольорометричною методикою з 18-МФК
	Реактиву ФЧ	18-МФК	
Коктебель (5 років витримки)	37,1 \pm 1,0 (0,019)	12,5 \pm 0,1 (0,011)	10 \pm 4 (0,35)
Тиса (5 років витримки)	77,5 \pm 2,1 (0,019)	59,9 \pm 2,0 (0,023)	49 \pm 9 (0,14)
Шабо (5 років витримки)	113,0 \pm 3,0 (0,018)	113,3 \pm 1,9 (0,013)	113 \pm 45 (0,31)
Потёмкин (3 років витримки)	116,9 \pm 1,4 (0,011)	86 \pm 3 (0,045)	84 \pm 22 (0,20)
Болград (3 роки витримки)	126,7 \pm 2,7 (0,016)	111,2 \pm 1,4 (0,012)	96 \pm 15 (0,12)
Ай-Петри (5 років витримки)	115 \pm 8 (0,05)	129 \pm 6 (0,05)	112 \pm 42 (0,27)

Запропоновані нами сорбційно-спектроскопічні методики з 18-МФК є досить простими у виконанні, характеризуються високою чутливістю, експресністю, селективністю, не потребує особливих навиків та умінь. Тому вони можуть стати затребуваними для проведення повсякденного рутинного аналізу для кількісної оцінки суми ФС, визначення окремих представників поліфенолів, а також одночасного визначення ФС та АК при спільній присутності. Нами вперше у якості речовини, що сорбують, використано відновлену форму гетерополікомплексів структури Доусона. Це дозволило збільшити чутливість та селективність методики, покращити відтворюваність одержаних результатів, а також уникнути десорбції речовини з сорбенту. У порівнянні з існуючими запропоновані сорбційно-спектроскопічні методики з 18-МФК характеризується високою адсорбційною ємністю, та мають найнижчу межу визначення серед інших відомих сорбційно-спектроскопічних методик (табл. 4.14).

Таблиця 4.14

Порівняння сорбційно-спектроскопічних методик визначення фенольних сполук

Аналітичний реагент	Сорбент	Вивчаємий об'єкт	Сорбована речовина умови сорбції	Сорбційна обмінна ємність мкмоль/г	Умови проведення реакції	Діапазон лінійності мг/л	Межа визначення мг/л	R ²	Посилання
реагент Фоліна	силікагель, модифікований тетрадециламоній нітратом	Кв	ГПК- ох 0,5 моль/л	25	0,35 М Na ₂ CO ₃ t = 8 хв	3–30	1	0,999	[253]
		Танін	H ₂ SO ₄ 3 – 5 хв		0,35 М Na ₂ CO ₃ t = 2 хв	25–230	14	0,992	
18-молібдодифосфорний ГПК	фільтрувальний папір (синя стрічка) оброблений четвертинною амонієвою сіллю	АК	ГПК- ох τ = 60 хв	–	pH = 4,0 t = 7 хв	20–400	–	–	[280]
12-молібдофосфат 12-молібдотибієвофосфат 12-молібдосиліцієвий ГПК	силікагель, модифікований тетрадециламоній нітратом силікагель, модифікований люцегеніном	АК	ГПК- ох τ = 15 хв	–	pH 0,2 – 0,4 t = 7 хв	1–30	1	0,997	[251-252]
				–	pH 2,5 – 4,0 t = 10 хв	15–500	1,5	0,998	
				–					
солі Ітрію(III)	фосфат алюмінію	Кв в орг. розчиннику	комплекси метал + поліфенол	8,1	pH = 4,5 t = 60 ⁰ C	1,5–4,5	0,05	–	[254-257]
	силікагель			6,0	t = 30 хв				
	сефрадекс			9,7	pH = 6,4 t = 100 ⁰ C t = 30 хв				
солі Скандію(III)	сефрадекс	морин в орг. розчиннику		9,7	pH = 4,1, t = 60 ⁰ C t = 30 хв	1,5–6,0	–	–	
CuТААВ	силікагель	АК	CuТААВ	–	pH 8 – 11, t = 5 хв	1–40	0,06	0,998	
солі Феруму(III)	силікагель, модифікований фенантроліном (Phen-СГ)	АК	pH 2,6 – 2,8 τ = 1 хв	–	pH 3,5 – 5,2, t = 15 хв	1–12	0,9	0,993	[250]
18-молібдодифосфорний ГПК	ППУ	ГК	ГПК-red τ = 15 хв	34	pH = 9,5 t = 10 хв	0,2–18	0,48	0,995	[Дана робота]
		АК	pH 1,9-2,2		pH = 4,5 t = 10 хв	0,1–2,0	0,17	0,988	

ВИСНОВКИ ДО РОЗДІЛУ 4

1. Показано, що 18-МФК поряд з реактивом ФЧ може бути застосований для визначення суми фенольних сполук, що підтверджується високим ступенем кореляції $R^2 > 0,95$ між результатами визначення, отриманими обома методиками при аналізі досить великої кількості рослинних зразків різного складу. Для значної частини проаналізованих рослинних об'єктів сумарний вміст поліфенолів, знайдений з використанням 18-МФК, потрапляє в інтервали концентрацій, які є типовими для даного рослинного об'єкта, або є досить близьким до них. Оцінка інтегральних показників (сума фенольних сполук, антиоксидантна активність, харчова цінність) з використанням 18-МФК є більш об'єктивною у порівнянні з реактивом ФЧ через те, що реакція з 18-МФК набагато менше враховує, або зовсім відсутній впливу ряду відновників нефенольного характеру, наприклад, відновлюючих сахарів, вітамінів групи В, каротинів, амінокислот або амінів, простих фенолів.

2. При використанні 18-МФК стає можливим роздільне визначення поліфенолів та більш активних відновників шляхом варіювання рН або з попереднім відокремленням ГПС на ППУ, що показано на прикладі одночасного визначення ФС (рутин, галова кислота) та аскорбінової кислоти.

3. Розроблені спектрофотометричні, візуально-тестові та кольориметричні методики для визначення індивідуальних представників, окремих груп поліфенолів та суми ФС, а також фенолів і аскорбінової кислоти при спільній присутності у лікарських препаратах на основі рослинної сировини (таблетках, настоях, сиропах), лікарських рослинах, фруктах, зеленому і чорному чаях (водна та водно-спиртова витяжки), у свіжовиготовлених соках овочів і фруктів, кверцетину в таблетках, рутину і аскорбінової кислоти при спільній присутності в «Аскорутині», флавонолів в лікарських травах, флавонолів і танінів у чорних чаях, катехінів в зеленому чаї, танінів у кон'ячних виробах, фенольних кислот в каві, лопусі, корі дуба та інших об'єктах аналізу.

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, катехинів, 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 визначення 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.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилов, Е.Н. Музафаров. – Пушино: Synchronobook, 2013. –311 с.
2. Химический анализ лекарственных растений / под ред. Н.И. Гринкевич, Л. Н. Сафронич. – М.: Высш. школа, 1983. – 176 с.
3. Растительные флавоноиды как функциональные добавки в косметических и пищевых продуктах / М.В. Кривченкова, Е.В. Клышинская, М.А. Ильиных [и др.] // Вестник Российской академии естественных наук. – 2012. –№ 3. – С. 47–51.
4. Георгиевский, В.П. Биологически-активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комисаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.
5. Невская, Е.М. Оксифлавоны как аналитические реагенты / Е.М. Невская, В.А. Назаренко // Журн. аналит. химии. – 1972. – Т. 27, № 9. – С. 1699–1714.
6. Смірнов О.Є. Флавоноїди рутин і кверцетин. Біосинтез, будова, функції / О.Є. Смірнов, О.І. Косик // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. – 2011. – № 56, С. 3–11.
7. Функции и свойства антоцианов растительного сырья / А.М. Макаревич, А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович [и др.] // Труды БГУ. – 2010. – Т. 4, № 2. – С. 1–11.
8. Биохимия растений: тексты лекций по разделу «Растительные вещества вторичного происхождения» для студентов биологического факультета / Л.А. Беляева; М-во образования РБ, Гомельский гос. Ун-т им. Ф. Скорины. – Гомель: ГГУ им. Ф. Скорины, 2009. – 108 с.
9. Томсон, Р.Х. Структура и реакционная способность фенольных соединений / Р.Х. Томсон // Биохимия фенольных соединений / С.А. Браун [и др.]. Под ред. Дж. Харборна. – Москва, 1968. – Гл. 1. – С. 9–33.
10. Селиверстова, И.В. Ионoэкслюзионное определение оксикоричных и оксibenзойных кислот в виноградных винах / И.В. Селиверстова, А.А. Иванов, В.В. Северов // Вестн. Моск. ун-та. Серия химия. – 2004. – Т. 45, № 1. – С. 47–50.

11. Mattila, P. Phenolic acids in potatoes, vegetables, and some of their products / P. Mattila, J. Hellstrom // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2007. – № 20. – P. 152–160.
12. Ignat, I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables / I. Ignat, I. Wolf, V.I. Popa // *J. Food Chemistry*. – 2011. – V. 126. – P. 1821–1835.
13. Sekaran, C.B. Spectrophotometric determination of phenolic antioxidants / C.B. Sekaran, S. Vijayasaradhi, B. Praveen Kumar, Ch. Srilakshmi // *Asian Journal of Chemistry*. – 2009. – Vol. 21, №. 9. – P. 6647–6650.
14. Stalikas, C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids / C.D. Stalikas // *J. Sep. Sci.* – 2007. – V. 30, №. 18. – P. 3268–3295.
15. Validation of novel spectrophotometric methods for estimation of propyl gallic acid / M. Ratna Mounica, T. Anusri, T. Ravali [et al.] // *J. Chem.* – 2010. – Vol. 3, № 4. – P. 751–754.
16. Tomas-Barberan, F.A. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives – nature, occurrence and dietary burden / F.A. Tomas-Barberan, M.N. Clifford // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – V. 80. – P. 1024–1032.
17. Левицкий, А.П. Хлорогеновая кислота. Биохимия. Физиология / А.П. Левицкий, Е.К. Вертикова, И.А. Селиванская // *Мікробіологія і біотехнологія*. – 2010. – № 2. – С. 6–20.
18. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism / Michael N. Clifford // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – V. 80. – P. 1033–1043.
19. Canelas, V. Quantitative HPLC analysis of rosmarinic acid in extracts of melissa officinalis and spectrophotometric measurement of their antioxidant activities / V. Canelas, C.T. Da Costa // *Journal of chemical education* [Электронный ресурс]. – 2007. – V. 84, № 9. – P. 1502–1504. <http://www.jce.divched.org>.
20. Альхуссейн, М. А. Синтез и антирезистентная активность ацилированных и супрамолекулярных производных эллаговой кислоты / М.А. Альхуссейн,

А.В. Мартынов // Журнал органічної та фармацевтичної хімії. 2014. – 24. – Т. 12, № 4 (48). – С. 77–82.

21. Tomas-Barberan, F.A. Flavanones, chalcones and dihydrochalcones – nature, occurrence and dietary burden / F.A. Tomas-Barberan, Michael N. Clifford // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – V. 80. – P. 1073–1080.

22. Hollman, P.C.H. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden / P.C.H. Hollman, C.W. Ilja // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – V. 80, № 7. – P. 1081–1093.

23. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музыкакина [и др.] – Новосибирск: Академическое издательство «ГЕО», 2007. – 232 с.

24. Фитохимический анализ растительного сырья, содержащего флавоноиды / Г.М. Федосеева, В.М. Мирович, Е.Г. Горячкина [и др.] – Иркутск: ИГМУ, 2009. – 67 с.

25. Grotewold, E. The science of flavonoids / E. Grotewold // Department of cellular and molecular biology the Ohio State University Columbus, Ohio USA. – 2006. – 273 p.

26. Malesev, D. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions / D. Malesev, V. Kuntin // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2007. – V. 72, № 10. – P. 921–939.

27. Composition of hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits and leaves and emblic leafflower (*Phyllanthus emblica*) fruits. Turku, University of Turku. Department of Biochemistry and Food Chemistry and Functional Foods Forum. 2012. – 96 с.

28. Sakakibara, H. Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits and tea / H. Sakakibara, Y. Honda, S. Nakagawa [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* – 2003. – V. 51, № 3. P. 571–581.

29. Егоров, М.В. Качественный и количественный анализ сырья и препаратов солодки / М.В. Егоров, В.А. Куркин, Г.Г. Запесочная [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2005. – № 1. – С. 175–180.

30. Мельникова, Н.Б. Взаимодействие дигидрокверцетина с ионами металлов в водных растворах их солей изотонических медицинских средах /

Н.Б. Мельникова, И.Д. Иоффе // Химия растительного сырья. – 2001. – № 4. – С. 25–33.

31. Cassidy, A. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health / A. Cassidy, B. Hanley, R.M. Lamuela-Raventos // *J. Sci. Food Agric.* – 2000. – V. 80. – P. 1044–1062.

32. Zaveri, N.T. Green tea and its polyphenolic catechins: Medicinal uses in cancer and noncancer applications / N.T. Zaveri // *Life Sciences.* – 2006. – V. 78. – P. 2073–2080.

33. Anesini, C. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia Sinensis*) in Argentina / C. Anesini, G.E. Ferraro, R. Filip // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – V. 56. – P. 9225–9229.

34. Determination of catechin and epicatechin content in chocolates by high-performance liquid chromatography / R.V.S.S. Gottumukkala, N. Nadimpalli, K. Sukala [et al.] // *Hindawi Publishing Corporation International Scholarly Research Notices [Электронный ресурс]*. – 2014. V. 2014. – Article ID 628196. – 2014. – P. 1–5. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/628196>.

35. Lako, J. Routine analytical methods for use in south pacific regional laboratories for determining naturally occurring antioxidants in food. / J. Lako, V.C. Trenerry, S. Rochfort // *International Food Research Journal.* – 2008. – V. 15 (3). – P. 313–323.

36. Рудаков, О.Б. Фракционный состав антоциановых красителей из растительных экстрактов и контроль над ним методом ВЭЖХ / О.Б. Рудаков, А.Д. Хайрутдинова, А.П. Один [и др.] // *Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация.* – 2004. – №1. – С. 85–93.

37. Oancea, S. Anthocyanins, from biosynthesis in plants to human health benefits / S. Oancea, L. Oprean // *Acta universitatis cibiniensis series E: Food technology.* – 2011. – V. XV, №.1. – P. 3–16.

38. Clifford M.N. Anthocyanins – nature, occurrence and dietary burden / M.N. Clifford // *J. Sci Food Agric.* – 2000. – V. 80. – P. 1063–1072.

39. Khanbabaee K. Tannins: classification and definition / K. Khanbabaee, T.V. Ree // *Nat. Prod. Rep.* – 2001. – V. 18. – P. 641–649.

40. Яшин, Я.И. Чай. Химический состав чая и его влияние на здоровье человека / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин. – М.: Транслит, 2010. – 160 с.
41. Price, K.R. Composition and content of flavonol glycosides in green beans and their fate during Processing / K.R. Price, M.J.C. Rhodes, K.A. Barnes // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – V. 46. – P. 2517–2522.
42. Hertog, M.G.L. Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of tea infusions, wine, and fruit juices / M.G.L. Hertog., P.C.H. Hollman, B. Putte // *Ibid.* – 1993. – V. 41. – P. 1242–1246.
43. Барабой, В.А. Катехины чайного растения: структура, активность, применение / В.А. Барабой // *Біотехнологія.* – 2008. – Т. 1, №3. – С. 25–36.
44. Webb, T. Green tea experiments in lab, clinic yield mixed results / T. Webb // *J. Nat. Cancer Inst.* – 2000. – V. 92. – P. 1038–1059.
45. Radical chemistry of flavonoid antioxidants / W. Bors, W. Hellers, C. Michel [et al.] // *Antioxidants in therapy and preventive medicine* / Ed. B. Emerit. – N.Y.: Plenum Press, 1990. – V.1. – P. 165–170.
46. Bombardelli, E. The flavonoids: new perspectives in biological activities and therapeutics / E. Bombardelli., P. Morazzoni. // *Chim. Oggi.* – 1993. – V. 11. – P. 25–28.
47. The thioflavin T fluorescence assay for amyloid fibril detection can be biased by the presence of exogenous compounds / S.A. Hudson, H. Ercroyd, T.W. Kee [et al.] // *FEBS Journal.* – 2009. – V. 276. – P. 5960–5972.
48. Harbowy, M.E. Tea chemistry. Critical reviews in plant sciences / M.E. Harbowy, D.A. Balentine. – 1997. – V. 16 (5). – P. 415–480.
49. Electrochemical oxidation of quercetin in hydro-alcoholic solution / A.K. Timbola, C.D. de Souza, C. Giacomelli [et al.] // *J. Braz. Chem. Soc.* – 2006. – V. 17 (1). – P. 139–148.
50. Brett A.M.O. Electrochemical oxidation of quercetin / A.M.O. Brett, M.-E. Ghica // *Electroanalysis.* – 2003. – V. 15, № 22. – P. 1745–1750.
51. On the stability of the bioactive flavonoids quercetin and luteolin under oxygen-free conditions / S. Ramešová, R. Sokolová, I. Degano [et al.] // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2012. – V. 402. – P. 975–982.

- 52.** Червяковский, Е.М. Роль флавоноидов в биологических реакциях с переносом электронов / Е.М. Червяковский, В.П. Курченко, В.А. Костюк // Труды БГУ. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. – 2009. – Т 4. – Ч. 1. – С. 9–26.
- 53.** Antioxidant activity of natural flavonoids is governed by number and location of their aromatic hydroxyl groups / Z.Y. Chen, P.T. Chan, K.Y. Ho [et al.] // Chem. Phys. Lipids. – 1996. – V. 79, № 2. – P. 157–163.
- 54.** Oliveira-Brett, A.M. Electrochemical oxidation of quercetin / A.M. Oliveira-Brett, M.E. Ghica // Electroanalysis. – 2003. – V. 15, № 22. – P. 1745–1750.
- 55.** Janeiro, P. Solid state electrochemical oxidation mechanisms of morin in aqueous media / P. Janeiro, A.M. Oliveira-Brett // Electroanalysis. – 2005. – V. 17, № 9. – P. 733–738.
- 56.** Kostyuk. V.A. Superoxide-driven oxidation of quercetin and a simple sensitive assay for determination of superoxide dismutase / V.A. Kostyuk, A.I. Potapovich // Biochem. Int. – 1989. – V. 19, № 5. – P. 1117–1124.
- 57.** Heijnen, C.G. Flavonoids as peroxynitrite scavengers: the role of the hydroxyl groups / C.G. Heijnen // Toxicol. In Vitro. – 2001. – V. 15, № 1. – P. 3–6.
- 58.** Discriminative protection against hydroxyl and superoxide anion radicals by quercetin in human leucocytes in vitro / L.C. Wilms, J.C. Kleinjans, E.J. Moonen [et al.] // Toxicol. In Vitro. – 2008. – V. 22, № 2. – P. 301–307.
- 59.** Papa, S. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging / S. Papa, V.P. Skulachev // Mol. Cellbiochem. – 1997. – V. 174, № 1/2. – P. 305–319.
- 60.** Fujisawa, S. Comparative study of the alkyl and peroxy radical scavenging activities of polyphenols / S. Fujisawa, Y. Kadoma // Chemosphere. – 2006. – V. 62, № 1. – P. 71–79.
- 61.** Repair of aminoacid radicals of apolipoprotein B-100 of low-density lipoproteins by flavonoids. A pulse radiolysis study with quercetin and rutin / P. Filipe, P. Morliere, L.K. Patterson [et al.] // Biochemistry. – 2002. – V. 41, № 36. – P. 11057–11064.

- 62.** Efficiency of natural phenolic compounds regenerating alpha-tocopherol from alpha-tocopheroxyl radical / M. Pazos, M.L. Andersen, I. Medina [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55, № 9. – P. 3661–3666.
- 63.** Clemetson, C.A. Plant polyphenols as antioxidants for ascorbic acid / C.A. Clemetson, L. Andersen // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* – 1966. – V. 136, № 14. – P. 341–376.
- 64.** Roginsky, V. Reactivity of semiquinones with ascorbate and the ascorbate radical as studied by pulse radiolysis / V. Roginsky, C. Michel, W. Bors // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2000. – V. 384, № 1. – P. 74–80.
- 65.** Cossins, E. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations / E. Cossins, R. Lee, L. Packer // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1998. – V. 45, № 3. – P. 583–597.
- 66.** Agati G. Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen / G. Agati [et al.] // *New Phytol.* – 2007. – V. 174, № 1. – P. 77–89.
- 67.** Hypochlorite scavenging activity of flavonoids / O. Firuzi, P. Mladenka, R. Petrucci [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2004. – V. 56, № 6. – P. 801–807.
- 68.** Jungbluth, G. Oxidation of flavonols with Cu (II), Fe (II) and Fe (III) in aqueous media / G. Jungbluth, I. Rühling, W. Ternes // *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2.* – 2000. – P. 1946–1952.
- 69.** Slabbert, N.P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols / N.P. Slabbert // *Tetrahedron.* – 1977. – V. 33, № 7. – P. 821–824.
- 70.** Oxidized quercetin reacts with thiols rather than with ascorbate: implication for quercetin supplementation / A.W. Boots, N. Kubben, G.R. Haenen [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 308, № 3. – P. 560–565.
- 71.** Quenching of quercetinquinone / quinonemethides by different thiolate scavengers: stability and reversibility of conjugate formation / H.M. Awad, M.G. Boersma, S. Boeren [et al.] // *Chem. Res. Toxicol.* – 2003. – V. 16, № 7. – P. 822–831.
- 72.** Бурлакова, Е.Б. Биоантиоксиданты / Е.Б. Бурлакова // *Рос. хим. журн.* – 2007. – Т. 51, № 1. – С. 3–12.

- 73.** Лапин, А.А. Антиоксидантные свойства продуктов растительного происхождения / А.А. Лапин, М.Ф. Борисенков, А.П. Карманов [и др.] // Химия растительного сырья. – 2007. – №2. – С. 79–83.
- 74.** Будников, Г.К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии / Г.К. Будников, Г.К. Зиятдинова // Журн. аналит. химии. – 2005. – Т. 60, № 7. – С. 678–691.
- 75.** Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruit and vegetables / C. Kevers, M. Falkowski, J. Tabart [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2007. – V. 55 (21). – P. 8596–8603.
- 76.** Antioxidant Capacity and Antioxidants of Strawberry, Blackberry, and Raspberry Leaves / L. Buřičová, M. Andjelkovic, A. Čermáková [et al.] // Czech J. Food Sci. – 2011. – V. 29, № 2. – P. 181–189.
- 77.** Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables / Y.-F. Chu, J. Sun, X. Wu, [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2002. – V. 50. – P. 6910–6916.
- 78.** Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (Cupric ion reducing antioxidant capacity) assay / R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurek [et al.] // Microchim Acta. – 2008. – V. 160. – P. 413–419. Doi 10.1007/S00604-007-0777-0.
- 79.** Бельтюкова С.В. Антиоксиданты в пищевых продуктах и методы их определения / С.В. Бельтюкова, А.А. Степанова, Е.О. Ливенцова // Вісник ОНУ. хімія. – 2014. – Т. 19, № 4 (52). – С. 16–31.
- 80.** Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity / activity (IUPAC technical report) / R. Apak, S. Gorinstein, V. Böhm, [et al.] // Pure Appl. Chem. [Электронный ресурс]. – 2013. – V. 85, № 5. – P. 957–998. <http://dx.doi.org/10.1351/pac-rep-12-07-15>.
- 81.** Comparative evaluation of various total antioxidant capacity assays applied to phenolic compounds with the CUPRAC assay / R. Apak, K. Güçlü, B. Demirata [et al.] // Molecules. – 2007. – № 12. – P. 1496–1547

- 82.** Яшин, Я.И. Антиоксиданты против болезней / Я.И. Яшин, А.Я. Яшин, Н.И. Черноусова // «Химия и жизнь» [Электронный ресурс]. – 2007. – № 11. – С. 23–27. [http:// www.hij.ru](http://www.hij.ru).
- 83.** Chin, Y. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid gow / Y. Chin, D. Pin-Der, T. Hui-Ling // Food Chemistry. – 2002. – V. 79, № 3. – P. 307–313.
- 84.** Р 4.1.1672-03. Руководство по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище. – М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 240 с.
- 85.** Khoddami, A. Techniques for analysis of plant phenolic compounds / A. Khoddami, M.A. Wilkes, T.H. Roberts // Molecules. – 2013. – №18. – P. 2328–2375. DOI:10.3390/Molecules 18022328.
- 86.** Яшин, А.Я. Инжекционно-проточная система с амперометрическим детектором для селективного определения антиоксидантов в пищевых продуктах и напитках / А.Я. Яшин // Рос. хим. журнал (Журнал рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). – 2008. – Т. LI, № 2. – С. 130–135.
- 87.** Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Л.Г. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63–75.
- 88.** Макашев, Ю.А. Электрохимические и люминесцентные свойства растворов флавоноидов и взаимодействие с металлами / Ю.А. Макашев, Н.Е. Кондратьева, М.В. Тарковская // Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств» [Электронный ресурс] – 2013. – №2. – С. 1–9. <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru>.
- 89.** Electrochemical tools for determination of phenolic compounds in plants / A.R.J. Dobes, O. Zitka, J. Sochor [et al.] // Int. J. Electrochem. Sci. – 2013. – № 8. – P. 4520–4542.
- 90.** Determination of active ingredients in hawthorn and hawthorn piece by capillary electrophoresis with electrochemical detection / C.H. Geng, M. Lin, W.Y. Wang [et al.] //

Журнал анал. химии. – 2008. – Т. 63, № 1. – Р. 75–81. DOI: 10.1134/S1061934808010140.

- 91.** Yao, X. Bismuth(III)-rutin complex based derivative-adsorption chronopotentiometry for the determination of bismuth (III) / X. Yao, O. Yuan // Bull. Electrochem. – 2005. – Т. 21, № 1. – С. 29–31.
- 92.** Цюпко, Т.Г. Определение галловой кислоты в коньяках методом капиллярного электрофореза / Т.Г. Цюпко, И.Н. Гунькин, З.А. Темердашев // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2010. – Т. 76, № 12. – С.15–20.
- 93.** Franzoi, A.C. Rutin determination in pharmaceutical formulations using a carbon paste electrode modified with poly(vinylpyrrolidone) / A.C. Franzoi, Almir S., Cruz V.I. // J. Pharm. and biomed. anal. – 2008. – Т. 47, № 4–5. – С. 973–977.
- 94.** Hajian, R. Application of adsorptive stripping voltammetry to the determination of bismuth and copper in the presence of morin / R. Hajian, E. Shams // Anal. Chim. Acta. – 2003. – V. 491, № 1. – С. 63–69.
- 95.** Voltammetric determination of rutin in pharmaceutical dosage forms / S. Mirel, R. Oprean, V. Mirel [et al.] // Farmacia. – 2008. – V. LVI. – P. 196–203.
- 96.** 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.
- 97.** Слепченко, Т.Б. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В1, В2, С, Е и кверцетина / Т. Б. Слепченко // Хим.-фарм. журн. – 2005. – Т. 39, № 3. – С. 54–56.
- 98.** Вольтамперометрическое исследование морина / Н.Ф. Априлкова, Д.А. Матвеев, Е.А. Арбузова [и др.] // Химия растительного сырья. – 2010. – №4. – С.83–86.
- 99.** Refat, A.H. Adsorptive stripping voltammetric determination of gallic acid using an electrochemical sensor based on polyepinephrine / glassy carbon electrode and its determination in black tea sample / A.H. Refat, E.F. Newair // Journal of electroanalytical chemistry. – 2013. – V.704. – P. 32–37.

- 100.** A selective voltammetric detection for dopamine using poly (gallic acid) film modified electrode / S. Wei, Y. Chen, J. Xu [et al.] // Chinese Chemical Letters. – 2010. – V. 21, № 3. – P. 349–352.
- 101.** Sangeetha, N.S. A novel bimediator amperometric sensor for electrocatalytic oxidation of gallic acid and reduction of hydrogen peroxide / N.S. Sangeetha, S.S. Narayanan // Analytica Chimica Acta. – 2014. – V.828. – P. 34–45.
- 102.** Вольтамперометрическое исследование / Н.Ф. Морина, Н.Ф. Апрелькова, Д.А. Матвеев [и др.] // Химия растительного сырья. – 2010. – №4. – С. 83–86.
- 103.** Влияние состава фонового электролита на аналитический сигнал при электрохимическом исследовании дигидрокверцетина / Д.А. Матвеев, Е.А. Арбузова, П.Б. Крайкивский [и др.] // Химия растительного сырья. – 2011. – № 4. – С. 157–160.
- 104.** Hassan, H.N.A. Simultaneous spectrophotometric determination of rutin, quercetin and ascorbic acid in drugs using a kalman filter approach / H.N.A. Hassan, B.N. Barsoum, I.H.I. Habib // J. Pharm. Biomed. Anal. – 1999. – № 20. – P. 315–320.
- 105.** Giusti, M.M. Acylated anthocyanins from edible sources and their applications in food systems / M.M Giusti, R.E Wrolstad // Biochemical Engineering Journal. – 2003. – V. 14, № 3. – P. 217–225.
- 106.** Зайцев, В.М. Методи концентрування та визначення фенольних сполук / В.М. Зайцев, В.А.Халаф, Г.М.Зайцева // Методи и объекты хим. анализа. – 2008. – Т. 3, № 1. – С. 4–21.
- 107.** Лобанова, А.А. Исследование биологически активных флавоноидов в экстрактах из растительного сырья / А.А. Лобанова, В.В. Будаева, Г.В. Сакович // Химия растительного сырья. – 2004. – № 1. – С. 47–52.
- 108.** К вопросу о точности спектрофотометрических оценок суммарного содержания фенолов / Т.В. Антонова, В.И. Вершинин, В.А. Иванова [и др.] // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 344–349.
- 109.** Septhum, C. UV-VIS Spectroscopic study of natural dyes with alum as a mordant / C. Septhum, V. Rattanaphani, S. Rattanaphani // Suranaree J. Sci. Technol. – V. 14, № 1. – P. 91–97.

- 110.** Экстракционно-фотометрическое определение рутина в водных средах / О.В. Ерина, Н.Я. Мокшина, В.Ф. Селеменев [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2005. – № 1. – С. 26–28.
- 111.** Symonowicz, M. Flavonoids and their properties to form chelatecomplexes / M. Symonowicz, M. Kolanek // *Biotechnol Food Sci.* [Электронный ресурс]. – 2012. – P. 76, №1. – P. 35–41. <http://www.bfs.p.lodz.pl>.
- 112.** Bhatia, I.S. A sensitive colorimetric method for the microdetermination of flavonols / I.S. Bhatia, J. Singh, K.L Bajaj // *Microchim. Acta.* – 1974. – V. 62, № 5. – P. 909–913.
- 113.** Sakamoto, M. Consecutive determination of rutin and quercetin by spectrophotometric measurements / M. Sakamoto, K. Takamura // *Microchem. J.* – 1978. – № 23. – С. 374–381.
- 114.** Dowd, L.E. Spectrophotometric determination of quercetin / L.E Dowd // *Anal. Chem.* – 1959. – V. 31, №7. – P. 1184–1187.
- 115.** Malesev, D. Investigation of metal–flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal–flavonoid complexing reactions / D. Malesev, V. Kuntic // *J. Serb. Chem. Soc.* – 2007. – V. 72, № 10. – P. 921–939.
- 116.** Кудринская, В.А. Спектрофотометрическое определение флавоноидов по реакции азосочетания с тетраборатом 4-нитрофенилдиазония / В.А. Кудринская, С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Золотов // Вестник Московского университета. Серия химия. – 2010. – Т. 51, № 4. – С. 296–301
- 117.** Jurd, L. Aluminium complexes of phenolic flavones. Spectral and structural correlation / L Jurd // *Phytochemistry.* – 1969. – V.8. – P. 445–462.
- 118.** Определение флавоноидов в плодах шиповника (*Rosa Sp.*) / О.В. Чечета, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин [и др.] // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2011. – № 1. – С.205–209.
- 119.** Kolusheva, T. Study of the complex formation reaction between Al (III) and tannic acid / T. Kolusheva, M. Hristova, L. Costadinova // *Journal of the University of chemical technology and metallurgy.* – 2012. – V. 47, № 5. – P. 570–573.

- 120.** Kaushal, G.P. Spectrophotometric determination of quercetin with VO^{2+} / Kaushal G.P., Sekhon B.S., Bhatia I.S. // *Microchim. Acta.* – 1979. – V. 71, №5–6. – P. 365–370.
- 121.** Щекатихина, А.С. Спектрофотометрическая характеристика комплексов кверцетина, морина, таксифолина и силибинина с ионами меди(II) / А.С. Щекатихина, В.П. Курченко // *Труды БГУ.* – 2011. – Т.6, часть 1. – С. 76–85.
- 122.** Михалина, Г. Спектрофотометричне дослідження взаємодії іонів осмію (IV) кверцитином / Г. Михалина, Т. Врублевська, О. Коркуна // *Вісник Львівського університету. Серія хім.* – 2009. – №. 50. – С. 170–176.
- 123.** Михалина, Г.М. Спектрофотометричне дослідження взаємодії морину з іонами родію (III) / Г.М. Михалина, Т.Я. Врублевська // *Вопр. химии и хим. технол.* – 2010. – № 5. – С. 80–83.
- 124.** De Souza Rubens F.V. Synthesis, electrochemical, spectral, and antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions / F.V. De Souza Rubens, M. Sussuchieli, F. De Giovanni Wagner // *Synth. and react. inorg. and metal-org. chem.* – 2003. – V. 33, № 7. – P. 1125–1144.
- 125.** Изучение комплекса рутин-медь и его свободного, обладающего поглощающей способностью радикала, спектрофотометрией / Baozhi-Juan, F. Yun-Shan, J. Zhong-Tao [et al.] // *Guangpushiyanshi. Chin. J. Spectrosc. Lab.* – 2005. – Т. 22, № 2. – С. 253–256.
- 126.** Исследование влияния рибофлавина, рутина, 1,1-дипиридила и 1-нафтола на восстановление Au (III) в трис-НСI-буфере /С.И. Кулаковский, Л.А. Левченко, А.В. Куликов, А.П. Садков [и др.] // *Электрохимия.* – 2007. – Т. 43, № 1. – С. 94–107.
- 127.** Степневська, Я.В. Дослідження спектральних та фізико-хімічних характеристик розчинів рутину та алюмінію рутинату / Я.В.Степневська, М.А. Волошина, Л.П. Циганок // *Вопр. химии и хим. технол.* – 2010. – № 4. – С. 112–115,.
- 128.** Phenolics composition and antioxidant activity of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) / C.J Ayasinghe, N. Gotoh, T. Aoki [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2003. – V. 51. – P. 4442–4449.

- 129.** Antioxidant activity and total phenolic compounds in selected fruits, vegetables, and grain products / Y.S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 1998. – V. 46. – P.4113–4117.
- 130.** Lee, C.Y. Is it associated with analysis of total phenolics. Presented at the First International Congress on Antioxidant Methods. – Orlando: FL, 2004.
- 131.** Box, J.D. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters / J.D. Box // *Water Res.* – 1983. – № 17. – P.511–525.
- 132.** Peterson, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry et al / G. L.Peterson // *Anal. Biochem.* – 1979. – № 18. – P. 201–220.
- 133.** Vitamin enhanced waters and polyphenol rich beverages analyzed for antioxidant capacity and antioxidants / C.P.E. Donnelly, T.M. Churilla, M.G. Coco Jr., [et al.] // *Vinson Nutrients.* – 2010. – V. 2. – P. 1290–1296. DOI:3390/nu2121290.
- 134.** Prior, R.L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements / R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – № 53. – P. 4290–4302.
- 135.** Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods enzymology.* 1999, 299, 152-178.
- 136.** Polish, A.M. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress / A.M. Polish // *J. Of Environ. Stud.* – 2006. – V. 15, № 4. – P. 523–530.
- 137.** Spectrophotometric determination of phenolic compounds in propolis / M. González, B. Guzmán, R. Rudyk [et al.] // *Lat. Am. J. Pharm.* – 2003. – V. 22, №3. – P. 243–248.
- 138.** Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants/ K.I. Berker, F.A.O. Olgun, D. Ozyurt [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2013. – № 61. – P. 4783–4791. [dx.doi.org/10.1021/jf400249k](https://doi.org/10.1021/jf400249k).
- 139.** Antioxidant capacities and main reducing substance contents in 110 fruits and vegetables eaten in China / C. Liu, Y. Zhao, X. Li [et al.] // *Food and nutrition sciences*

[Электронный ресурс]. – 2014. – № 5. – С. 293–307. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2014.54036>.

140. Крившенко, Г.А. Определение антиоксидантов с помощью реакции окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензида персульфата и периодатом / Г.А. Крившенко, М.К. Беклимишев // *Химия растительного сырья*. – 2011. – № 1. – С. 123–128.

141. Prior, R.L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements / R.L. Prior, X. Wu, K. Schaich // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – № 53. – P. 4290–4302.

142. Michalak, A. Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress / A. Michalak // *Polish J. of Environ. Stud.* – 2006. – V. 15, № 4. – С. 523-530.

143. Benzie, I.F.F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of ferric reducing ability FRAP assay / I.F.F. Benzie, J.J. Strain // *Anal. Biochem.* – 1996. – V. 239, № 1. – P. 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292.

144. Lin, Y. Studying the fluorescent system of quercetin – Al (III) – Tween 80 and its using / Y. Lin, H. Chun-xia // *J. Guangdong Univ. Technol.* – 2001. – V. 18, № 2. – P. 81–84.

145. Бондарюк, Е.В. Исследование флавонолов и их взаимодействия с сывороточным альбумином методом флуоресцентного анализа / Е.В. Бондарюк, В.В. Сенчук // *Вестник БГУ. Сер. 2.* – 2006. – № 1. – С. 27–30.

146. Cao, G.H. Oxygen Radical Absorbency Capacity Assay for Antioxidants / G.H. Cao, H.M. Alessio, R.G. Cutler // *Free radicals in biology and medicine.* – 1993. – V. 3, № 14. – P. 303–311.

147. Yu, Tian-Zhi. Изучение взаимодействия рутина и альбумина сыворотки / Yu Tian-Zhi, Yang Ru-Dong // *Spectrosc. and spectral anal.* – 2003. – V. 23, № 4. – С. 763–765.

148. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using terbium sensitized fluorescence method / M. Shaghghi, J.L. Manzoori, D.J. Afshar [et al.] // *DARU.* – 2009. – V. 17, № 4. – P. 264–268.

- 149.** Spectrofluorimetric and HPLC determination of morin in Human serum / L. Pavun, D. Dikanovic, P. Durdevic [et al.] // *Acta Chim. Slov.* – 2009. – № 56. – P. 967–972.
- 150.** Бельтюкова, С.В. Люмінесцентне визначення суми поліфенольних сполук у лікарських рослинах / С.В. Бельтюкова, Г.О. Бичкова // *Фармацевтичний журнал.* – 2011. – № 5. – С. 82–86.
- 151.** Бельтюкова, С.В. Люминесцентное определение хлорогеновой кислоты в зернах кофе / С.В. Бельтюкова, Г.О. Бичкова // *Вопросы химии и химической технологии.* – 2010. – №3. – С. 57–58.
- 152.** Бельтюкова, С.В. Люмінесцентне визначення кверцетину у фармацевтичних препаратах та лікарських рослинах / С.В.Бельтюкова, Г.О. Бичкова // *Фармацевтичний журнал.* – 2009. – Т.10, № 3. – С.57–58.
- 153.** Cao, G.H. Oxygen radical absorbency capacity assay for antioxidants / G.H.Cao, H.M.Alessio, R.G.Cutler // *Free radicals in biology and medicine.* – 1993. – V. 3, №14. – P. 303–311.
- 154.** Алексеев, А.В. Определение антиоксидантов методом активированной хемилюминесценции с использованием 2,2'-азо-бис(2-амидинопропана) / А.В. Алексеев, Е.В. Проскурнина, Ю.А. Владимиров // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2. Химия.* – 2012. – Т. 53, № 3. – С. 187–193.
- 155.** Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxydant activity of phenolic compounds /A. Krasovska, D. Rosiak, K. Czkapciak [et al.] // *Current topics in Biophysics.* – 2000. – V. 24. – P. 89–95.
- 156.** Wang, X. Flow injection chemiluminescent detection of gallic acid in olive fruits / X. Wang, J. Wang, N. Yang // *Food Chemistry.* – 2007. – V. 105, № 1. – P.340–345.
- 157.** Aucamp, J.P. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography / J.P. Aucamp, Y. Hara, Z .Apostolides // *Journal of Chromatography A.* – 2000. – V. 876, № 1–2. – P. 235–242.

- 158.** Верниковская, Н.А. Индефикация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, № 2. С. 188–195.
- 159.** Особенности разделения флавоноидов методом обращённо-фазовой высокоэффективной хроматографии на LUNA 5U C18 (2) / С.Г. Дмитриенко, А.В. Степанова, В.А. Кудринская [и др.] // Вестник Московского университета. Серия Химия. – 2012. – Т. 53, № 6. – С. 369–373.
- 160.** Исследование фенольных соединений листьев голубики, брусники, толокнянки, черники и зимолоубки, произрастающих в республике Саха (Якутия) / Л.П. Охрименко, Г.И. Калинкина, Е.А. Лукша [и др.] // Химия растительного сырья. – 2009. – №3. – С. 109–115.
- 161.** Saito, S.T. A method for fast determination of epigallocatechin gallate (EGCG), epicatechin (EC), catechin (C) and caffeine (CAF) in green tea using HPLC / S.T. Saito, A. Welzel, E.S. Suyenaga // Francie BuenoCiênc. Tecnol. Aliment., Campinas. – 2006. – V. 26, № 2. – 394–400.
- 162.** Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии /М.В. Кочетова, Е.Н. Семенистая, О.Г. Ларионов [и др.] // Успехи химии. – 2007. – Т. 76, № 1. – С. 89–100.
- 163.** 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.
- 164.** 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.
- 165.** Бубенчикова, В.Н. Изучение состава фенольных соединений донника лекарственного методом ВЭЖХ / В.Н. Бубенчикова., И.Л.Дроздова // Хим.-фармац. журн. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 24–25.
- 166.** Гумбаридзе, Н.П. Флавоноидные соединения из кожуры апельсина / Н.П. Гумбаридзе, Н.М. Турабелидзе, В.А. Чохонелидзе // Sci. Works. Kutaisi State Techn. Univ. – 2004. – № 1. – С. 172–175.

- 167.** Количественное определение фенольных соединений в лекарственном сырье тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ / Р. Бенетис, И. Радушене, В. Якштас [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 2008. – Т. 42, № 3. – С. 51–54.
- 168.** Куркин, В.А. Определение флавоноидов в сырье и препаратах гинкго двулопастного / В.А. Куркин, Д.Г.Буланкин // Фармация (Россия). – 2011. – № 2. – С. 13–16.
- 169.** Zuo, Y. Simultaneous determination of catechins, caffeine and gallic acids in green, Oolong, black and pu-erh teas using HPLC with a photodiode array detector / Y. Zuo, H. Chen, Y. Deng // Talanta. – 2002. – V.57, № 2. – P. 307–316.
- 170.** Simultaneous detection of green tea catechins and gallic acid in human serum after ingestion of green tea tablets using ion-pair high-performance liquid chromatography with electrochemical detection / K. Narumi, J.-I. Sonoda, K. Shiotani [et al.] // Journal of Chromatography B. – 2014. – V. 945–946. – P. 147–153.
- 171.** A validated solid-phase extraction HPLC method for the simultaneous determination of gallic acid, catechin and epicatechin in rhubarb decoction / R. Song, Y. Cheng, Y. Tian [et al.] // Chinese Journal of Natural Medicines. – 2012. – V. 10, № 4. – P. 275–278.
- 172.** Simultaneous determination of gallic acid, albiflorin, paeoniflorin, ferulic acid and benzoic acid in Si–Wu decoction by high-performance liquid chromatography DAD method / Y.-X. Sheng, L. Li, Q. Wang, H.-Z. Guo [et al.] // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. – 2005. – V. 37, № 4. – P.805–810.
- 173.** Wang, H. Analytical, nutritional and clinical methods section isocratic elution system for the determination of catechins, caffeine and gallic acid in green tea using HPLC / H. Wang, K. Helliwell, X. You // Food Chemistry. – 2000. – V. 68, № 1. – P. 115–121.
- 174.** Simultaneous quantification of bergenin, catechin, and gallic acid from *Bergenia ciliata* and *Bergenia ligulata* by using thin-layer chromatography / K. Dhalwal, V.M. Shinde, Y.S. Biradar [et al.] // Journal of Food Composition and Analysis. – 2008. – V. 21, № 6. – P. 496–500.
- 175.** Shahrzad, S. Determination of gallic acid and its metabolites in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography / S. Shahrzad, I. Bitsch // Journal of

Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications. – 1998. – V. 705, № 1. – P. 87–95.

176. Raote, A. Liquid chromatography – tandem mass spectrometric method for simultaneous determination of rutin and quercetin from leaves of *artocarpuslakoocha roxb* / A. Raote, A. Jangid, R. Tale, Vikas // International journal of pharma and bio sciences. – 2011. – V. 2, № 1. – С. 848–853.

177. Biesaga, M. Extraction and hydrolysis parameters for determination of quercetin in *hypericum perforatum* / M. Biesaga, A. Stafiej, K. Pyrzynska // Chromatographia. – 2007. – V. 65, № 11/12. – P. 701–706. doi:10.1365/S10337-007-0204-Z0009-5893/07/06.

178. Тонкослойная хроматография флавоноидов на силикагеле в модифицированных мицеллярных подвижных фазах на основе додецилсульфата натрия / Сумина Е.Г., Штыков С.Н., Сорокина О.Н. [и др.] // Сорбционные и хроматогр. процессы. – 2014. – Т. 14, № 1 – С. 52–64.

179. Петракова, А.В. Сорбционные и хроматографические процессы / А.В. Петракова, В.З. Угланова. – 2014. – Т. 14, № 1. – С. 52–64.

180. Stephanson, C.J. Antioxidant capability and efficacy of Mega-H silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection / Stephanson C.J., Stephanson A.M., Flanagan G.P // Journal of Medicinal Food. – 2002. – №5. – P. 9–16.

181. In vitro and in vivo activity of gallic acid and *tona sinensis* leaf extracts against HL-60 human promyelocytic leukemia / P.-J. Huang, Y.-C. Hseu, M.-S. Lee [et al.] // Food and Chemical Toxicology. – 2012. – V. 50, № 10. – P. 3489–3497.

182. Synthesis of chitosan-gallic acid conjugate: structure characterization and in vitro anti-diabetic potential / J. Liu, J.-F. Lu, J. Kan [et al.] // International Journal of Biological Macromolecules. – 2013. – V. 62. – P. 321–329.

183. Sharma, P. In vitro free radical scavenging activity of gallic acid isolated from *Caesalpinia decapetala* wood upendra Bhadoriya / P. Sharma, S.S. Solanki // Asian Pacific Journal of Tropical Disease. – 2012. – V. 2, № 2. – P. S833–S836.

- 184.** Ермаков, А.И. Определение суммарного содержания дубильных веществ. Методы биологического исследования растений / Ермаков, А.И., Арасимович В.В.: Уч. пособие. – Л.: Агропромиздат. 1987. – 456 с.
- 185.** Государственная Фармакопея СССР, XI издание, вып. 1. – М: Медицина. 1987. – 336 с.
- 186.** A new flow-injection spectrophotometric method for the determination of tannins in tea and beer using iron (III) and 1,10-phenanthroline / С. Tomàs, M. Celeste, A. Cladera [et al.] // *Food Chemistry*. – 1993. – V. 47, № 2. – P. 201–204.
- 187.** A multicommuted flow-system for spectrophotometric determination of tannin exploiting the Cu(I) / BCA complex formation / H.D. Moya, P. Dantoni, F.R.P. Rocha [et al.] // *Microchemical Journal*. – 2008. – V. 88, № 1. – P. 21–25.
- 188.** Banerjee, S. Spectrophotometric determination of titanium with tannin and thioglycollic acid and its application to titanium-treated steels and ferrous and non-ferrous alloys / S. Banerjee // *Talanta*. – 1986. – V. 33, № 4. – P. 360–362.
- 189.** Turbidimetric and photometric determination of total tannins in tea using a micro-flow-batch analyzer / M.B. Lima, S.I.E. Andrade, D.P. Harding, M.F. Pistonesi [et al.] // *Talanta*. – 2012. – V. 88. – P. 717–723.
- 190.** Федосеева, Л.М. Изучение дубильных веществ подземных и надземных вегетативных органов бадана толстолистного, произрастающего на Алтае / Л.М. Федосеева // *Химия растительного сырья*. – 2005. – № 3. – С. 45–50.
- 191.** Ferreira, E.C. Vanillin-condensed tannin study using flow injection spectrophotometry / E.C. Ferreira, A.R.A. Nogueira // *Talanta*. – 2000. – V.51, № 1. – P. 1–6.
- 192.** Maxson, E.D. Evaluation of methods for tannin in sorghum grain / E.D. Maxson, L.W. Rooney // *Cereal Chem*. – 1972. – V. 44. – P. 719–729.
- 193.** Sun B. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins / B. Sun, J.M. Ricardo-da-Silva, I. Spranger // *J. Agric. Food Chem*. – 1998. – V. 46. – P. 4267–4274.

- 194.** Butler L.G. Vanillin assay for proanthocyanidins (condensed tannins): modification of the solvent for estimation of the degree of polymerization / L.G. Butler, M.L. Price, J.E. Brothertod // *J. Agric. Food Chem.* – 1982. – V. 30. – P. 1087–1089.
- 195.** Characterisation of maritime pine (*Pinus pinaster*) bark tannins extracted under different conditions by spectroscopic methods, FTIR and HPLC / L. Chupin, C. Motillon, F.C.-E. Bouhtoury [et al.] // *Industrial Crops and Products.* – 2013. – V. 49. – P. 897–903.
- 196.** Tannin analysis of chestnut bark samples (*Castanea sativa* Mill.) by HPLC-DAD–MS / P. Comandini, M.J. Lerma-García, E.F. Simó-Alfonso [et al.] // *Food Chemistry.* – 2014. – V. 157. – P. 290–295.
- 197.** Characterisation of hydrolysable tannins from leaves of *Betula pubescens* by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry // *Journal of Chromatography A.* – 1999. – V. 864, №2. – P. 283–291.
- 198.** Wu, P.W. Determination of soluble persimmon tannin by high performance gel permeation chromatography / P.W. Wu, L.S. Hwang // *Food Research International.* – 2002. – V. 35. – P. 793–800.
- 199.** Исламбеков, Ш.Ю. Растительные дубильные вещества / Ш.Ю. Исламбеков, С.М. Каримджанов, А.К. Мавлянов // *Химия природных соединений.* – 1990. – № 3. – С. 293–307.
- 200.** Рябинина, Е.И. Сравнение химико-аналитических методов определения танинов и антиоксидантной активности растительного сырья / Е. И. Рябинина // *Аналитика и контроль.* – 2011. – Т. 15, № 2. – С. 202–204.
- 201.** RU Патент. Способ кулонометрического определения содержания дубильных веществ в растительном сырье / Зиятдинова Г.К., Агапова Н.М., Абдуллина С.Г. [и др.]; Казанский гос. медицинский университет. – №2436084; зарегистрирован 06.04.2010; 10.12.2011. [Электронный ресурс].
- 202.** Поуп, М.С. Гетерополи- и изополиоксометаллаты / М.С. Поуп. – Новосибирск: Наука, 1990. – 227 с.

- 203.** Цыганок, Л.П. Гетерополианионы структуры Кеггина – аналитически новые формы с регулируемыми свойствами в физико-химических методах анализа / Л.П. Цыганок // Журн. аналит. химии. – 1992. – Т. 47, № 7. – С. 1184–1198.
- 204.** Реакции гетерополикислот с основными красителями и их применение в анализе / И. П. Алимарин, Е.Н. Дорохова, Казанский И.В. [и др.] // Журн. аналит. химии. – 1984. – Т. 34, № 6. – С. 965–973.
- 205.** Papaconstantinou, E. Heteropolyblues V-electronic spectra one-to-six electron blues of 18-metal diphosphate anions / E. Papaconstantinou, M.T. Pope // Inorg. Chem. – 1970. – V. 9, № 3. – P. 667–673.
- 206.** Цыганок, Л.П. Использование восстановленных гетерополикомплексов в анализе / Л.П. Цыганок // Журн. аналит. химии. – 1984. – Т. 39, № 3. – С. 425–432.
- 207.** Селиванова, Т.В. Сорбционно- СФ и визуально-тестовое определение микроколичеств кремния в виде ИА 12-молибдосиликата с кристаллич. фиолетовым / Т.В. Селиванова, А.Б. Вишникин, Л.П. Цыганок // Журн. аналит. химии. – 2010. – Т. 65, № 2. – С. 147–152.
- 208.** Dawson, B. The structure of the 9(18)-heteropolyanion in potassium 9(18)-tungstophosphate, $K_6(P_2W_{18}O_{62}) \cdot 14H_2O$ / B. Dawson // Acta Cryst. – 1953. – V. 6, № 2. – P. 113-126.
- 209.** Relative stability in α - and β -Wells-Dawson heteropolyanions: a DFT study of $[P_2M_{18}O_{62}]^{n-}$ ($M = W$ and Mo) and $[P_2W_{15}V_3O_{62}]^{n-}$ / X. López, C. Bo, J-M. Poblet [et al.] // Inorg. Chem. – 2003. – V. 42, № 8. – P. 2634-2638.
- 210.** Ammam, M. Selective determination of ascorbic acid with a novel hybrid material based 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate ionic liquid and the Dawson type ion $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ immobilized on glassy carbon / M. Ammam, E.B. Easton // Electrochim. Acta. – 2011. – V. 56, №7. – P. 2847–2855.
- 211.** Sadakane, M. Electrochemical properties of polyoxometalates as electrocatalysts / M. Sadakane, E. Steckhan // Chem. Rev. – 1998. – V. 98, № 1. – P. 219-238.
- 212.** Himeno, S. Spectroscopic and electrochemical characterization of 18-molybdodisulfate (VI) (4-), $S_2Mo_{18}O_{62}^{4-}$ / S. Himeno, T. Hori, A. Saito // Bull. Chem. Soc. Jpn. – 1989. – V. 62, № 7. – P. 2184-2188.

- 213.** On the one-electron redox process of 18-molybdodisulfate (VI) with the Dawson structure / S. Himeno, T. Osakai, A. Saito [et al.] // *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* – 1992. – V. 337, № 1-2. – P. 371-374.
- 214.** A voltammetric study on the one-electron redox processes of the Dawson-type heteropolymolybdate complexes / S. Himeno, K. Maeda, T. Osakai [et al.] // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1993. – V. 66, № 1. – P. 109-113.
- 215.** Hu, J. The solid-state thermal rearrangement of the Dawson anion $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$ into a Keggin-type $[PMo_{12}O_{40}]^{3-}$ -containing phase and their reactivity in the oxidative dehydrogenation of isobutyraldehyde / J. Hu, R.C. Burns, J.-P. Guerbois // *J. Mol. Catal., A: Chem.* - 2000. – V. 152, № 1-2. – P. 141-155.
- 216.** Ciabrini, J.P. Heteropolyblues: relationship between metal-oxygen-metal bridges and reduction behaviour of octadeca (molybdotungsto) diphosphate anions / J.P. Ciabrini, R. Contant, J.M. Fruchart // *Polyhedron.* – 1983. – V. 2, № 11. – P. 1229-1233.
- 217.** Mc Cormac T. Part I. A comparative electrochemical study of transition metal substituted Dawson type heteropolyanions / T. Mc Cormac, B. Fabre, G. Bidan // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 425, № 1-2. – P. 49-54.
- 218.** Mc Cormac T. Part II. Role of pH and the transition metal for the electrocatalytic reduction of nitrite with transition metal substituted Dawson type heteropolyanions / T. Mc Cormac, B. Fabre, G. Bidan // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 427, № 1-2. – P. 155-159.
- 219.** Barrows J.N. Stabilization and magnetic resonance characterization of the oneelectron heteropoly blue derivative of the molybdophosphate $[P_2Mo_{18}O_{62}]^{6-}$. Slow intramolecular proton exchange of the twoelectron blue in acetonitrile solution / J.N. Barrows, M.T. Pope // *Inorg. Chim. Acta.* – 1993. – V. 213, № 1-2. – P. 91-98.
- 220.** Yang G. Modification of electrode surface through electrospinning followed by self-assembly multilayer film of polyoxometalate and its photochromic / G. Yang, J. Gong, R. Yang [et al.] // *Electrochem. Comm.* – 2006. – V. 8, № 5. – P. 790-796.
- 221.** Cyclic voltammetric evidence of facilitation of the reduction of nitrite by the presence of molybdenum in Fe- or Cu-substituted heteropolytungstates /

B. Keita, F. Girard, L. Nadjo [et al.] // J. Electroanal. Chem. – 2001. – V. 508, № 1-2. – P. 70-80.

222. Electrocatalysis by polyoxometalate / polymer systems: reduction of nitrite and nitric oxide / B. Keita, A. Belhouari, L. Nadjo [et al.] // J. Electroanal. Chem. – 1995. – V. 381, №1-2. – P. 243-250.

223. Preparation of a phosphopolyoxomolybdate $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ doped polypyrrole modified electrode and its catalytic properties / X. Zou, Y. Shen, Zh. Peng [et al.] // J. Electroanal. Chem. – 2004. – V. 566, №1. – P. 63-71.

224. Wang, P. Fabrication and electrochemical behavior of a sol-gel-derived carbon ceramic composite electrode entrapping 2:18-molybdodiphosphate / P. Wang, X. Wang, Y. Yuan, G. Zhu // J. Non-Cryst. Solids. – 2000. – V. 277, № 1.– P. 22-29.

225. Stepwise injection spectrophotometric determination of cysteine in biologically active supplements and fodders / A.V. Bulatov, A.V. Petrova, A.B. Vishnikin [et al.] // Microchemical Journal. – 2013. – № 110. – P. 369–373.

226. Stepwise injection spectrophotometric determination of epinephrine / A.V. Bulatov, A.V. Petrova, A.B. Vishnikin [et al.] // Talanta. – 2012. – V. 96. – C. 62–67.

227. Highly sensitive sequential injection determination of p-aminophenol in paracetamol formulations with 18-molybdodiphosphate heteropoly anion based on elimination of Schlieren effect / A.B. Vishnikin, M.K.E.A. Al-Shwaiyat, G.A. Petrushina [et al.] // Talanta. – 2012. – № 96. – P. 230–235.

228. Петрушина, Г.А. Спектрофотометрическое определение п-аминофенола в присутствии парацетамола с использованием 18-молибдодифосфата / Г.А. Петрушина, Л.П. Цыганок, А.Б. Вишникин // Вісник ДНУ. – 2011. – Т. 19, № 3/1. – С. 160–164.

229. Sequential injection spectrophotometric determination of analgine in pharmaceutical formulations using 18-molybdo-2-phosphate heteropolyanion as chromogenic reagent / M.K.E.A. Al-Shwaiyat, A.B. Vishnikin, L.P. Tsiganok [et al.] // Вісник ДНУ. – 2013. – Вип. 19, № 3. – С. 7–18.

- 230.** Determination of ascorbic acid with Wells-Dawson type molybdophosphate in sequential injection system / A.B. Vishnikin, H. Sklenařova, P. Solich [et al.] // *Anal. Lett.* – 2011. – Vol. 44. № 1–3. – P.514–527
- 231.** Петрушина, Г.А. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты с использованием гетерополикомплекса структуры Доусона / Г.А. Петрушина, А.Б. Вишникин, Л.П. Цыганок // *Вісник ДНУ.* – 2008. – Т. 16, № 3/1. – С. 85–87.
- 232.** Петрушина, Г.А. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты с помощью $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ / Г.А. Петрушина, Л.П. Цыганок, А.Б. Вишникин // *Украинский химический журнал.* – 2010. – Т. 76, № 3–4. – С. 116–122.
- 233.** Одновременное определение аскорбиновой кислоты и нитрит-ионов в мясных изделиях / Г.А. Петрушина, Л.П. Цыганок, А.Б. Вишникин [et al.] // *Методы и объекты хим. анализа.* – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 45–51.
- 234.** Follin, O. Phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents / O. Follin, W. Dennis // *J. Biol. Chem.* – 1912. – V. XII, № 2. P. 239–243.
- 235.** Folin, O. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins/ O Folin, V Ciocalteu // *J. Biol. Chem.* – 1927. – V. 73, №2. – P. 245–251.
- 236.** Garry, L.P. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall / L. Garry // *Analytical Biochemistry.* – 1979. – № 100. – P. 201–220.
- 237.** Prior, R.L. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements / R.L. Prior., X. Wu., K. Schaich // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V. 53, №. 10. – P. 4290–4302. Doi: 10.1021/jf0502698.
- 238.** Contant, R. Stereospecific preparation of new n-molybdo-(18-n)-tungsto-2-phosphates and related in Lowry, Rosebrough, Farr and Rand / R. Contant, J.-P. Ciabrini // *J. Inorg. Nucl. Chem.* – 1981. – V. 43, №. 7. – P. 1525–1528. Doi: 10.1016/0022-1902(81)80330-2.
- 239.** Blainski, A. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. / A. Blainski, G.C. Lopes, J.C. Palazzo de Mello // *Molecules.* – 2013. – V. 18. – P. 6852–6865. doi:10.3390/molecules18066852

- 240.** Костенко, Е.Е. Твердофазная спектрофотометрия – эффективный метод определения тяжелых металлов в пищевых объектах / Е.Е. Костенко, М.И. Штокало // Журн.анали.химии. – 2004. – Т 59, № 12. – С. 1276–1282.
- 241.** Суханов, А.В. Твердофазно-спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты с использованием 2,6-дихлорфенолиндофенола, иммобилизованного в полиметакрилатную матрицу / А.В. Суханов, Н.А. Гавриленко // Известия Томского политехнического университета. – 2010. – Т. 316. № 3. – С. 72–76.
- 242.** Запорожец, О.А. Иммобилизация аналитических реагентов на поверхности носителей / О.А. Запорожец, О.М. Гааер, В.В. Сухан // Успехи химии. – 1997. – Т. 66, № 7. – С. 703–712.
- 243.** Запорожець, О.А. Твердофазний реагент на основі молібдофосфорної гетерополикислоти для сорбційно-спектроскопічного визначення аскорбінової кислоти / О.А. Запорожець, Л.С. Іванько, І.А. Качан // Вопросы химии и химической технологии. – 2005. – № 1. – С. 9–13.
- 244.** Твёрдофазно-спектрофотометрическое определение восстановителей в растворе по реакции образования «синей» гетерополикислоты / И.А. Качан, О.А. Запорожец, Л.С. Зинько [и др.] // Методы и объекты химического анализа. – 2006. – Т. 1, № 2. – С. 127–131.
- 245.** Запорожец, О.А. Твёрдофазно-спектрофотометрическое и тест- определение сосуществующих форм фосфора в воде / О.А. Запорожец, Л.С. Іванько, І.А. Качан // Журн. аналит. хим. – 2007. – Т. 62, № 12. – С. 1271–1275.
- 246.** Твердофазный реагент на аналгин и аскорбиновую кислоту на основе адсорбционно закрепленного на силикагеле комплекса меди (II) с тетрабензотетраазадициклогексадеценом / О.А. Запорожец, Е.А. Крушинская, Н.А. Липковская [и др.] // Журн. аналит. хим. – 2001. – Т. 56, № 6. – С.591–596.
- 247.** Запорожец, О.А. Определение аскорбиновой кислоты методами молекулярной спектроскопии (Обзор) / О.А. Запорожец // Журн. аналит. хим. – 2002. – Т. 57, № 4. – С. 1–12.

- 248.** Спектрофотометрическое определение гидроксикоричной кислоты и ее производных в препаратах эхинацеи / О.А. Запорожец, Е.А. Крушинская, В.Н. Барвинченко [и др.] // Хим. фарм. журн. – 2003. – Т. 37, № 12. – С. 47–50.
- 249.** A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O.A. Zaporozhets, O.A. Krushynska, N.A. Lipkovska [et al.] // J. Agric. Food Chem. – 2004. – V. 52. – P. 21–25.
- 250.** Zaporozhets, O.A. A solid-phase redox reagent on the base of Fe (III)-phenanthroline complex immobilized on silicagel / O.A. Zaporozhets, O.A. Krushynska, O.O. Khozyaeva // Вопросы хим. и хим. технол. – 2004. – №4. – С. 23–27.
- 251.** Бас, Ю.П. Змішана молибдофосфорностибієва ГПК, як твердофазний аналітичний реагент для визначення катехоламінів / Ю.П. Бас, О.А. Запорожець // Вісник Черкаського університету. – 2013. – V. 14, № 267. – С. 19–25.
- 252.** Interaction of molybdo-phosphoric and molybdo-antimono-phosphoric heteropoly acids with silica gels modified with aliphatic and heterocyclic quaternary ammonium salts / O.A. Zaporozhets, I.A. Kachan, L.S. Zinko [et al.] // Adsorpt. Sci. Technol. – 2011. – V. 29, № 3. – P. 319–330.
- 253.** Бас, Ю.А. Иммобилизованный реактив Фоліна для оцінки вмісту поліфенолів у фітопрепаратах / Ю.А. Бас, М.В. Петрух, О.А. Запорожець // Вопросы хим. и хим. технол. – 2012. – № 5. – С. 105–109.
- 254.** Бельтюкова, С.В. Сорбционно-люминисцентное определение кверцетина в лекарственных растениях / С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова // Труды Одесского политехнического университета. – 2008. – Вып. 2, № 30. – С. 242–246
- 255.** Бельтюкова, С.В. Сорбционно-люминисцентное определение рутина в фармацевтических препаратах / С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова // Вісник УжНУ. Серія Хімія. – 2008. – № 20. – С. 93–98.
- 256.** Бельтюкова, С.В. Определение катехинов методом твердофазной люминесцентной спектроскопии / С.В. Бельтюкова, А.А. Бычкова // Методы и объекты хим. анализа. – 2012. – Т. 7, № 2. – С. 76–82.

- 257.** Бельтюкова, С.В. Применение метода твердофазной спектрометрии для тест-определения антиоксидантов / С.В. Бельтюкова, Ливенцова Е.О., Степанова А.А. // Харчова наука і технологія. – 2015. – № 1. – С. 21–25.
- 258.** Лурье, Ю.Ю. Справочник по аналитической химии. Москва: Химия, 1979, С. 278.
- 259.** Сырье лекарственное растительное. Правила приемки и методы отбора проб: ГОСТ 24027.0-80 (Межгосударственный стандарт). – [Действующий от 1981–01–01]. – М.: Гостстандарт СССР, 1980. – 5 с.
- 260.** Фрукти, овочі та продукти їх переробляння. Методи визначання вмісту поліфенолів: ДСТУ 4373:2005 (Національний стандарт України). – [Діючий від 2006–04–01]. – К.: Держспоживстандарт, 2006. – 8 с.
- 261.** Прополис. Метод определения полифенолов: ГОСТ Р 55488-2013 (Национальный стандарт Российской Федерации). – [Действующий от 2015–01–01]. – М.: ФГУП Стандартиформ, 2014. – 8 с.
- 262.** Сырье лекарственное растительное. Методы определения влажности, содержания золы, экстрактивных и дубильных веществ, эфирного масла: ГОСТ 24027.2-80 (Межгосударственный стандарт). – [Действующий от 1981–01–01]. – М.: Гостстандарт СССР, 1980. – 10 с.
- 263.** Чай. Методы определения содержания танина и кофеина: ГОСТ 19885-74 (Межгосударственный стандарт). – [Действующий от 1975–07–01]. – М.: Гостстандарт СССР, 1974. – 5 с.
- 264.** Чай. Метод определения общего содержания полифенолов – ГОСТ Р ИСО 14502-1-2010 (Национальный стандарт Российской Федерации). – [Действующий от 2012–01–01]. – М.: ФГУП Стандартиформ, 2010. – 11 с.
- 265.** Руководство по неорганическому синтезу: в 6-ти т. Т. 6. Под ред. Г. Брауэра. – М.: Мир, 1986. – 360 с.
- 266.** Papaconstantinou, E. Heteropoly blues. III. Preparation and stabilities of reduced 18-molybdodiphosphates / E. Papaconstantinou, M.T. Pope // Inorg. Chem. - 1967. – V. 6, № 6. – P. 1152-1155.

267. Papaconstantinou, E. Photochemistry of heteropoly electrolytes. The 18-molybdodiphosphate / E. Papaconstantinou, D. Dimotikali, A. Politou // *Inorg. Chem. Acta.* – 1980. – V. 46. – P. 155-158.
268. Briand, L.E. Stability of the phospho-molybdic Dawson-type ion $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ in aqueous media / L.E. Briand, G.M. Valle, H.J. Thomas // *J. Mater. Chem.* – 2002. – V. 12, №2. – P. 299-304.
269. Papaconstantinou, E. A comparative reduction of 18-molybdodiphosphate by α -tocopherol in micellar and isotropic media / E. Papaconstantinou, C.M. Paleos // *Inorg. Chim. Acta.* – 1986. – V. 125, № 1. – P. L5-L6.
270. Papadakis, A. Functionalization of electrodes with polyoxometalates $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$ and $P_2W_{18}O_{62}^{6-}$ / A. Papadakis, A. Souliotis, E. Papaconstantinou // *J. Electroanal. Chem.* – 1997. – V. 435, № 1-2. – P. 17-21.
271. Девис, М. Витамин С: химия и биохимия / М. Девис, Дж. Остин, Д. Татридж. – М.: Мир, 1999. – 176 с.
272. Левашова, О.Л. Особенности определения аскорбиновой кислоты в витаминно-минеральном комплексе Gesticare / О.Л. Левашова, С.Н. Коваленко // *Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики.* – 2011. – Т. XXIV, №2. – С. 26-29.
273. Вишникін, А.Б. Модифицированные формы гетерополианионов в спектроскопических методах анализа: дисс. д-ра. хим. наук: 02.00.02 / Вишникін Андрей Борисович. – Днепропетровск, 2012. – 450 с.
274. Берштейн, И.Я. Спектрофотометрический анализ в органической химии / И.Я. Берштейн, Ю.Л. Каминский. – Л.: Химия, 1975. – 229 с.
275. Трохименко, О.М. Концентрування та визначення мікрокількостей Фосфору(V) і Талію(I) у водах з використанням гетерополікомплексів фосфору: дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / Трохименко Ольга Митрофанівна. – Київ, 2000. – 139 с.
276. Hamon, R.F. The cation-chelation mechanism of metal-ion sorption by polyurethanes / R.F. Hamon, A.S. Khan, A. Chow // *Talanta.* – 1982. – Vol. 29. – P. 313–326.

277. Khan, S. Studies on the extraction of phosphomolybdate by polyether foam anjum / S. Khan, A. Chow // *Talanta*. – 1983. – Vol 30, No. 3. – P. 173-178.
278. Коньяк. Общие технические условия: ГОСТ 31732-2012 (Национальный стандарт Российской Федерации). – [Действующий от 2013-07-01]. – М.: Стандартинформ, 2013.
279. Определение основных фенольных и фурановых компонентов в коньячной продукции / В.П. Курченко, О.Н. Урсул, Т.М. Власова [и др.] // *Вестник БГУ*. Сер. 2. – 2009. – № 3. – С. 46–52.
280. Петрушина, Г.О. 18-молибдодифосфат-аніон – новий аналітичний окисно-відновний реагент: дисс. канд. хим. наук: 02.00.02 / Петрушина Галина Олександрівна. – Днепропетровск, 2012. – 163 с.
281. Gevrenova, R. Ontogenetic and seasonal variation in the flavonoid composition of *Sophora japonica* cultivated in Bulgaria / R.Gevrenova, G.Kitanov, D. Ilieva // *Pharm. Biol.* – 2007. – V. 45, № 2. – P. 149-155.
282. Characterization and antioxidant properties of polysaccharides from flowers of *Sophora japonica* L.(Huaihua) / L. Zhang, H. Ji1, A. Du [и др.] // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2013. – V. 7, № 21. – P. 1543–1549.
283. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / А.В. Булатов [и др.] // *Аналитика и контроль*. – 2012. – Т. 16, № 4. – С. 358–362.
284. Верниковская Н.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев // *Аналитика и контроль*. – 2012. – Т. 16, № 2. – С.189–195.
285. Analysis of phenolic compounds in *Matricaria chamomilla* and its extracts by UPLC-UV / G. Naghi [et al.] // *Res. Pharm. Sci.* – 2014. – V. 9, № 1. – P. 31–37.
286. Wojdyło, A. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs / A. Wojdyło, J. Oszmianski, R. Czemerys // *Food Chem.* – 2007. – V. 105, № 3. – P. 940–949.
287. Биохимический состав алтея лекарственного сорта «Рассвет» при интродукции в Беларусь / Л.В. Кухарева [и др.] // *Труды БГУ*. – 2010. – Т. 5, часть 2. – С. 44–48.

- 288.** Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts / J. Bernatoniene [et al.] // *Medicina (Kaunas)*. – 2008. – V. 44, № 9. – P. 706–712.
- 289.** The comparison of anti-oxidative kinetics in vitro of the fluid extract from maidenhair tree, motherwort and hawthorn / J. Bernatoniene [et al.] // *Acta Poloniae Pharm. Drug Res.* – 2009. – V. 66, № 4. – P. 415–421.
- 290.** Comparative analysis of pharmaceuticals and dietary supplements containing extracts from the leaves of *Ginkgo bilobal* / A. Gawron-Gzella [et al.] // *ActaPoloniae Pharm. Drug Res.* – 2010. – V. 67, № 4. – P. 335–343.
- 291.** Phenolic composition and antioxidant capacities of *Helichry sumplicatum* / S. Kolaylı [et al.] // *Hacettepe J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 38, № 4. – P. 269–276.
- 292.** Determination of flavonoids in a Citrus fruit extract by LC–DAD and LC–MS / Mata Bilbao M.L. [et al.] // *Food Chem.* – 2007. – V. 101, № 4. – P. 1742–747.
- 293.** Simultaneous determination of all polyphenols in vegetables, fruits, and teas / H. Sakakibara [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – V. 53, № 3. – P. 4290–4302.
- 294.** Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography the antioxidant potential of citrus fruit / S. Gorinstein [et al.] // *Acta Chromatographica.* – 2006. – V. 17. – P. 108–123.
- 295.** Zuo, Y., Simultaneous determination of catechins, caffeine, gallic acids in green, Oolong, Black and pu-erh teas using HPLS with a photodiode array detector / Y. Zuo, H.Chen, Y. Deng // *Talanta.* – 2002. – V. 57, № 2. – P. 307–316.
- 296.** Total phenolic contents and antioxidant activities of pomegranate peel, seed, leaf and flower / W. Elfalleh [et al.]. *J. Medicinal Plants Res.* – 2012. – V. 6. – P. 4724– 4730.
- 297.** Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa*L.) beverage / S.G. Sáyago-Ayerdi [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2007. – V. 55, № 19. – P. 7886–7890.
- 298.** Матасов, С.А. Химический состав сухого водного экстракта из шрота шиповника / С.А. Матасов, Г.Л. Рыжова, К.А. Дычко // *Химия растительного сырья.* – 1997. – Т. 1, № 2. – С. 28–31.

- 299.** Nowak, R. Polyphenols of Rosa L. leaves extracts and their radical scavenging activity / R. Nowak, U. Gawlik-Dziki // *Z. Naturforsch.* – 2007. – V. 62c, № 1-2. – P. 32–38.
- 300.** Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts / M.M. Radojković [et al.] // *Hem. ind.* – V. 66, № 4. – P. 547–552.
- 301.** Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species / M. Imran, H. Khan, M. Shah [et al.] // *J Zhejiang Univ-Sci B (Biomed & Biotechnol)*. – 2010. – V. 11, № 12. – P. 973–980.
- 302.** Al-Boushl, M.A. Extraction and study of the phenolic compounds in the leaves and sticks of the Syrians umacplant (*Rhus coriaria* L.) / M.A. Al-Boushl, H.H. Hamdo, J. Herball // *Int. J. Chem. Tech. Res.* – 2014. – V. 6, № 4. – P. 2414–2420.
- 303.** Cabrita, M. J. Phenolic acids, phenolic aldehydes and furanic derivatives in oak chips: American vs. french oaks / M. J. Cabrita, C. Baroccas Dias, A.M. Costa Freitas // *South Afric. J. Enol. Vitic.* – 2011. – V. 32, № 2. – P. 204–210.
- 304.** Shirin, A.P.R. Chemical composition and antioxidant properties of ginger root (*Zingiber officinale*) / A.P.R. Shirin, P. Jamuna // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2010. – V. 4, № 24. – P. 2674–2679. DOI: 10.5897/JMPR09.464 ISSN 1996-0875.
- 305.** Comparison of the main bioactive compounds and antioxidant activities in garlic and white and red onions after treatment protocols / S. Gorinstein, H. Leontowicz, M. Leontowicz [et al.] // *J. Agric. Food Chem.* – 2008. – V. 56. – P. 4418–4426.
- 306.** Total polyphenol and main flavonoid antioxidants in different onion (*Allium cepa* L.) varieties / J. Lachman, D. Proněk, A. Hejtmánková [et al.] // *Hort. Sci. (Prague)*. – 2003. – V. 30, № 4. – P. 142–147.
- 307.** A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables / S. Gorinstein, Y.-S. Park, B.-G. Heo [et al.] // *Eur. Food. Res. Technol.* – 2009. – V. 228:– P. 903–911. DOI 10.1007/s00217-008-1003-y.
- 308.** Phenolic content and ascorbic acid are major contributors to antioxidant capacity of fruits and vegetables commonly consumed in Turkey / A. Güleç, R. Nergiz-Unal,

A. Akyol [et al.] // Journal of Food, Agriculture & Environment. 2013. – V. 11, № 3-4. – P. 463–468.

309. The effect of heating and fermenting on antioxidant properties of white cabbage / B. Kuszniereicz , A. Smiechowska, A. Bartoszek [et al.] // Food Chemistry. – 2008. – V. 108. – P. 853–861.

310. Partial characterization of white cabbages (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*) from different regions by glucosinolates, bioactive compounds, total antioxidant activities and proteins / B. Kuszniereicza, A. Bartoszekb, L. Wolskaa [et al.]. – LWT. – 2008. – V. 41. – P. 1–9.

311. Cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*) phytochemicals with antioxidant and anti-inflammatory potential / S. Rokayya, C.-J. Li, Y. Zhao, Y. Li [et al.]. – Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2013. – V. 14. – P. 6657–6662. DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.11.6657>

312. Leja, M. Phenolic compounds as the major antioxidants in red cabbage / M. Leja, I. Kamińska, A. Kołton // Folia Horticulturae Ann. 2010. – V. 22, № 1. – P. 19–24.

ДОДАТОК 1

Біологічно активні речовини, що містяться у рослинних об'єктах

Рослинний об'єкт, одиниці вмісту [Посилання]	Флавоноїди			Фенольні кислоти		Полимерні поліфеноли	Речовини нефенольної природи
	Флавоноли	Флавонони	Флаванни	Оксибензойні	Оксикоричні, кумаріни		
Софора (мг/г) [281-282]	рутин (45–267)	–	–	–	–	–	BC
Календула (мг/г) [283]	Рутин (34,3 мг Кв/г) ізокверцетин (12,3 мг Кв/г) ізорамнетин (8,9 мг Кв/г)	–	–	галола (10,1 мг ГК/г)	–	таніни (0,009)	каротіноїди АК (0,69)
Деревій (мг/100 г сух. речовини) [284]	лютеолін (103) апігенін (84)	–	–	–	кавова (429) хлорогенова (118) ферулова (35)	–	каротіноїди (1,4)
Ромашка (мг/100 г) [285]	апігенін (40 – 740) апігенін 7–глікозид (210 – 1100)	–	катехіни	протокатехова ванілінова гентизінова	кумаріни ферулова кавова	–	органічні кислоти полісахаріди АК
Корінь солодки (мг/100 г) [286]	кверцетин (4,02) апігенін (85)	ліквіритин (12,8) лікуразид	–	–	корична (26) кавова (15,3) п–кумарова (11,9)	таніни (83,3)	каротіноїди (10)
Корінь алтея (мг/100г) [287]	кверцетин (747)	–	лейкоціанідини (390 – 478) катехіни (260)	–	сума оксикоричних кислот (504 – 520)	–	BC (6,6) АК (273)

Екстракт глоду (мкг/мл) [288]	Гіперозид (20 – 293,2) рутин (5 – 26,4) кверцетин (4 – 12,6) вітексин (4)	–	епікатехін (449,2) катехін (370) проантоціанідин (1 – 7,1)	–	хлорогенова (10 – 34,6)	–	каротіноїди ВС АК
Пустирник (мкг/мл) [289]	рутин (52) гіперозид (14) вітексин (17) ізовітексин (14) кверцетин (8)	–	–	–	кавова (12,4 – 90) хлорогенова (46)	–	терпени (2,5) сапоніни (250) каротіноїди (3,3)
Гінгко Білоба (мг/100 мг) [290]	кемпферол кверцетин ізорамнетин сума (9,6)	–	–	–	–	–	–
Квіти безсмертника (мг/100 г) [291]	кверцетин (16,3) рутин (29,1)	–	катехіни (0,95)	протокатехова (0,19) 4-гідроксибензойна (0,76) ванілінова (0,35)	хлорогенова (11,1) синапінова (0,08) п-кумарова (0,25)	таніни (2,4)	АК (0,14 – 7,0) ВС
Біологічно активна добавка «Формула-3» (мг/табл.)	дигідрокверцетин (4,2) рутин (50)	–	антоціани (5) катехіни (10)	–	сума оксикоричних кислот (5)	галотаніни (90)	АК (50) рібофлавін (1)
Грейпфрут (мг/100 г) [81, 292-294]	–	нарінгенін (132 – 438)	–	–	кавова (2,1 – 5,8) сума (16 – 27)	–	АК (23,2)
Лимон (мг/100 г) [81, 292-294]	апігенін (5 – 12) мірицетин (1) кемпферол (0,61)	гесперидин (135 – 318)	–	–	кавова (1,2 – 2,5)	–	АК (61,9)
Апельсин (мг/100 г) [81, 292-294]	мірицетин (2,14) кверцетин (0,69) кемпферол (0,18)	гесперидин (44,1 – 148) нарінгенін (167)	–	–	–	–	АК (24,5–57,5)

Зелений чай (мг/г) [295]	рутин (1,1)	–	ЕГК (30)	–	галола (1)	таніни	кофеїн (23–26)
			ЕГКГ (60)				
Квіти граната (мг/г) [296]	флавоноли (72,3 мг рутина/г)	–	антоціани (169 мг ЦГ/г)	–	–	таніни (148,2 мг ТК/г)	–
Квіти гібіскуса (г ГК/100 г) [297]	сума (0,13)	–	антоціани (0,67)	сума оксibenзойних кислот (0,66)	сума оксикоричних кислот (0,71)	–	–
Плоди шипшини (мг/100 мг) [118, 298]	кверцетин (0,74)	–	антоціани (2,8 – 3,1)	–	–	таніни	АК (0,01) каротіноїди (4,9) амінок-ти (17) органічні к-ти ВС
Квіти шипшини (мг/г) [299]	кверцетин (3,7 – 16,8) кемпферол (0,7 – 9,4)	–	–	–	елагола (3,3 – 6,1)	елаготані- ни (6,0 – 13,3)	–
Шовковиця (мг/100 г) [300-301]	рутин (43,5) кверцетин (3,7)	–	–	галола (14,5)	хлорогенола (43,5)	–	ВС (6000) рібофлавін (82) нікотинолола к-та АК (15200)
Кава (мкмоль/100 г) [293]	–	–	–	–	кавола (166) хлорогенола (698)	–	кофеїн (4032)
Корінь лопуха (мкмоль/100 г) [293]	–	–	–	–	хлорогенола (178) ферулола (38 – 100) корична (150 – 532)	–	–
Сумах (мг/100 г) [302]	–	–	–	галола (480) ванілінола (500) 4-гідроксibenзойна (480)	кавола (320)	галотаніни (500)	амінокисло-ти (483)

Кора дуба (мг/100 г) [303]	кверцетин (41 – 195)	–	–	галола (35 – 195) ванілінова (2 – 15) бузкова (6 – 16)	елагола (127 – 800)	елаготані- ни (127 – 800)	–
Імбир (мг/100 г) [304]	епігенін кверцетин лютеїн (сума 2980)	–	–	4-гідроксибензойна	кавола гінгерол	таніни (1120 – 1410)	АК (0,046)
Цибуля ріпчаста (мг/100 г) [293, 305-307]	кверцетин (0,38 – 8,1) кемпферол (0,1 – 0,23)	–	–	протокатехола (0,36) 4-гідроксибензойна (0,61) ванілінола (0,27)	кавола (0,86) сінапінола (0,05) ферулола (0,03)	таніни (2,4)	АК (0,14 – 7,0) ВС
Цибуля червола (мг/100 г) [293, 305-307]	кверцетин (110,6)	–	антоціани (460,3)	прокатехола (5,08) 4-гідроксибензойна (0,62)	ферулола (0,25) сінапінола (0,2)	таніни (4,9)	АК (40,7) ВС
Салат «Айсберг» (мг/100 г) [293]	кверцетин (1,7 – 4,8)	гесперидин (0,3)	–	–	кавола (17,1) хлорогенола	–	АК (0,04)
Капуста білокачана (ммоль/100 г) [293, 307, 309-310]	кемферол лютеолін кверцетин (0,05)	–	–	прокатехола (133,1) галола (40,3)	кавола (44,9) кумарола (4,94)	–	АК (0,32) каротіноїди амінок-ти
Капуста червонокачана (ммоль/100 г) [293, 307, 311-312]	кемферол лютеолін кверцетин (17,5)	–	антоціани (84,3)	галола (60,69)	корична кумарола (215,3) хлорогенола (26,5)	–	АК (57,6) каротіноїди амінок-ти

«←» – немає даних.

Умовні позначення: сума – загальний вміст фенольних сполук, ЕГКГ – епігалокатехінгалат, ЕГК – епігалокатехін,

ЦГ – ціанідин-3-глікозид, ТК – танінова кислота, АК – аскорбінова кислота, ВС – відновлюючі сахара.

5. Відомості про розроблені об'єкти інтелектуальної власності по розглянутій роботі

1) Денисенко Т.А., Цыганок Л.П., Вишнікин А.Б. Спектрфотометрическое определение кверцетина и суммы полифенолов с использованием 18-молибдодифосферного гетерополикомплекса. Методы и объекты химического анализа. 2014. – Т. 9, № 3. – С. 130-138.

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

6. Пропозиції кафедри, Ради рекомендувати до подальшого впровадження та використання в учбовій роботі кафедр аналітичної хімії та харчових технологій

Заст. зав. науково-аналітичного відділу



Т.В. Безугла

Зав. відділу з питань інтелектуальної власності



О.М. Никифорова

Зав. навчального відділу



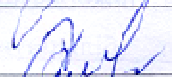
О.В. Верба

Голова Ради



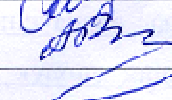
В.Ф. Варгалюк

Зав. кафедри харчових технологій



Т.О. Колісниченко

Зав. кафедри аналітичної хімії



А.Б. Вишнікін