

УДК 615.074;543.42

С. В. Бельтюкова, А. А. Бычкова

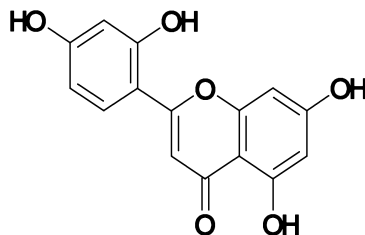
Одесская национальная академия пищевых технологий,
кафедра химии и безопасности пищевых продуктов
ул. Канатная, 112, Одесса, 65039, Украина

СОРБЦИОННО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОРИНА В РАСТИТЕЛЬНОМ СЫРЬЕ

Разработана методика определения мори́на, основанная на использовании собственной твердофазной люминесценции мори́на, усиленной в присутствии скандия (III). Предел обнаружения мори́на на сорбенте составляет $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Ключевые слова: морин, скандий, люминесценция, растительное сырье.

Полифенолы занимают ведущее место среди биологически активных веществ. Их биологическое действие связано с Р-витаминной активностью флавоноидов, антимикробной — катехинов, а весь комплекс полифенолов обладает антилучевым, антистрессовым, антиоксидантным действием. Фенольные вещества занимают ведущее место в лечебно-профилактическом питании. Одним из важнейших показателей качества пищевых продуктов является их антиоксидантная активность (АО). Антиоксиданты являются важнейшей частью клеточно-протеиновой системы организма. Они обладают способностью нейтрализовать вредные для организма свободные радикалы, высокореактивные и неустойчивые молекулы, которые вызывают значительные разрушения клеток. Свободные радикалы образуются в процессе жизнедеятельности организма, поэтому возникает необходимость блокирования этих свободнорадикальных процессов, инициаторами которых являются активные формы кислорода. Для регулирования свободнорадикальных процессов в организме применяют биологически активные соединения, проявляющие антиоксидантные свойства. Наиболее распространенными биоантиоксидантами (АО) ряда флавоноидов являются кверцетин, рутин и морин [1—3], которые содержатся во многих лекарственных растениях. Морин — 3,5,7,2',4'-пентагидроксифлаво́н является одним из наиболее распространенных биоантиоксидантов ряда флавоноидов (флавоноловых гликозидов):



Электрохимические методы определения АО, в том числе и флавонолов, основаны на способности их молекул окисляться как в растворе, так и на поверхности электродов из материалов различной природы. Предложено вольтамперметрическое определение флавонолов в фармпрепаратах, основанное на регистрации высоты волны окисления кверцетина на платиновом электроде на фоне 0,1М H_2SO_4 [4], либо на фоне 0,1М HCl [5]. Однако чувствительность определения в этих методах невысока, предел обнаружения составляет $1,6 \cdot 10^{-5} - 7,9 \cdot 10^{-6}$ моль/л. Известны спектрофотометрические методы определения суммы полифенольных соединений, основанные на реакции окисления-восстановления — метод Фолина-Дениса [6]. Однако этот метод имеет существенный недостаток, связанный с выпадением осадка, что приводит к получению заниженных результатов. Спектрофотометрическая методика [7] позволяет проводить качественный анализ растительного сырья по спектрам поглощения, количественное содержание флавоноидов рассчитывают в пересчете на хлорогеновую кислоту. Чаще всего флавоноиды в растительном сырье определяют методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [8, 9], с помощью обращено-фазовой ВЭЖХ [10]. В последние годы для идентификации фенолов, содержащихся в пищевых продуктах и напитках, используют ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием или сочетание диодно-матричного [11] и масс-спектрометрического детектирования с различными источниками ионизации. Эти методы дают возможность одновременного обнаружения флавоноидов в лекарственных растениях, характеризуются низкими пределами обнаружения $(5-6) \cdot 10^{-8}$ моль/л. Однако они требуют наличия достаточно дорогостоящей и сложной аппаратуры.

Ввиду большого интереса к флавоноидам, как важным природным антиоксидантам, обладающим биологической активностью, разработка простых экспрессных и воспроизводимых методик определения АО в растительном сырье представляет собой актуальную задачу. Весьма перспективными являются тест-методы, которые позволяют дать предварительную полуколичественную или количественную оценку присутствия химического компонента в образце, а также провести предварительный скрининг, отбраковку и установление фальсификации образцов. Особенно это важно в процессе контроля качества пищевых продуктов, растительного сырья и фармацевтических препаратов. Нами разработана простая методика тест-определения морины, основанная на регистрации собственной люминесценции этого препарата, усиленной в присутствии ионов скандия (III).

Аппаратура и материалы

Спектры люминесценции морины и его комплекса со скандием (III) регистрировали с помощью спектрометра СДЛ-1 (люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120 А со светофильтром УФС-2, выделяющим излучение с $\lambda_{\text{макс}} = 365$ нм). Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра UV-VIS Specord M40, pH растворов измеряли с помощью иономера универсального ЭВ-74.

Раствор морина ($1,0 \cdot 10^{-2}$ моль/л) готовили по точной навеске препарата в этаноле. Буферный раствор гексаметилентетрамина 4%-ного готовили растворением навески препарата в дистиллированной воде с последующим разбавлением этанолом до необходимого значения $\text{pH}=4,5$.

Экспериментальная часть

Этанольный раствор морина при облучении УФ-светом ртутной лампы проявляет люминесцентные свойства, но интенсивность его люминесценции (I люм.) невелика. Известно, что I люм. лиганда в некоторых случаях может возрастать при комплексообразовании с ионами металлов, не имеющих собственного поглощения в видимой области спектра. В связи с этим нами было изучено влияние ионов Y (III), La (III), Sc (III), Al (III) на I люм. морина. При этом было обнаружено, что наиболее высокой интенсивностью люминесценции обладают комплексы с Y (III) и Sc (III).

Спектр поглощения этанольного раствора морина характеризуется полосой в УФ-области спектра с $\lambda_{\text{макс.}} = 367$ нм с молярным коэффициентом поглощения $\epsilon = 14200$ л/см·моль, что свидетельствует об интенсивном поглощении этим лигандом УФ-излучения. При комплексообразовании с ионами Y (III) и Sc (III) полоса поглощения морина сдвигается в видимую область ($\lambda_{\text{макс.}} = 443$ нм). Сдвиг максимума составляет 76 нм (рис.1). Максимумы спектров поглощения комплекса морина с Y (III) и Sc (III) совпадают. Батохромное смещение максимума спектра поглощения морина может служить подтверждением комплексообразования с Y (III) и Sc (III). Спектр люминесценции комплекса морина с Y (III) сдвинут по сравнению со спектром поглощения на 87 нм в сторону длинных волн, и имеет максимум при $\lambda_{\text{изл.}} = 530$ нм, а со Sc (III) — на 79 нм в сторону длинных волн и имеет максимум при $\lambda_{\text{изл.}} = 522$ нм (рис. 2).

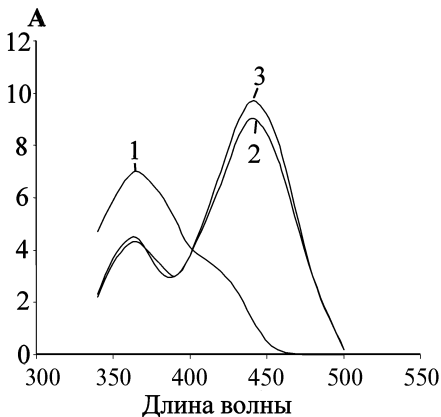


Рис. 1. Спектры поглощения морина (1), комплекса морина с иттрием (III) (2), со скандием (III) (3)

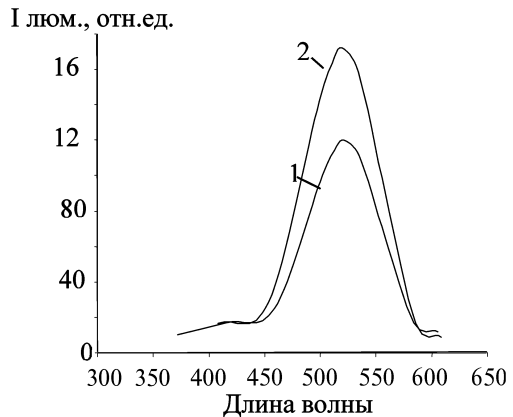


Рис. 2. Спектры люминесценции комплекса морина со скандием (III) в растворе (1) и на Sephadex G-75 (2)

Интенсивность люминесценции комплекса сохраняется на сорбентах. Исследована сорбция комплекса на различных сорбентах: пенополиуретане, цеолитах (CaA, NaA), фосфате алюминия, силикагеле, Sephadex G-50, G-75, G-150. Установлено, что максимальная интенсивность люминесценции комплекса наблюдается на Sephadex G-75 и G-150, иммобилизованных ионами скандия (III). Для дальнейших исследований был выбран Sephadex G-75, иммобилизованный ионами Sc (III), поскольку комплекс с морином проявляет наибольшую интенсивную люминесценцию на выбранном сорбенте (рис. 3). Интенсивность люминесценции комплекса морины с Y (III) увеличивается в 4,4 раза, со Sc (III) — в 8,3 раза. Иммобилизацию проводили путем обработки соответствующей навески сорбента водным раствором хлорида скандия (III) ($1 \cdot 10^{-2}$ моль/л) до гелеобразного состояния. В гелеобразный сорбент вводили морин, уротропин. Время сорбции морины составляет 10—15 минут. Максимальная I люм. наблюдается при модификации ионами скандия (III) с последующей обработкой сорбента. В этих условиях сорбат комплекса рутин со Sc (III) имеет слабую люминесценцию, а комплекса кверцетина со Sc (III) практически не люминесцирует. Это дает возможность определять морин в присутствии кверцетина и рутина.

I люм., отн.ед.

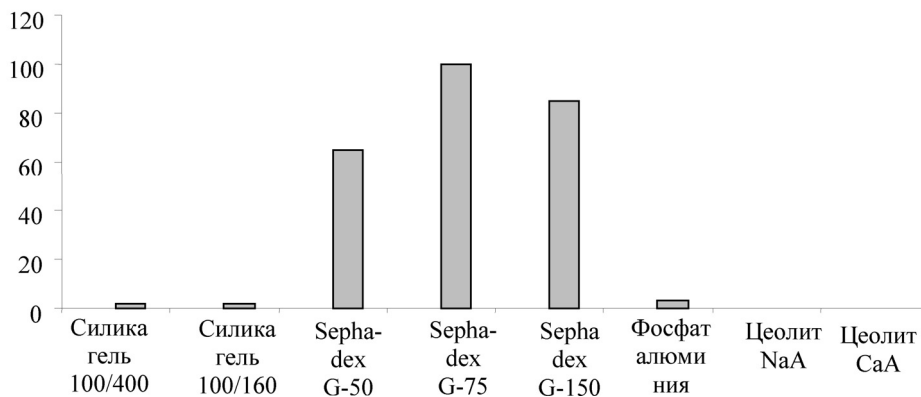


Рис. 3. Интенсивность люминесценции морины на различных сорбентах, модифицированных ионами скандия (III)

Интенсивность люминесценции морины на сорбенте зависит от pH раствора, из которого проводится сорбция. Наибольшая I люм. наблюдается при pH=4,1. В качестве буфера использовали раствор уротропина 0,4% -ный.

Интенсивность люминесценции сорбата зависит от температуры (рис. 4а) и времени высушивания (рис. 4б). Как видно из рисунка максимальная интенсивность люминесценции наблюдается при высушивании сорбата при 100°C в течение 60 минут.

Изучение зависимости интенсивности люминесценции морины от количества скандия (III) на Sephadex G-75 показало, что интенсивность люминесценции максимальна при концентрации Sc (III) 0,01 моль/л. Для

дальнейших исследований нами выбрана концентрация скандия (III) — $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л. Линейная область зависимости интенсивности люминесценции комплекса от концентрации морина наблюдается в диапазоне концентраций $(0,005—0,04) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Предел обнаружения морина составляет $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л. Снизить предел обнаружения можно, используя в качестве усиливающего реагента бычий сывороточный альбумин, в присутствии которого I люм. комплекса возрастает в 2 раза.

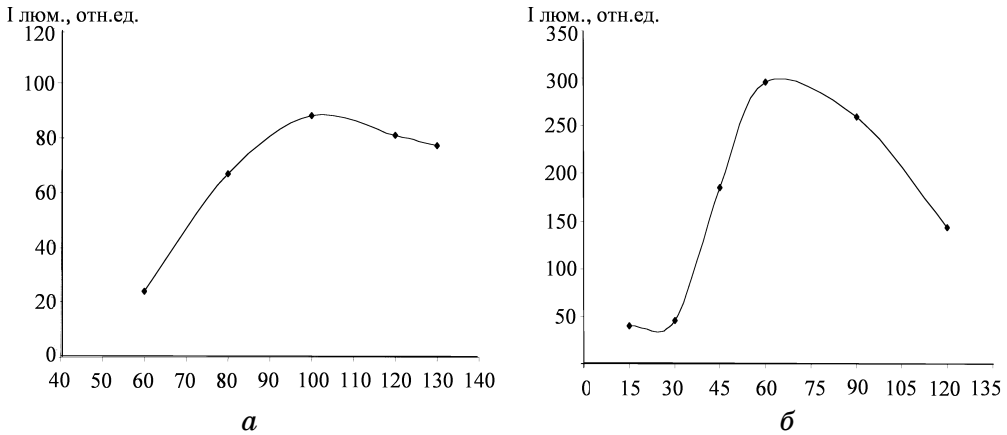


Рис. 4. Интенсивность люминесценции сорбата при различной температуре (а) и длительности высушивания (б)

На основании полученных результатов разработана методика тест-определения морина в растительном сырье: листьях шелковицы, плодах винограда «Изабелла», цветах липы, чабреце, листьев зверобоя. Определение проводили по методу добавок.

Методика определения

Навеску 1 г измельченного на мельнице растительного сырья переносят в колбу, добавляют 50 мл 50 % этанола (этанол—вода 1:1) и перемешивают на магнитной мешалке в течение 60 минут при 70°C. Полученный экстракт отфильтровывают на фильтре «синяя лента» в мерную колбу, доводят объем экстракта до 50 мл 50%-ным этанолом. Если интенсивность люминесценции полученного экстракта велика, то раствор необходимо разбавить так, чтобы не наблюдалось гашения люминесценции.

В три пробирки помещают по 100 мг сорбента, модифицированного ионами скандия (III), и добавляют по 1мл экстракта растительного сырья, в две из них добавляют по 0,25 мл стандартного раствора морина с содержанием $1,4 \cdot 10^{-5}$ г/мл. Затем добавляют в каждую по 0,1 мл уротропина 0,4%-ного, по 0,1 мл бычьего сывороточного альбумина 1 мг/мл и перемешивают в течение 5 минут.

Осадок отфильтровывают и высушивают в течение 60 минут при 100 °С, растирают в ступке до порошкообразного состояния и регистрируют интен-

сивность люминесценции комплекса, иммобилизованного на сорбенте, при $\lambda_{\text{изл.}}=522$ нм, при возбуждении люминесценции светом ртутной лампы со светофильтром УФС-2 ($\lambda_{\text{возб.}}=365$ нм).

Аналогично готовят пробы со второй добавкой по содержанию в два раза превышающей первую.

Содержание морина в пробе рассчитывают по методу добавок по формуле:

$$C_x = C_{\text{доб.}} \cdot I_x / I_{x+\text{доб.}} - I_x,$$

где C_x — содержание морина в пробе,

$C_{\text{доб.}}$ — концентрация добавки,

I_x — интенсивность люминесценции пробы без добавки,

$I_{x+\text{доб.}}$ — интенсивность люминесценции пробы с добавкой.

Результаты определения рутина проверены методом «введено-найдено» и показана правильность разработанной методики.

Результаты определения морина в экстрактах растительного сырья приведены в табл.1. Как видно из таблицы наибольшее содержание морина обнаружено в экстракте зверобоя.

Таблица 1

Результаты определения морина в растительном сырье

Растительное сырье	Найдено мг/г сухого продукта	Sr
Зверобой	21	0,030
Чабрец	15	0,041
Цветы липы	3,2	0,049
Листья шелковицы	0,147	0,059
Виноград розовый «Изабелла»	0,014	0,065

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

Литература

1. Кочетова М. В., Семеновская Е. Н., Ларионов О. Г., Ревина А. А. Определение биологически активных фенолов и полифенолов в различных объектах методами хроматографии // Успехи химии. — 2007. — Т. 76, № 1. — С. 89—100.
2. Бурлакова Е. Б. Биоантиоксиданты // Рос. хим. журн. — 2007. — Т. LI, № 1. — С. 3—12.
3. Будников Г. К., Зиятдинова Г. К. Антиоксиданты как объекты биоаналитической химии // Журн. аналит. химии. — 2005. — Т. 60, № 7. — С. 678—691.
4. Зиятдинова Г. К., Будников Г. К. Определение флавонолов в фармпрепаратах методом вольтамперометрии // Химико-фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 10. — С. 54—56.

5. Слеченко Т. Б., Анисимова Л. С., Слеченко В. Ф., Михеева Е. В., Пикула Н. П. Контроль качества биологически активных добавок методами вольтамперометрии. Определение витаминов В1, В2, С, Е и кверцетина // Химико-фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 54—56.
6. Мечикова Г. Я., Степанова Т. А., Загузова Е. В. Количественное определение суммы фенольных соединений в листьях земляники // Химико-фарм. журн. — 2007. — Т. 41, № 2. — С. 38—41
7. Жукова О. Л., Абрамов А. А., Даргаева Т. Д., Маркарян А. А. Изучение фенольного состава подземных органов сабельника болотного // Вестн. Моск. Ун-та. — 2006. — Т. 47, № 5. — С. 342—345 .
8. Рубенчиков Р.А., Гончаров Н.Ф. Изучение состава фенольных соединений фиалки полевой методом ВЭЖХ // Химико-фарм. журн. — 2005. — Т. 39, № 3. — С. 31—32.
9. Wang L. — H., Li W. — H. General method for determination flavonoids in medical plants and raw cosmetic using HPLS with a photodiode array detector // Химико-фарм. журн. — 2007. — Т. 41, № 4. — С. 46—51.
10. Алексеева М. А., Эллер К. И., Арзамасцев А. П. Определение полифенольных компонентов хмеля с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ // Химико-фарм. журн. — 2004. — Т. 38, № 12. — С. 39—41.
11. Бенефис Р., Радусене И., Якитас В., Янулис В., Пуоджюнене Г., Милаштыс А. Количественное определение фенольных соединений в лекарственном сырье тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ // Химико-фарм. журн. — 2008. — Т. 42, № 3. — С. 51—55.

С. В. Бельтюкова, Г. О. Бичкова

Одеська національна академія харчових технологій,
кафедра хімії та безпеки харчових продуктів
вул. Канатна, 112, Одеса, 65039, Україна

**СОРБЦІЙНО-ЛЮМІНЕСЦЕНТНЕ ВИЗНАЧЕННЯ МОРИНУ
У РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ**

Резюме

Розроблена методика визначення морину, яка заснована на використанні власної твердофазної люмінесценції морину, посиленої в присутності скандію (III). Межа визначення морину на сорбенті становить $5 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Ключові слова: морин, скандій (III), люмінесценція, рослинна сировина.

S. V. Belyukova, A. A. Bytchkova

Odessa National Academy of Food Technologies
Faculty of Chemistry and Safety of Foodstuff
Kanatna, 112, Odessa, 65039

**SORPTION-LUMINESCENT DETERMINATION OF MORIN IN
VEGETATIVE RAW MATERIALS**

Summary

A spectrofluorimetric method for determination of morin was developed. The method is based on the luminescence of morin enhanced by scandium (III). The detection limit is $5 \cdot 10^{-8}$ M morin.

Key words: morin, scandium (III), luminescent, vegetative raw materials.