

УДК 615.074

<https://doi.org/10.37827/ntsh.chem.2023.73.136>

*Дмитро ПОЛЬОВИЙ¹, Наталія ДЕМ'ЯНЮК¹, Анна ДЕМИД¹, Лариса БОЙКО¹,
Григорій ЗАГРИЧУК¹, Олена АКСИМЕНТЬЄВА-КРАСНОПОЛЬСЬКА²*

СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ФЕНОЛЬНИХ ПОХІДНИХ У РОСЛИННИХ ВИТЯЖКАХ

¹*Тернопільський національний медичний університет
імені І.Я. Горбачевського МОЗ України,
вул. Руська 36, 46001 Тернопіль, Україна
e-mail: dpolov1981@gmail.com*

²*Львівський національний університет імені Івана Франка,
вул. Кирила і Мефодія, 6, 79005 Львів, Україна
e-mail: aksimen@ukr.net*

Підвищення попиту на лікарські засоби рослинного походження потребує від спеціалістів практичних навичок з заготівлі, зберігання, переробки та стандартизації лікарської рослинної сировини. Активним компонентом водних витяжок частин рослин у багатьох випадках є фенольні похідні. Запропоновано методику спектрофотометричного дослідження витяжок частин рослин, що містять фенольні похідні, за допомогою спектрофотометра UNICO-1200. З метою пришвидшення аналізу запропоновано внести зміни в програмне керування пристроєм, додати до меню користувача пункти, які дають змогу автоматизувати процес аналізу та розрахунок вмісту фенольних похідних в аналізованій сировині. Одним з елементів автоматизації цієї методики є самостійний пошук максимуму оптичної густини. У цьому випадку алгоритм програми передбачає пошук другої похідної функції оптичної густини від довжини хвилі, $A(\lambda)$, оскільки на максимумі функції друга похідна змінює свій знак. Отримані результати в майбутньому можуть стати основою удосконаленої методики спектрофотометричного визначення фенольних похідних методом добавок.

Keywords: спектрофотометрія, фенольні похідні, рослинна витяжка, мікроконтролер, оптична густина, комплекси феруму, метод добавок.

Протягом багатьох віків рослини використовували як джерело ліків, і сьогодні перевірено понад 70000 видів рослин на їх потенційну користь як лікарських засобів [1–5]. Близько 8 з 10 ліків, які використовують для лікування інфекцій, серцево-судинних захворювань, раку або як імунодепресанти, походять безпосередньо з рослин, або як похідні. З іншого боку, лише приблизно для однієї з 10000 хімічно синтезованих сполук контрольними дослідженнями доведено їх безпечність та ефективність. Навіть на пізніх стадіях клінічних випробувань приблизно кожен другий штучно синтезований лікарський препарат не досягає результату. Відомо багато прикладів синтетичних лікарських засобів, які випускали в комерційний

продаж, але змушені були його припинити протягом тижнів, місяців або років через неприйнятні побічні ефекти. Цей високий ступінь невизначеності призвів до зосередження уваги на хімічних речовинах рослинного походження для створення ліків, особливо тому, що вони вважаються безпечнішими та ефективнішими, ніж синтетичні хімічні речовини [6–8].

Підвищення попиту на лікарські засоби рослинного походження потребує від спеціалістів практичних навичок з заготівлі, зберігання, переробки та стандартизації лікарської рослинної сировини. Активним компонентом водних витяжок частин рослин у багатьох випадках є фенольні похідні [3, 9, 10]. Знання й навички, які стосуються визначення ідентичності лікарської рослинної сировини, яка містить прості феноли та їхні похідні, використовують в практичній діяльності та в процесі заготівлі й аналізу сировини. Поряд з простими фенолами, фенолкарбоновими кислотами і їхніми похідними до цього класу належить велика група природних сполук: кумарини, хромони, флавоноїди, лігнани, ксантони, хінони і дубильні речовини. Фенольні структури трапляються і в інших класах хімічних сполук. Відомі фенольні алкалоїди (морфін), фенольні стероїди (естрадіол), протоалкалоїди (капсаїциноїди) та ін. Підтверджено, що фенольні сполуки – це активні метаболіти, а не кінцеві продукти клітинного обміну, як вважали раніше. Ці дані свідчать про важливу біологічну роль фенольних сполук [9, 10]. Вони трапляються в усіх органах рослин, але більше їх міститься в активно функціонуючих органах – листках, квітках, недозрілих плодах. За хімічною структурою фенольні сполуки поділяють на чотири основні групи: з одним ароматичним ядром, з двома ароматичними ядрами, з хіноновою структурою та полімерні. До групи полімерних фенольних сполук належать таніди (дубильні речовини) і лігнін (С6 С3). Фізико-хімічні властивості та фармакологічна дія фенольних сполук різноманітні, вони характерні для кожної групи [11–15].

Державна Фармакопея України стала невід’ємною частиною нашого фармацевтичного життя, допомагаючи перейти на європейські стандарти якості лікарських засобів [12–14]. В Україні створюється система сертифікації лікарських засобів європейського рівня, постійно підвищується рівень вимог до якості лікарських засобів, видаючи свої доповнення [15].

Для надійного визначення якості лікарських препаратів рослинного походження розробляють уніфіковані методики їх кількісного визначення. Згідно з фармакопеею [12–15] такий аналіз виконують методом спектрофотометрії [14] та тонкошарової хроматографії [15, 16].

Якщо є потреба визначити загальний вміст цього класу речовин, наприклад, для оцінки якості сировини, проводити хроматографічне визначення недоцільно, адже сучасні інструментальні методи дають змогу суттєво пришвидшити і здешевити аналіз. Ми запропонували спектрофотометричне дослідження витяжки рослин за допомогою спектрофотометра UNICO-1200. З метою пришвидшення процесу аналізу запропоновано внести зміни в програмне керування пристроєм, додати до меню користувача пункти, які допоможуть автоматизувати аналіз і розрахунок вмісту фенольних похідних в аналізованій сировині.

Спектрофотометр UNICO-1200 є аналогом спектрофотометрів ULAB-102, КФК-3-01, ПЕ 5400, V-2100, UNICO-2150, SF-120 та багатьох інших [17]. Це недорогі однопроменеві спектрофотометри для діапазону 325–1000 нм (деякі 210–1100 нм). Алгоритм роботи цих спектрофотометрів запрограмовано в програмному коді мікроконтролера. Найчастіше для цього виробники застосовують мікро-

контролери серій MC68HC705P9, ATmega162, STM8S207. Це економні 8-ми бітні мікроконтролери з інтегрованим модулем аналого-цифрового перетворення. Для поліпшення можливостей спектрофотометра ми замінили мікроконтролер на більш продуктивний – 32 бітний STM32F103, розробили для нього програмний код. Це дає змогу не лише поліпшити технічні характеристики приладу, а й створювати нові алгоритми роботи. Для збільшення чутливості приладу програмний код не використовує внутрішній АЦП мікроконтролера, а натомість використовується 16 бітний AD7705. Так можна збільшити точність приладу до 0,1%, що є дуже хорошим результатом для приладів такого класу. Для порівняння, цей спектрофотометр до модернізації мав таку точність лише згідно з інструкцією користувача та реклами продавця, а на практиці, відхилення прямої калібрувального графіка ми фіксували в межах 2–4%.

Для демонстрації нових можливостей спектрофотометра розроблено методику визначення фенольних похідних у рослинних витяжках. За основу взято методику спектрофотометричного визначення флавоноїдів у пагонах чорниці звичайної [18]. В нашому визначенні замість побудови калібрувального графіка використовується метод добавки.

Аліквоту водної витяжки приготовану з наважки сухої рослинної сировини переносять у мірну колбу (далі колба 1). Додають до колби 1 ацетатний буферний розчин (рН=4,8), додають розчин хлориду феруму і доводять водою об'єм мірної колби до мітки. Отриманим розчином заповнюють кювету спектрофотометра і вимірюють оптичне поглинання, вибравши пункт меню “Phenols”->“Step_1”. Відбирають нову аліквоту з колби 1 та переносять у чисту мірну колбу (далі колба 2). Додають заздалегідь приготовану точно відому кількість речовини порівняння, доводять об'єм розчину в колбі 2 до мітки. Отриманим розчином заповнюють кювету спектрофотометра і вдруге вимірюють оптичне поглинання, вибравши пункт меню “Phenols”->“Step_2”. Програмне забезпечення спектрофотометра самостійно визначає максимум поглинання фенольного комплексу феруму. За допомогою пунктів меню від користувача вимагається введення таких даних: об'єм аліквоти 1 і 2, об'єм колби 1 і 2, наважка сухої рослинної сировини та об'єм води для приготування витяжки, масу стандартної речовини, яку додавали як аналітичну добавку. Після введення всіх даних на табло з'являється результат аналізу у вигляді маси фенольних похідних в перерахунку на стандартну речовину (аналітичну добавку).

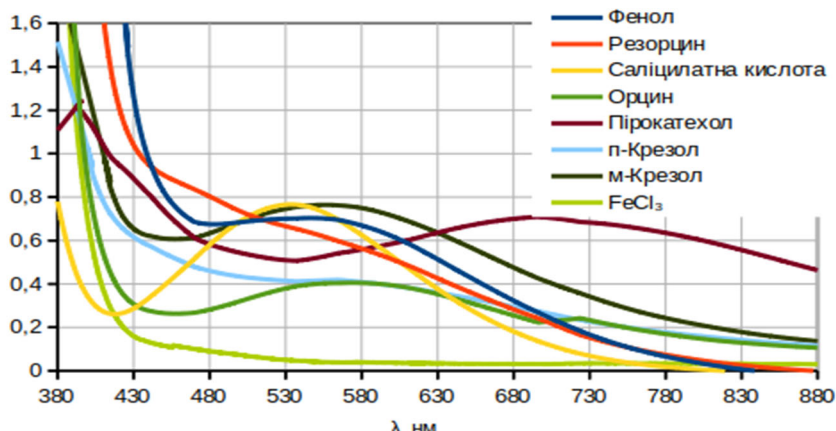
Створенню цієї методики та написанню програмного коду передувало багато випробувань, зокрема: на серії стандартних розчинів фенольних похідних переко-нується, що максимум оптичної густини комплексів з надлишком Fe^{3+} спостерігається за сталої довжини хвилі незалежно від концентрації.

Як стандартні речовини використано фенол, крезол (мета-, пара-), саліцилову кислоту, резорцин, орцин, пірогалол, пірокатехол. Вибір цих речовин зумовлений їхньою стабільністю при зберіганні, кристалічністю, чистотою (в сертифікатах постачальники зазначають, що ці реактиви марки ЧДА з вмістом основної речовини не менше 99%). З цих речовин виготовили $10^{-3}M$ розчини шляхом відбору наважки і перенесення в мірну колбу об'ємом 500 мл для розчинення у воді. Серію цих розчинів готували ступінчастим розведенням у 5, 10, 50, 100, 500, 1000 разів.

Сполуки феруму (3+) з фенолами належать до класу комплексних солей або ж координаційних сполук [19, 20]. Ферум належить до d-елементів, тому для нього характерне утворення великої кількості різноманітних і досить стійких комплексних

сполук. Це пояснюється електронною будовою атомів феруму та його йонів. Фенольні сполуки належать до органічних оксигеновмісних речовин і тому можуть бути лігандами у внутрішніх сферах комплексних сполук, у тім числі утворюючи координаційні зв'язки з іонами феруму ($3+$). Оскільки катіони Fe^{3+} досить сильні окисники, то вони, крім реакції комплексоутворення з фенольними сполуками, можуть окиснювати їх. Продукти окиснення часто мають власне інтенсивне забарвлення. Це ускладнює якісний і кількісний хімічний аналіз фенолів із використанням сполук феруму($3+$): забарвлення може мати різні відтінки та змінюватись у часі, частина фенолу витрачається на перебіг побічної реакції окиснення тощо.

Утворення забарвлених комплексних сполук з катіонами феруму($3+$) характерно для атомів оксигену тих гідроксильних груп, які сполучені з атомом карбону, який має негібридизований р-електрон, що є частиною π -зв'язку (або ароматичної системи – системи делокалізованих π -зв'язків). Тому фактично всі фенольні та енольні сполуки вступають у реакцію з ферум(III) хлоридом у розбавлених водних і спиртових розчинах, з утворенням забарвлених комплексних сполук. Завдяки добре помітному візуально аналітичному ефекту реакція з солями феруму(III) використовується для виявлення фенольних та енольних сполук у різних природних і штучних об'єктах [21, 22].



Спектри оптичного поглинання фенольних комплексів Fe^{3+} при концентраціях фенольних похідних $10^{-5}M$ та 10-ти кратному надлишку Fe^{3+} .

Optical absorption spectra of phenolic Fe^{3+} complexes at concentrations of phenolic derivatives of $10^{-5} M$ and a 10-fold excess of Fe^{3+} .

Вигляд спектра комплексів феруму з фенольними сполуками є типовим для усіх використаних речовин. На рис. зображено спектри оптичного поглинання фенольних комплексів Fe^{3+} . Висока оптична густина на початку спектра зумовлена поглинанням катіона Fe^{3+} , який береться з великим надлишком для повноти зв'язування фенольних похідних у фенольний комплекс. Аналітичним сигналом є максимум у межах 534–696 нм. Найменша та найбільша довжини хвиль відповідають салици-

латній кислоті та пірокатехолу, відповідно. Положення максимумів наведено в табл. Відхилення положення максимуму поглинання не перевищує 2%. Попередньо переконалися, що Fe^{3+} не поглинає оптичне випромінювання в робочому діапазоні, про що свідчить нижня крива на рис. – спектр поглинання 0,1М FeCl_3 в 10^{-4} М HCl .

Для роботи використовують досить концентрований розчин хлориду феруму (1М FeCl_3). Висока концентрація необхідна, щоб можна було вносити дуже малий об'єм розчину – достатньо краплини на скляній паличці, яка вноситься відразу в кювету, де цією ж паличкою перемішується. Одна краплина 1М розчину гарантовано містить десятикратний надлишок Fe^{3+} , що взаємодіє з фенольними похідними. Для запобігання гідролізу розчин хлориду феруму містить хлоридну кислоту.

Залежність положення максимуму оптичної густини від концентрації фенольних комплексів.

Dependence of the position of the optical density maximum on the concentration of phenolic complexes.

Розведення вихідного розчину	Положення максимуму оптичної густини, нм					
	фенол	саліцилатна кислота	орцин	пірокатехол	п-крезол	м-крезол
1	552,7	539,5	579,5	687,3	557,5	545,4
5	543,4	534,2	576,6	692,8	567,6	561,5
10	542,3	530,5	568,6	702,6	568,2	553,7
50	540,1	528,9	565,2	701,9	562,0	562,1
100	546,1	533,7	573,8	696,3	564,9	556,5
500	551,6	538,0	570,3	692,9	560,3	560,4
1000	548,9	532,1	575,6	699,1	568,8	553,7
Середнє значення максимуму оптичної густини	546,4	533,8	572,8	696,1	564,2	556,2
Найбільша похибка від середнього значення, %	1,2	1,1	1,3	1,27	1,2	1,9

Одним з елементів автоматизації цієї методики є самостійний пошук максимуму оптичної густини. Алгоритм програми полягає в пошуку другої похідної від функції $A(\lambda)$. Відомо, що на максимумі функції друга похідна змінює свій знак (проходить через нуль). Для цього масив даних згладжується, тому що часто

вихідний масив не є гладкою функцією. Детальніше з цим алгоритмом та іншими, що використовуються в програмному коді, можна ознайомитися в репозиторії програмного коду викладеного на сервісі github.com [23].

Отримані результати в майбутньому можуть стати основою удосконаленої методики спектрофотометричного визначення фенольних похідних методом добавок у діапазоні концентрацій 10^{-3} – 10^{-6} М.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Ganguly S., Bakhshi S.* Traditional and complementary medicine during COVID-19 pandemic. *Phytother. Res.* 2020 Vol. 34(12): P. 3083–3084. (<https://doi.org/10.1002/ptr.6828>).
2. *Report of the EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials.* Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol.* 2008. Vol. 46. P. S2–70. (<https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.02.008>).
3. *Solodovnichenko N.M.* Medicinal plant raw materials and phytopreparations: a guide to pharmacognosy with the basics of biochemistry of medicinal plants – Kharkiv: Publication of NFAU "Golden Pages", 2001. 408 p. (in Ukrainian).
4. *Pan S.-Y., Zhou S.F., Ga S.H. et al.* New Perspectives on How to Discover Drugs from Herbal Medicines: CAM's Outstanding Contribution to Modern Therapeutics. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2013. ID 627375. 25 p. (<https://doi.org/10.1155/2013/627375>).
5. *European Pharmacopoeia*, 8th Ed. 7.0. Council of Europe, Strasbourg, 2014. Vol. 1. 1380 p.
6. *The British Pharmacopoeia* 2012. British Pharmacopoeia Commission, The Stationery Office, Norwich, Great Britain, 2011. Vol. 1. 1825 p.
7. *Atanasov A.G., Waltenberger B., Pferschy-Wenzig E.-M. et al.* Discovery and Resupply of Pharmacologically Active Plant-Derived Natural Products: A Review. *Biotechnol. Adv.* 2015. Vol. 33(8). P. 1582–1614. (<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>).
8. *Lavania U.C.* Evolving Trends In Plant-Based Drug Discovery. *Plant Genet. Resour.* 2016. Vol. 14(4). P. 243–245. (<https://doi.org/10.1017/S147926211600037X>).
9. Medicinal plants and medicinal plant raw materials containing phenolic compounds, alkaloids and various groups of BAS. Eds.: *S.D. Trzetsynskiy, V.S. Dolya, O.M. Denysenko et al.* – Zaporizhzhia: ZSMU, 2014. 136 p. (in Ukrainian).
10. *Gladukh E.V., Saiko I.V., Sichkar A.A., Saldatov D.P.* Theoretical foundations of pharmaceutical technology: study guide. Kharkiv: NFAU, 2016. 203 p. (in Ukrainian).
11. *Tikhonov O.I., Yarnykh T.G.* Drug technology: a textbook for students of pharmaceutical faculties of the Medical University of Ukraine of III-IV levels of accreditation. – Vinnytsia: NOVA KNYGA Publishing House, 2016. – 536 p. (in Ukrainian).
12. *Chernykh V.P.* Pharmaceutical encyclopedia. 3rd ed., – Kyiv: "MORION", 2016. –1952 p. (in Ukrainian).
13. State Pharmacopoeia of Ukraine. State Enterprise "Scientific Expert Pharmacopoeia Center". - 1st edition. - Kh.: RIREG, 2001. -556 p. (in Ukrainian).
14. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products" - 2nd edition. Kharkiv: State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicines", 2015, Vol. 1. – 1128 p. (in Ukrainian).
15. State Pharmacopoeia of Ukraine. State enterprise "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products" - 2nd edition. Kharkiv: State Enterprise

- "Ukrainian Scientific Pharmacopoeia Center for the Quality of Medicinal Products", 2014. - Vol. 2. –724 p. (in Ukrainian).
16. Chromatographic methods in analytical support for the creation and quality control of medicinal products in Ukraine. ed. V.P. Georgievsky. Kharkiv: "NTMT", 2016. 288 p. (in Ukrainian).
 17. <https://spectrolab.com.ua/ua/g9830353-spektrofotometri>
 18. *Vronska L.V.* Development of spectrophotometric method of flavonoids determination in bilberry shoots. *Pharm. Rev.* 2018. Vol. 4. P. 49–56. (in Ukrainian). (<https://doi.org/10.11603/2312-0967.2018.4.9703>).
 19. *Jabalpurwala K.E., Milburn R.M.* Iron(III)-Phenol Complexes. II. Iron(III) and Proton Associations with Some Singly Substituted Phenolate Ions at 25°. *J. Am. Chem. Soc.* 1966, Vol. 88(14). P. 3224–3227. (<https://doi.org/10.1021/ja00966a011>).
 20. *Khokhar S., Owusu Apenten R.K.* Iron binding characteristics of phenolic compounds: some tentative structure–activity relations. *Food Chem.* 2003. Vol. 81. P. 133–140. ([https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00394-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00394-1)).
 21. *Zhaofeng Fu, Rui Chen.* Study of Complexes of Tannic Acid with Fe(III) and Fe(II). *J. Anal. Methods Chem.* Vol. 2019. ID 3894571. 6 p. (<https://doi.org/10.1155/2019/3894571>).
 22. *Barchii I.E., Chundak S.Yu.* Fundamentals of the chemistry of complex compounds: a textbook. - Uzhgorod: Publishing House of UzhNU "Hoverla", 2019. -133 p. (in Ukrainian).
 23. <https://github.com/argonte/UNICO-1200>.

SUMMARY

**Dmytro POLOVYI¹, Natalia DEMIANIUK¹, Anna DEMYD¹, Larisa BOYKO¹, Hryhorii ZAGRYCHUK¹,
Olga AKSIMENTYIEVA-KRASNOPOLSKA²**

SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF PHENOLIC DERIVATIVES IN PLANT EXTRACTS

¹*I. Horbachevsky Ternopil National Medical University
St. Ruska, 36, 46001 Ternopil, Ukraine
e-mail: dpolov1981@gmail.com*

²*Ivan Franko National University of Lviv,
Kyryla i Mephodia Str., 6, 79005 Lviv, Ukraine
e-mail: aksimen@ukr.net*

For centuries, plants have been used as a source of medicine to treat infections, cardiovascular disease, cancer, or as immune suppressants. The active component of aqueous extracts of plant parts in many cases are phenolic derivatives. Their quantitative determination according to the pharmacopoeia is carried out by the method of thin-layer chromatography and colorimetry. The paper proposes a spectrophotometric study of plant extracts using a UNICO-1200 spectrophotometer. In order to speed up the analysis process, it is proposed to make changes to the software control of the device, to add items to the user menu that allow automating the analysis process and calculating the content of phenolic derivatives in the analyzed raw materials. To improve the capabilities of the spectrophotometer, the microcontroller was replaced with a more productive 32-bit STM32F103, and a program code was developed for it. This allows not only to improve the technical characteristics of the device, but also to create new work algorithms.

In this definition, instead of constructing a calibration graph, the addition method is used. Acetate buffer solution (pH=4.8) and ferric chloride solution are added to an aliquot of aqueous extract prepared from a weight of dry plant material. The software of the spectrophotometer independently determines the absorption maximum of the phenol complex of ferrum. The analytical signal is a maximum in the range of 534 - 696 nm. The deviation of the position of the absorption maximum does not exceed 2%. With the help of menu items, enter such data as the volumes of aliquots, the volumes of flasks, the weight of dry plant material and the volume of water for preparing the extract, the mass of the standard substance that was added as an analytical

additive. After entering all the data, the result of the analysis appears on the scoreboard in the form of the mass of phenolic derivatives in terms of the standard substance.

In the future, the obtained results may form the basis of an improved technique for the spectrophotometric determination of phenolic derivatives by the additive method.

Keywords: spectrophotometry, phenol derivatives, plant extract, microcontroller, optical density, ferrum complexes, additive method.

Стаття надійшла: 10.06.2023.
Після доопрацювання: 23.08.2023.
Прийнята до друку: 29.09.2023.