

УДК 543.42.062

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЛАВОНОИДОВ ПО РЕАКЦИИ АЗОСОЧЕТАНИЯ С ТЕТРАФТОРОБОРАТОМ 4-НИТРОФЕНИЛДИАЗОНИЯ

В.А. Кудринская, С.Г. Дмитриенко, Ю.А. Золотов

(кафедра аналитической химии; e-mail: dmitrienko@analyt.chem.msu.ru)

В качестве реагента для спектрофотометрического определения флавоноидов предложен тетрафтороборат 4-нитрофенилдиазония (4-НФД). Показано, что в щелочной среде 4-НФД вступает в реакцию азосочетания с кверцетином, нарингенином, хризинном, морином, рутином и нарингином с образованием окрашенных в желто-оранжевый цвет продуктов. Оптимизированы условия проведения спектрофотометрической реакции. Разработана методика спектрофотометрического определения флавоноидов с пределами обнаружения $(1,5 - 3,9) \times 10^{-7}$ М (0,05 – 0,16 мкг/мл). Проведено определение кверцетина в лекарственных препаратах.

Ключевые слова: флавоноиды, тетрафтороборат 4-нитрофенилдиазония, азосочетание, спектрофотометрическое определение.

Флавоноиды – широко распространенные природные антиоксиданты. Они содержатся во многих растениях [1–4], в чае, пиве, соках, винах [5–9]. Флавоноиды оказывают многостороннее воздействие на организм человека. Они обладают противовоспалительным, антигистаминным, антиоксидантным, противоопухолевым и противораковым действием, стабилизируют клеточные мембраны, тормозят процессы старения, положительно влияют на функцию сердечно-сосудистой системы [10, 11], поэтому их вводят в состав многих биологически активных добавок (БАД) и некоторых лекарственных препаратов [1, 3, 12–14].

Для определения флавоноидов используют спектроскопические [12–21], хроматографические [2, 3, 5, 6, 8, 9], электрохимические [22–27], кинетические [28] методы анализа и капиллярный электрофорез [6, 29]. Наиболее простым и удобным в использовании является спектрофотометрический метод, который, в отличие от остальных, не требует дорогостоящего оборудования. Согласно “Руководству по методам контроля качества и безопасности биологически активных добавок к пище” (Р 4.1.1672-03 от 30.06.2003) производные флавоноидов (кверцетин, рутин, морин и хризин) определяют спектрофотометрическим методом в виде комплексов с алюминием ($\lambda = 415$ нм), а производные флаванов (нарингенин и нарингин) – в виде продуктов их взаимодействия с 2,4-динитрофенилгидразином ($\lambda = 495$ нм). При этом в БАД обычно регламентируется суммарное содержание производных

либо флавоноидов, либо флаванов. Недостатком этого подхода является невозможность одновременного определения суммарного содержания производных флавоноидов и флаванов. Поэтому представляется важным разработка новых методик определения этих соединений при совместном присутствии, которые позволили бы определять их суммарное содержание при проведении реакции с одним дериватизирующим реагентом.

В настоящей работе в качестве реагента для спектрофотометрического определения флавоноидов предложен тетрафтороборат 4-нитрофенилдиазония (4-НФД). Ранее этот реагент использовали для спектрофотометрического определения различных ароматических аминов и фенолов [15]. Основная цель работы заключалась в изучении возможности использования 4-НФД в качестве реагента для спектрофотометрического определения флавоноидов.

Экспериментальная часть

Объекты исследования, реагенты и аппаратура. Объектами исследования служили кверцетин (дигидрат, “Sigma”, 98%), нарингенин (“Acros”, 97%), морин (гидрат, “Acros”), хризин (“Acros”, 99%), рутин (“Acros”, 97%) и нарингин (“Acros”, 97%). Исходные 0,001–0,01 М растворы этих соединений готовили растворением их точных навесок в ацетоне (кверцетин, нарингенин, хризин) или этаноле (рутин, морин, нарингин). Рабочие растворы готовили разбавлением исходных непосредственно

перед использованием. В качестве дериватирующего реагента использовали 4-НФД, который синтезировали по методике, приведенной в [15]. Исходный раствор 4-НФД ($1,25 \times 10^{-2}$ М) готовили растворением точной навески реагента в воде. Карбонат натрия (“ч.д.а.”), ацетон (“ч.”), этанол (“х.ч.”) и другие вещества, использованные в работе, не подвергали дополнительной очистке.

Спектры поглощения и оптическую плотность растворов регистрировали на спектрофотометре “СФ-103” (“Аквилон”, Россия).

Результаты и их обсуждение

Оптимизация условий реакции азосочетания флавоноидов с 4-НФД

Предварительное переведение органических соединений в производные с целью усиления интенсивности окраски – известный прием в аналитической химии. В ряде случаев это позволяет существенно повысить чувствительность их определения.

Известно, что фенолы легко вступают в реакции азосочетания с ароматическими солями диазония с образованием интенсивно окрашенных продуктов. В большинстве случаев при выполнении определений раствор диазосоставляющей прибавляют к раствору определяемого фенола (азосоставляющей). Сочетание проводят при pH 7–9 [15]. В качестве диазосоставляющих при спектрофотометрическом определении различных фенолов особенно часто используют диазотированные сульфаниловую кислоту и 4-нитроанилин, в частности тетрафтороборат 4-нитрофенилдиазония. Достоинствами 4-НФД являются его устойчивость в твердом виде и водных растворах, высокая скорость протекания реакции азосочетания и интенсивная окраска образующихся азосоединений.

В настоящей работе оценена возможность аналитического применения азосоединений флавоноидов в фотометрическом анализе. Наличие в молекулах флавоноидов фенольных групп обуславливает возможность их участия в реакциях азосочетания в качестве азосоставляющей. Однако реакцию взаимодействия тет-

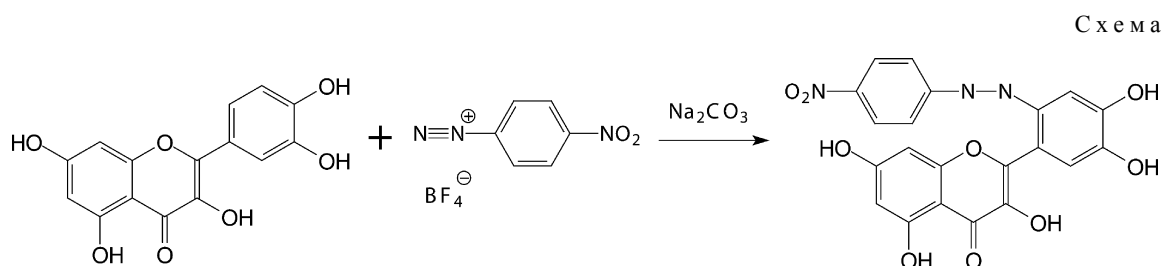
рафторобората 4-нитрофенилдиазония с флавоноидами ранее не изучали.

Реакцию азосочетания флавоноидов с 4-НФД проводили в щелочной среде. О выходе продукта реакции судили по величине оптической плотности раствора. Добавление 4-НФД к растворам кверцетина и других флавоноидов сопровождалось быстрым усилением окраски и появлением оранжевого оттенка у растворов. В спектрах поглощения наблюдалось возникновение новой интенсивной полосы поглощения с максимумом при 425–435 нм в зависимости от природы флавоноида (рис. 1). Это свидетельствует о протекании реакции азосочетания флавоноидов с 4-НФД и об образовании соответствующих окрашенных азосоединений. Установлено, что максимальный выход азосоединений достигается в течение 5 мин. Образующиеся азосоединения устойчивы в водном растворе по крайней мере в течение 1 ч после получения. По аналогии с известными литературными данными о механизме взаимодействия фенолов с солями диазония [15] можно предположить, что флавоноиды вступают во взаимодействие с 4-НФД в соответствии со схемой (на схеме в качестве примера азосоставляющей приведен кверцетин).

В связи с наличием в молекуле нескольких реакционноспособных центров для каждого из флавоноидов возможно образование ряда продуктов азосочетания с близкими оптическими характеристиками.

С целью выбора оптимальных условий проведения реакции азосочетания на примере взаимодействия кверцетина с 4-НФД было изучено влияние концентраций карбоната натрия и 4-НФД (рис. 2) на выход продукта азосочетания и оптическую плотность раствора. Концентрацию 4-НФД выбрали равной $1,5 \cdot 10^{-3}$ М. В этом случае максимальный выход продукта имеет место при $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) > 0,2$ М, поэтому в дальнейшем реакцию азосочетания проводили при $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,2$ М, при этом время развития окраски реакционной смеси составляло около 5 мин.

В табл. 1 приведены значения молярных коэффициентов поглощения флавоноидов и их азосоединений в



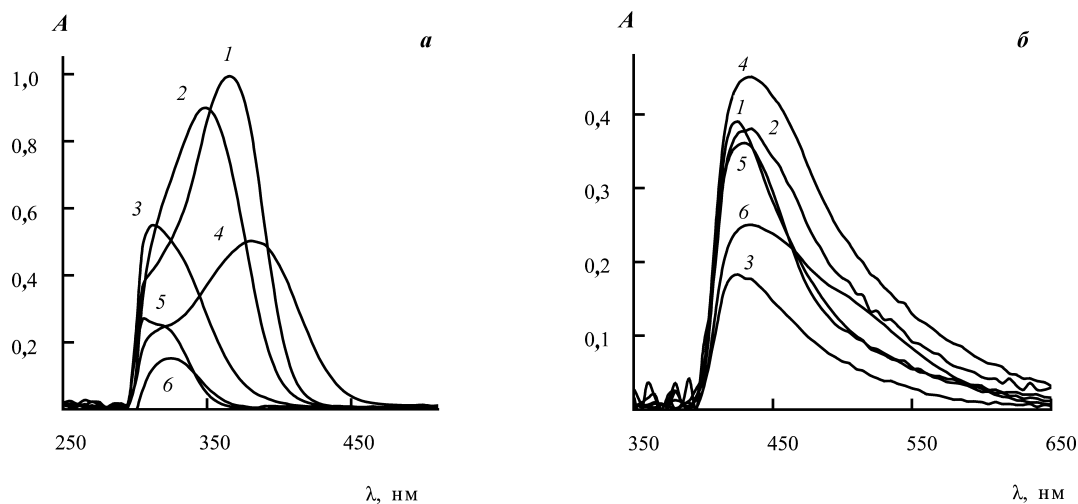


Рис. 1. Спектры поглощения: *а* – флавоноидов ($c = 5 \times 10^{-5}$ М, растворитель – ацетон:вода = 1:4); *б* – продуктов их взаимодействия с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония ($c = 10^{-5}$ М, водный раствор, $c_{4\text{-НФД}} = 1,5 \times 10^{-3}$ М, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,2$ М), 1 – кверцетин, 2 – рутин, 3 – хризин, 4 – морин, 5 – нарингенин и 6 – нарингин

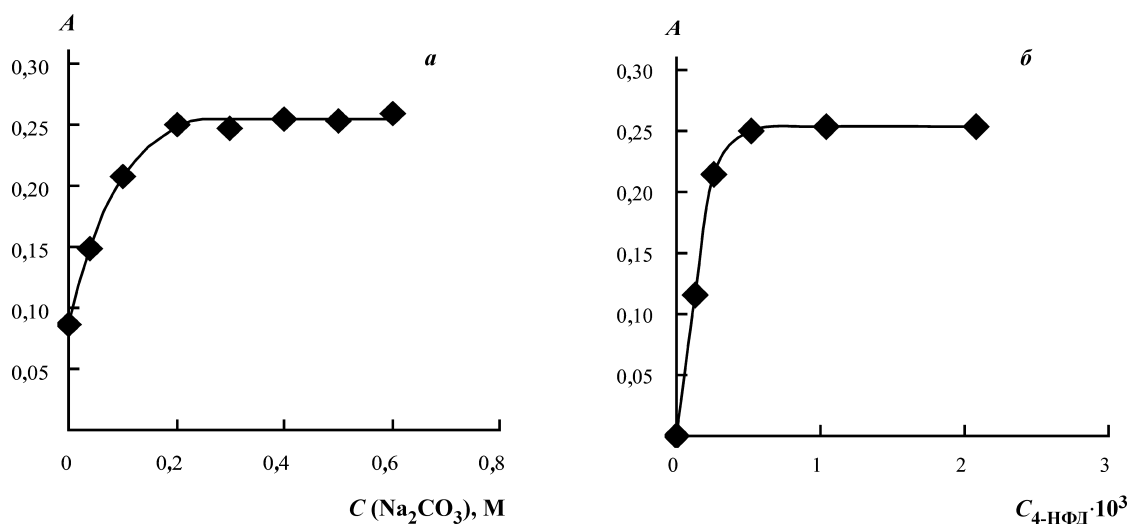


Рис. 2. Зависимость оптической плотности продукта азосочетания кверцетина с тетрафторборатом 4-нитрофенилдиазония от концентрации: *а* – карбоната натрия ($c_{4\text{-НФД}} = 1,5 \times 10^{-3}$ М); *б* – тетрафторбората 4-нитрофенилдиазония ($c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,2$ М), $c_{\text{кверц.}} = 6 \times 10^{-6}$ М, $\lambda_{\text{макс}} = 425$ нм

оптимальных условиях. Максимумы поглощения в спектрах азосоединений флавоноидов находятся при 425–435 нм в зависимости от природы флавоноида, а значения молярных коэффициентов поглощения – в диапазоне $(1,8\text{--}4,5) \times 10^4$ л·моль⁻¹·см⁻¹ и превышают молярные коэффициенты поглощения исходных флавоноидов в 2–10 раз.

Методика определения флавоноидов

Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, содержащих от 2×10^{-6} до 2×10^{-5} М флавоноида. К каждому раствору добавляли последовательно по 5 мл 1 М раствора карбоната натрия,

3 мл $1,25 \times 10^{-2}$ М раствора 4-НФД и воду до объема 25 мл. Измеряли оптическую плотность растворов при 425–435 нм в зависимости от природы флавоноида. Метрологические характеристики методик определения приведены в табл. 2. Пределы обнаружения, рассчитанные по 3S-критерию, составляют 0,06; 0,05; 0,1; 0,12; 0,05 и 0,16 мкг/мл для кверцетина, нарингенина, хризина, рутина, морина и нарингина соответственно. Как следует из вышесказанного, методика не уступает по чувствительности другим известным спектрофотометрическим методикам определения флавоноидов [12, 17–20] и позволяет определять эти вещества на уровне $(1,5\text{--}3,9) \times 10^{-7}$ М или 0,05–

0,16 мкг/мл; методика отличается простотой и экспрессностью. Правильность спектрофотометрических методик определения отдельных флавоноидов была проверена методом “введено – найдено” на модельных растворах (табл. 3).

Определение кверцетина в лекарственных препаратах

Для оценки возможности практического применения методики проведено определение кверцетина в лекарственных препаратах “Липофлавон”, “Корвитин” и “Кверцетин”.

Препарат “Липофлавон” применяется в офтальмологии. “Липофлавон” производства ЗАО “Биолек”, г. Харьков, Украина, представляет собой лиофилизированный порошок для приготовления глазных капель – аморфную массу светло-желтого цвета с характерным запахом. Форма выпуска препарата – смесь 27,5 мг лецитина, 0,75 мг кверцетина и лактозы во флаконе № 1 и 0,9%-й изотонический раствор хлори-

Т а б л и ц а 1

Значения молярных коэффициентов поглощения флавоноидов (растворитель – ацетон:вода = 1:4) и их азосоединений (водный раствор, $c_{4-НФД} = 1,5 \times 10^{-3}$ М, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,2$ М)

Вещество	Молярный коэффициент поглощения, $\epsilon_{\text{макс}}$ ($\lambda_{\text{макс}}$, нм), л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹	
	флавоноид	азосоединение
Кверцетин	$2,0 \times 10^4$ (365)	$3,9 \times 10^4$ (425)
Нарингенин	$5,4 \times 10^3$ (305)	$3,5 \times 10^4$ (430)
Хризин	$1,1 \times 10^4$ (315)	$1,8 \times 10^4$ (425)
Рутин	$1,8 \times 10^4$ (350)	$3,8 \times 10^4$ (430)
Морин	$1,0 \times 10^4$ (380)	$4,5 \times 10^4$ (435)
Нарингин	$3,0 \times 10^3$ (325)	$2,5 \times 10^4$ (435)

да натрия во флаконе № 2. Поскольку лецитин и лактоза не вступают в реакцию азосочетания с 4-НФД, то предварительного выделения кверцетина из препа-

Т а б л и ц а 2

Метрологические характеристики спектрофотометрических методик определения флавоноидов с тетрафтороборатом 4-нитрофенилдиазония, $c_{4-НФД} = 1,5 \times 10^{-3}$ М, $c(\text{Na}_2\text{CO}_3) = 0,2$ М, ДОС – диапазон определяемых содержаний, $C_{\text{мин}}$ – предел обнаружения

Определяемое вещество	Уравнение градуировочного графика (мМ)	ДОС, М (мкг/мл)	$C_{\text{мин}}$, М (мкг/мл)
Кверцетин	$y = 38,8 c$	$5,4 \times 10^{-7} - 1,6 \cdot 10^{-5}$ (0,18 – 5,41)	$1,8 \cdot 10^{-7}$ (0,06)
Нарингенин	$y = 34,7 c$	$6,0 \times 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$ (0,16 – 3,27)	$2,0 \cdot 10^{-7}$ (0,05)
Хризин	$y = 17,8 c$	$11,7 \times 10^{-7} - 1,6 \cdot 10^{-5}$ (0,30 – 4,07)	$3,9 \cdot 10^{-7}$ (0,1)
Рутин	$y = 38,1 c$	$5,5 \times 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$ (0,36 – 7,97)	$1,8 \cdot 10^{-7}$ (0,12)
Морин	$y = 45,1 c$	$4,6 \times 10^{-7} - 1,2 \cdot 10^{-5}$ (0,14 – 3,63)	$1,5 \cdot 10^{-7}$ (0,05)
Нарингин	$y = 24,6 c$	$8,4 \times 10^{-7} - 1,6 \cdot 10^{-5}$ (0,49 – 9,29)	$2,8 \cdot 10^{-7}$ (0,16)

Т а б л и ц а 3

Проверка правильности методики определения флавоноидов методом “введено-найденно” ($n = 3, P = 0,95$).

Определяемое вещество	МКГ/МЛ		s_r
	введено	найденно	
Кверцетин	2,7	2,9±0,4	0,05
Нарингенин	1,6	1,6±0,1	0,03
Хризин	1,5	1,6±0,2	0,04
Рутин	4,0	3,9±0,3	0,03
Морин	1,8	1,9±0,2	0,04
Нарингин	3,5	3,7±0,5	0,05

рата не требовалось. Лекарственную форму (0,0307 г порошка “Липофлавона” – содержимое флакона № 1) растворяли в 2,5 мл ацетона с добавлением 0,1 мл 1 М раствора карбоната натрия и воды до объема 25 мл. Для определения брали аликвотную часть этого раствора. Методом градуировочного графика найдено, что в лекарственном препарате содержится 0,7±0,1 мг кверцетина ($s_r = 0,05$), что согласуется с данными, заявленными производителем (0,75 мг на 1 флакон № 1).

Лекарственный препарат “Корвитин” применяется в кардиологии. “Корвитин” (ЗАО НПЦ “Борщаговский химико-фармацевтический завод”, г. Киев, Украина), представляет собой лиофилизированный порошок для приготовления раствора для инъекций. Форма выпуска препарата – смесь 0,5 г корвитина с гидроксидом натрия. Корвитин является комплексом кверцетина с повидоном (поливинилпирролидоном), 0,5 г корвитина содержат 0,05 г кверцетина в пересчете на безводное вещество и 0,45 г повидона с молекулярной массой 7100–11000 в пересчете на безводное вещество. Лекарственную форму (0,01 г порошка “Корвитина”) растворяли в 5 мл ацетона с добавлением воды до объема 50 мл. Для определения брали аликвотную часть этого раствора. Методом градуировочного графика найдено, что в лекарственном препарате содержится 0,052±0,003 г кверцетина ($s_r = 0,03$). Это согла-

суется с данными, заявленными производителем (0,05 г на 1 флакон).

Лекарственный препарат “Кверцетин” применяется для лечения воспалений. “Кверцетин” (ЗАО НПЦ “Борщаговский химико-фармацевтический завод”, г. Киев, Украина) представляет собой гранулы желтого цвета с зеленоватым оттенком для приготовления геля или суспензии, содержащие смесь кверцетина с яблочным пектином, глюкозой и сахарозой. Форма выпуска препарата – гранулы в пакетах по 2 г, 100 г гранул содержат 4 г кверцетина. Лекарственную форму (0,025 г гранул “Кверцетина”) растворяли в 5 мл ацетона с добавлением 0,1 мл 1 М раствора карбоната натрия и воды до объема 50 мл. Для определения брали аликвотную часть этого раствора. Методом градуировочного графика найдено, что в лекарственном препарате содержится 3,9±0,4 г кверцетина ($s_r = 0,04$) в пересчете на 100 г препарата, что также согласуется с данными, заявленными производителем (4 г на 100 г гранул).

Таким образом, проведенные исследования показали возможность использования тетрафторобората 4-нитрофенилдиазония в качестве спектрофотометрического реагента для определения флавоноидов. Разработанная методика отличается низкими пределами обнаружения, простотой и хорошей воспроизводимостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия. Ч. 2. Специальная фармацевтическая химия. Пятигорск, 2003. С. 457.
2. Ding X.-P., Qi J., Chang Y.-X., Mu L.-L., Zhu D.-N., Yu B.-Y. // J. Chromatogr. A. 2009. 1216. P. 2204.

3. Mesbah M. K., Khalifa S. I., El-Gindy A., Tawfik K. A. // *Il Farmaco*. 2005. **60**. P. 583.
4. Davis W. B. // *Anal. Chem.* 1947. **19**. P. 476.
5. Tarola A. M., Giannetti V. // *Chromatographia*. 2007. **65**. P. 367.
6. Wang S.-P., Huang K.-J. // *J. Chromatogr. A*. 2004. **1032**. P. 273.
7. Molinelli A., Weiss R., Mizaikoff B. // *J. Agric. Food Chem.* 2002. **50**. P. 1804.
8. Jella P., Rouseff R., Goodner K., Widmer W. // *J. Agric. Food Chem.* 1998. **46**. P. 242.
9. Careri M., Elviri L., Mangia A., Musci M. // *J. Chromatogr. A*. 2000. **881**. P. 449.
10. Manach C., Regerat F., Texier O., Agullo G., Demigne C., Remesy C. // *Nutr. Res.* 1996. **16**. P. 517.
11. Wei B. L., Lu C. M., Tsao L. T., Wang J. P., Lin C. N. // *Planta Med.* 2001. **67**. P. 745.
12. Kuntic V., Pejic N., Micic S., Vukojevic V., Vujuc Z., Malesev D. // *J. Serb. Chem. Soc.* 2005. **70**. P. 753.
13. Pejic N., Kuntic V., Vujuc Z., Micic S. // *Il Farmaco*. 2004. **59**. P. 21.
14. Hassan H. N. A., Barsoum B. N., Habib I. H. I. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1999. **20**. P. 315.
15. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. М., 1970.
16. Baranowska I., Rarog D. // *Talanta*. 2001. **55**. P. 209.
17. Dowd L. E. // *Anal. Chem.* 1959. **31**. P. 1184.
18. Kaushal G. P., Sekhon B. S., Bhatia I. S. // *Mikrochim. Acta [Wien]*. 1979. **1**. P. 365.
19. Barnum D. W. // *Anal. Chim. Acta*. 1977. **89**. P. 157.
20. Kuntic V., Blagojevic S., Malesev D., Radovic Z., Bogavac M. // *Monatshefte Chemie*. 1998. **129**. P. 41.
21. Зельцер Л. Е., Таунов III. Т., Морозова Л. А. // *ЖАХ*. 1981. **36**. P. 1477.
22. Lin X.-Q., He J.-B., Zha Z.-G. // *Sens. Act. B*. 2006. **119**. P. 608.
23. Xiao P., Zhou Q., Xiao F., Zhao F., Zeng B. // *Int. J. Electrochem. Sci.* 2006. **1**. P. 228.
24. Zhang S., Dong S., Chi L., He P., Wang Q., Fang Y. // *Talanta*. 2008. **76**. P. 780.
25. Freitas K. H. G., Medeiros R. A., Fatibello-Filho O. // *Anal. Lett.* 2009. **42**. P. 881.
26. Pedrosa V. A., Malagutti A. R., Mazo L. H., Avaca L. A. // *Anal. Lett.* 2006. **39**. P. 2737.
27. Adam V., Mikelova R., Hubalek J., Hanustiak P., Beklova M., Hodek P., Horna A., Trnkova L., Stiborova M., Zeman L., Kizek R. // *Sensors*. 2007. **7**. P. 2402.
28. Kostic D. A., Mitic S. S., Miletic G. Z. // *J. Serb. Chem. Soc.* 2004. **69**. P. 477.
29. Xu X., Ye H., Wang W., Chen G. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. **53**. P. 5853.

Поступила в редакцию 20.01.10

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF FLAVONOIDS BY THE REACTION WITH (4-NITROPHENYL)DIAZONIUM TETRAFLUOROBORATE

V.A. Kudrinskaya, S.G. Dmitrienko, Yu.A. Zolotov

(Division of Analytical Chemistry)

(4-Nitrophenyl)diazonium tetrafluoroborate (4-NPD) has been suggested as a reagent for the spectrophotometric determination of flavonoids. It has been shown that in alkaline medium 4-NPD enters into the diazotization reaction with quercetin, naringenin, chrysin, morin, rutin and naringin to form peach-coloured products. The conditions for the spectrophotometric reaction have been optimized. Spectrophotometric method for the determination of flavonoids with detection limits $(1.5 - 3.9) \cdot 10^{-7}$ M (0.05 – 0.16 $\mu\text{g/mL}$) has been developed. Quercetin has been determined in some pharmaceutical compositions.

Key words: flavonoids, (4-nitrophenyl)diazonium tetrafluoroborate, diazotization, spectrophotometric determination.

Сведения об авторах: Кудринская Вера Александровна – аспирант кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (vera_d@rambler.ru); Дмитриенко Станислава Григорьевна – профессор кафедры аналитической химии химического факультета, докт. хим. наук (dmitrienko@analyt.chem.msu.ru); Золотов Юрий Александрович – зав. кафедрой аналитической химии химического факультета МГУ, академик (zolotov@analyt.chem.msu.ru).