

# ХІМІЯ

УДК 543.4:543.8

Запорожець О. А., Крушинська О. А.

## КОМБІНОВАНЕ СПЕКТРОСКОПІЧНЕ І ТЕСТ-ВИЗНАЧЕННЯ ІНТЕГРАЛЬНИХ ПОКАЗНИКІВ ЯКОСТІ ПРЕПАРАТІВ З АНТИОКСИДАНТНОЮ АКТИВНІСТЮ

*Для оцінки інтегральних показників якості препаратів з антиоксидантною активністю запропоновано методологічні підходи до розробки та застосування тест-систем на основі хелатних комплексів  $Cu(II)$  і  $Fe(III)$ , адсорбованих на кремнеземних матрицях.*

Сьогодні у світі зростає популярність харчових продуктів та лікарських препаратів природного походження з високою біологічною активністю. Для ідентифікації органічних компонентів та контролю якості препаратів, як правило, застосовують хроматографічні методи. Дослідження показали, що загальна ефективність лікарської рослини не завжди корелює із сумарним ефектом її складових, що зумовлено синергетичною дією останніх. В аналітичній хімії фітопрепаратів нині зростає тенденція для оцінки їхньої якості використовувати інтегральні показники, зокрема загальну антиоксидантну активність. Під цим терміном розуміють здатність природного матеріалу нейтралізувати шкідливу дію вільних радикалів, що утворюються у живих організмах внаслідок старіння, радіаційного опромінення, іншого негативного впливу довкілля. Антиоксидантна активність препарату визначається вмістом у ньому природних органічних відновників - антиоксидантів. З наукової літератури відомий широкий асортимент інструментальних методів визначення таких сполук, у тому числі флуориметричні, хроматографічні, електрохімічні, ензимні. Однак переважна більшість з них вимагає залучення спеціального обладнання та висококваліфікованого персоналу, а отже, характеризується високою собівартістю аналізу. При цьому лише незначна частка методів придатна для оцінки інтегральних показників якості. Тому розробка простих, але водночас надійних методів оцін-

ки загальної антиоксидантної активності препаратів природного походження є актуальною проблемою сучасної аналітичної хімії.

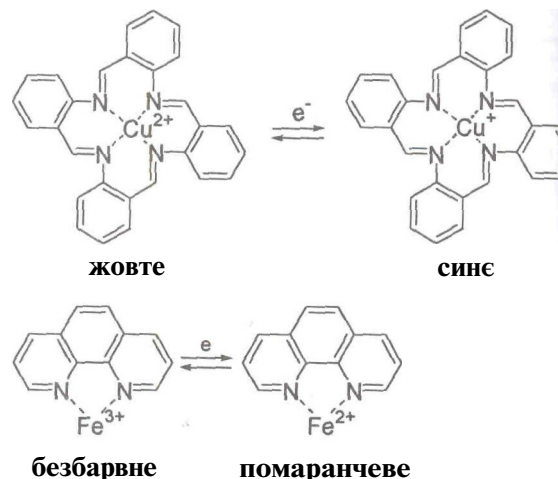
Спектрофотометрія і сьогодні залишається найбільш придатним фізико-хімічним методом для контрольної-аналітичних лабораторій завдяки високій чутливості, відтворюваності, доступності апаратного забезпечення та простоті виконання. Підвищення чутливості методу досягається комбінуванням його з екстракційним та сорбційним концентруванням. При цьому з точки зору екобезпечності перевага надається сорбційно-спектрофотометричним методам. Такі методи можна поділити на чотири групи. Перша група ґрунтується на вилученні визначуваної речовини твердим носієм з наступним вимірюванням власного поглинання аналіту [1; 2]. Низька вибірковість цих методів унеможлиблює застосування їх для оцінки інтегральних показників. Друга і третя групи сорбційно-спектрофотометричних методів базуються на відновленні під дією антиоксидантів іонів металів до нижчих ступенів окислення або руйнуванні іонних асоціатів з наступним вилученням і детектуванням їх у вигляді забарвлених продуктів [3-5]. В основі четвертої групи методів лежить взаємодія визначуваної сполуки з реагентом, закріпленим на поверхні сорбенту [6-12]. В останньому випадку іммобілізований хромофорний реагент використовується у вигляді вже готової аналітичної форми. Саме такі твердофазні редокс-реагенти найбільшою мірою відпові-

дають й іншим вимогам, що висуваються до тест-методів, а саме експресності, одностадійності, відсутності потреби у складному обладнанні та висококваліфікованому персоналі.

Метою даної роботи було розробити алгоритм створення тест-систем, придатних для визначення антиоксидантної активності біологічно активних препаратів.

Аналіз наукової літератури показав, що найбільш чутливими фотометричними реагентами для визначення антиоксидантів у розчині є хелатні комплекси металів, здатних змінювати свій ступінь окислення. Так, відомі методи визначення індивідуальних органічних відновників, зокрема аскорбінової кислоти [13-27], а також загальної антиоксидантної активності [28], що базуються на реакціях відновлення Fe(III) [13-25] або Cu(II) [26; 27] з наступним детектуванням утворених іонів Fe(II) або Cu(I) у розчині. Тому як реагенти-модифікатори нами було обрано стійкі, розчинні у воді комплекси купруму(II) з тетрабензотетраазаціклогексадецином та феруму(III) з о-фенантроліном. Вибір кремнеземної матриці зумовлений її хімічною та механічною стійкістю, відсутністю набухання, задовільними кінетичними властивостями [29]. Для отримання твердофазних реагентів застосували високодисперсний мезопористий силікагель з розміром часток 100-250 мкм (СГ). Імобілізацію комплексу Cu(II) на поверхні матриці здійснювали адсорбцією тетрабензотетраазаціклогексадецинкупруму(II) (СП) з водних розчинів при рН 5-7. Фенантролінферум (III) на поверхні СГ (СГ2) отримували обробкою розчином Fe(III) при рН 2,6-2,8 кремнезему, модифікованого фенантроліном. Одержані таким чином твердофазні редокс-реагенти стійкі при зберіганні у сухому стані впродовж одного року.

Взаємодія іммобілізованих реагентів з відновниками супроводжується контрастною зміною забарвлення:



Тому як метод детектування було обрано твердофазну спектрофотометрію. Власне поглинання сорбенту визначали методом гетерохроматичної екстраполяції (двох довжин хвиль). Як аналітичний сигнал застосовували [30]:

$$\Delta A = (A'_{\max} - A'_{\min}) - (A''_{\max} - A''_{\min}),$$

де  $A'_{\max}$  та  $A''_{\max}$  - поглинання модифікованого сорбенту при  $\lambda_{\max}$  у присутності та за відсутності аналіту відповідно;  $A'_{\min}$  та  $A''_{\min}$  - поглинання при  $\lambda_{\min}$  у присутності та за відсутності аналіту відповідно.

Для порівняння хіміко-аналітичних властивостей розроблених твердофазних реагентів як модельну сполуку використали широковживаний антиоксидант - аскорбінову кислоту (Asc).

Перевірка метрологічних характеристик розроблених методів при аналізі стандартних розчинів і лікарських засобів показала, що вони характеризуються задовільними правильністю (результати визначення контролювали стандартним методом) та відтворюваністю. Неорганічні відновники, зокрема сульфіти, не заважають визначенню.

З табл. 1 видно, що СП характеризується кращими порівняно з СГ2 властивостями, а саме

Таблиця 1. Основні хіміко-аналітичні характеристики розроблених методів твердофазно-спектрофотометричного визначення аскорбінової кислоти

Характеристика методів	СП	СГ2
Оптимальні умови визначення:		
діапазон рН	9,0-9,6	4,2-4,8
час контактування фаз, хв	5	15
максимальне співвідношення $V/m$	500	100
Рівняння градуувального графіка у координатах $\Delta A = f(C_{Asc})$ , мг/л	$(0,05 \pm 0,01) + (1,87 \pm 0,06) \cdot 10^{-2}C$	$(-0,04 \pm 0,01) + (0,034 \pm 0,001)C$
Коефіцієнт регресії, $r$	0,998	0,993
Діапазон лінійності градуувального графіка, мг/л	1-40	1-12
Межа виявлення, мг/л	0,06	0,9

вищою чутливістю, ширшим діапазоном лінійності градуовального графіка, меншою тривалістю аналізу. Крім того, СП взаємодіє з природними органічними антиоксидантами із слабшою, ніж у ASC, відновлювальною здатністю. Тому саме цей реагент було застосовано для оцінки придатності твердофазних реагентів для визначення загальної антиоксидантної активності матеріалів рослинного походження. Результати наведено на рис. 1.

На цьому рисунку показано, що загальна антиоксидантна активність препаратів ехінацеї (у перерахунку на кверцетин) добре корелює із вмістом похідних гідроксикоричної кислоти (ПГК), які значною мірою забезпечують імуномодулюючу дію ехінацеї. Це може свідчити про придатність розробленої тест-системи для оцінки інтегрального показника якості препаратів з антиоксидантною активністю.

Запропонований алгоритм створення тест-систем для визначення антиоксидантної активності, представлений на рис. 2, виявився досить ефективним. Аналіз даних наукової літератури [3; 4; 6; 8; 9; 17; 19] показав, що розроблені із

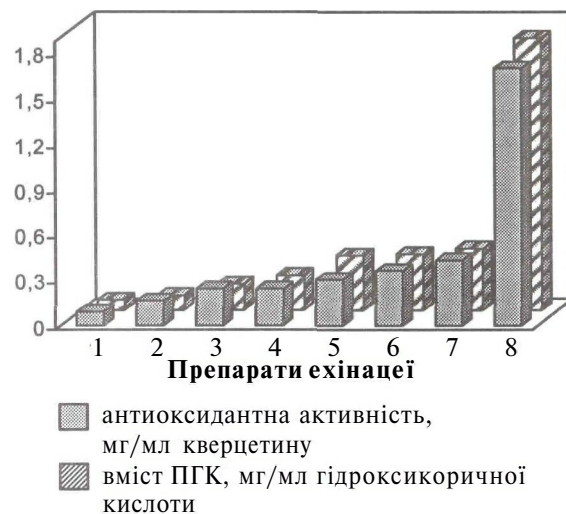


Рис. 1. Антиоксидантна активність та вміст похідних гідроксикоричної кислоти (ПГК) у водно-спиртових препаратах ехінацеї різних виробників (у перерахунку на кверцетин)

застосуванням такого підходу методики за своїми метрологічними характеристиками не поступаються кращим аналогам.

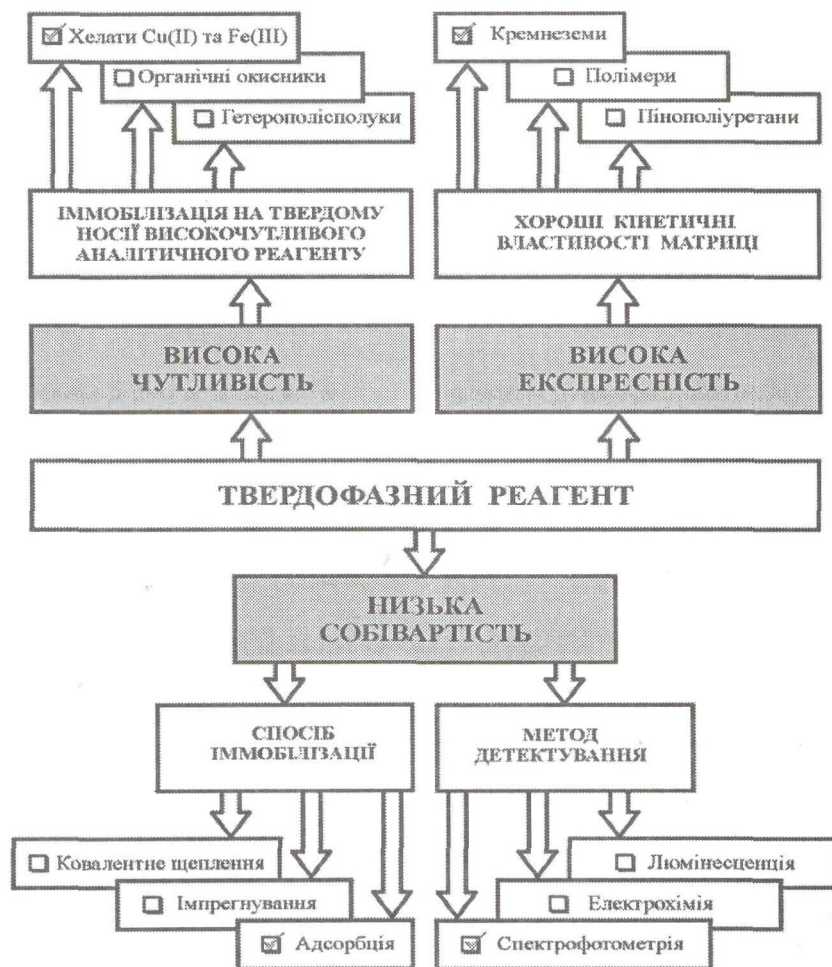


Рис. 2. Основні етапи розробки тест-систем для визначення антиоксидантів

1. *Molina-Diaz A. M., Ruiz-Medina A. Я, Cordova M. L. F. de* // Fresenius J. of Anal. Chem.- 1999- V. 363.- № 1- P. 92-97.
2. *Femandes J. C. B., Neto G. D., Kubota L. T.* // Analytica Chimica Acta.- 1998.-V. 366.-№ 1-3.-P. 11-22.
3. *Barrales P. O., Cordova M. L. F. de, Diaz A. M.* // Analytica Chimica Acta- 1998.- V. 360-№ 1-3- P. 143-152.
4. *Pereira A. У., Fatibello O.* // Analytica Chimica Acta- 1998.- V. 366-№ 1-3- P. 55-62.
5. *Марченко Д. Ю., Моросанова Е. И., Кузьмин Н. М., Золотое Ю. А.* // Журн. аналит. хим.- 1997.- Т. 52- № 12- С. 1287-1291.
6. *Дмитриенко С. Г., Гончарова Л. В., Рунов В. К.* // Журн. аналит. хим.- 1998.- Т. 53.- № 9.- С. 914-918.
7. *Запорожец О. А., Крушинская Е. А., Литовская Н. А., Сухан В. В.* // Журн. аналит. хим.- 2001.- Т. 56.- № 6.- С. 591-596.
8. *Моросанова Е. И., Марченко Д. Ю., Золотое Ю. А.* // Журн. аналит. хим.-2000.-Т. 55,-№ 1.-С. 86-92.
9. *Моросанова Е. И., Резникова Е. А., Великородный А. А.* // Журн. аналит. хим.-2001.-Т. 56-№2.-С. 195-200.
10. *Merckquant E.* Merck. Darmstadt, 2000.
11. *Schweidt G.* // Dtsch. Lebensch.-Rdsch.- 1986.- V. 82.-№4.- P. 111-116.
12. *Lenarczuk T., Glab S., Koncki R.* // J. Pharm. Biomed. Anal- 2001,-V. 26.-№ 1.-P. 163-169.
13. *Arya S. P., Mahajan M.* // Mikrochimica Acta-1997-V. 127.- № 1-2,- P. 45-49.
14. *Arya S. P., Mahajan M., Jain P.* // Chem. Anal- 1998- V. 43.- Xs 2- P. 231-239.
15. *Arya S. P., Mahajan M.* // Anal. Sci- 1996- V. 12- № 6.- P. 941-945.
16. *Ferreira S. L. C., Bandeira M. L. S. E., Lemos V. A.* // Fresenius J. of Anal. Chem.- 1997- V. 357- № 8- P. 1174-1178.
17. *Koch S., Peisker S.* // J. Chem- 1990.-V. 30.-№5-P. 184-185.
18. *Yamane T., Ogawa T.* // Бунсэки кагаку- 1987.-Т. 36.-Xs 10- C. 625-628.
19. *Besada A.* // Talanta.- 1987- V. 34- № 8.- P. 731-732.
20. *Molina-Diaz A., Ortega-Carmona L., Pascual-Reguera M. I.* // Talanta.- 1998.- V. 47.- № 3.- P. 531-536.
21. *Teshima N., Nobuta T., Sakai T.* // Anal. Chim. Acta.- 2001- V. 438,- № 1-2.- P. 21-29.
22. *Fujita K, Mori /., Yamaguchi T., Hoshino M., Shigemura K, Shimano M.* // Anal. Sci.- 2001- V. 17.- № 7.- P. 853-857.
23. *Themelis D. G., Tzanavaras P. D., Kika F. S.* // Talanta.- 2001.- V. 55.-№ 1.-P. 127-134.
24. *Kleszczewski T., Kleszczewska E.* // J. Pharm. Biomed. Anal.- 2002- V. 29.- P. 755-759.
25. *Pereira A. V., Fatibello-Filho O.* // Talanta.- 1998.- V. 47.- P. 11-18.
26. *Baker W. L., Lowe T.* // Analyst- 1985- V. 110.- № 10- P. 1189-1191.
27. *Tutem E., Ulkuseven B., Apak R.* // Anal. Lett.- 1992- V. 25.- № 3 - P. 471-483.
28. *Benzie I. F. F., Szeto Y. T.* // J. Agric. Food Chem.- 1999.- V. 47.- P. 633-636.
29. *Запорожец О. А., Гавер О. М., Сухан В. В.* // Успехи химии- 1997- Т. 66.- № 7,- С. 637-646.
30. *Брыкина Г. Д., Марченко Д. Ю., Шнигун О. А.* // Журн. аналит. хим.- 1995.- Т. 50.-№ 5-С. 484-491.

*O. Zaporozhets, O. Krushynska*

## HYPHENATED SPECTROSCOPIC AND TEST DETERMINATION OF QUALITY PARAMETERS OF THE PRODUCTS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY

*Methodological approaches to the elaboration of the test-systems based on Cu(II) and Fe(III) chelates adsorbed on silica matrices, and their application for the evaluation of antioxidant products quality, are proposed.*