Luminescent Determination of Protocatechuic Acid in Grape Wines and Juices

O.I. Teslyuk*†, S.V. Beltyukova‡, Ie.V. Cherednychenko‡, E.O. Liventsova‡**

† Bogatskii Physicochemical Institute, National Academy of Sciences of Ukraine, 86 Lyustdorfskaya dor., Odessa, Ukraine, 65080; *e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

‡ Odessa National Academy of Food Technologies, 112 Kanatnaya st., Odessa, Ukraine, 65039; **e-mail: cherednychenko.liza@gmail.com

Recieved: October 18, 2017; Accepted: December 06, 2017
DOI: 10.17721/moca.2017.130-134

The possibility of determination of protocatechuic acid (PC) in wines and juices using the sensitized luminescence of the Tb(III) ion in the sorbent layer on TLC plates was studied. It has been established that the relative position of the triplet PC level energy values and the excited ion Tb(III) level, as well as the overlap of the most intense bands in the lanthanide ion luminescence spectrum by the long-wavelength wing of the ligand spectrum, contribute to the efficient excitation energy transfer from the ligand to the Tb(III) ion and to the production of an intensive luminescence.It has been demonstrated, that luminescence intensity (I_{lum}) of Tb(III) in complex with PC significantly increases at complexation on a solid matrix. The optimal conditions for the sorbate complexation were studied. It has also been observed a significant increase of the luminescent signal in the presence of trioctylphosphine oxide (TOPO) and the micellar medium Triton X-100. The optimal chromatographic conditions have been determined. The benzene-methanol-acetic acid system (100:50:1) was chosen as the mobile phase. The terbium chloride (III), trioctylphosphine oxide and Triton X-100 were proposed as an enhanced solution. Determination of the content of PC in juices and wines was conducted using a calibration curve, while registering Ilum. of Tb(III) ion at λ = 545 nm ($\lambda_{exit.}$ = 365 nm). The validity of the obtained results was checked by the «entered-found» method. The determination accuracy and reliability was verified by statistical processing of the of the results obtained. The PC detection limit was 0.02 mg/l.

Keywords: protocatechuic acid, solid-phase luminescence, Tb(III) ions

Люминесцентное определение протокатеховой кислоты в виноградных винах и соках

О.И. Теслюк*†, С.В. Бельтюкова‡, Е.В. Чередниченко‡, Е.О. Ливенцова‡**

† Физико-химический институт им. А.В. Богатского НАН Украины, ул. Люстдорфская дорога, 86, Одесса, 65080, *e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

‡ Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатная, 112, Одесса, 65039; **e-mail: cherednychenko.liza@gmail.com

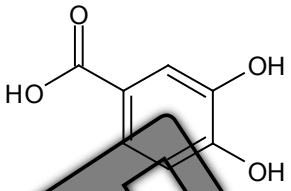
Поступила: 18 октября 2017 г; Принята: 06 декабря 2017 г
DOI: 10.17721/moca.2017.130-134

Изучена возможность определения протокатеховой кислоты (ПК) в винах и соках по сенсибилизированной люминесценции иона Tb(III) в слое сорбента на пластинах для ТСХ. Установлено, что взаимное расположение величин энергии триплетного уровня ПК и возбужденного уровня иона Tb(III), а так же перекрывание наиболее интенсивных полос в спектре люминесценции иона лантанида длинноволновым крылом спектра лиганда способствуют эффективному переносу энергии возбуждения от лиганда на ион Tb(III) и получению интенсивной люминесценции. Показано, что при комплексообразовании на твердой матрице значительно возрастает интенсивность люминесценции (Iлюм.) Tb(III) в комплексе с ПК. Изучены оптимальные условия комплексообразования сорбата. Установлено, что в присутствии триоктилфосфиноксида (ТОФО) и мицеллярной среде Тритон Х-100 наблюдается значительное увеличение люминесцентного сигнала. Определены оптимальные условия хроматографирования. В качестве подвижной фазы выбрана система бензол:метанол:уксусная кислота (100:50:1). Проявление хроматограммы проводили растворами хлорида Tb(III), ТОФО и Тритона Х-100. Определение ПК в соках и винах проводили по градуировочному графику, регистрируя Iлюм. иона Tb(III) при λ=545 нм (λвозб=365 нм). Правильность полученных результатов проверяли методом «введено-найдено». Точность и достоверность определения проверена методом статистической обработки полученных результатов. Предел обнаружения ПК составил 0.02 мг/л.

Ключевые слова: протокатеховая кислота, твердофазная люминесценция, ионы Tb(III)

Preview

Протокатеховая (3,4 – дигидроксибензойная) кислота относится к фенолокислотам, в значительном количестве содержится в винах, соках, в листьях чая, фруктах, лекарственных растениях (ромашке аптечной, зверобое, тысячилистнике и др.) и может служить маркером качества растительного сырья и подлинности виноградных вин и соков.



Количественное содержание фенолкарбоновых кислот и других фенольных соединений необходимо также для определения антикосидантной активности вин. Обладая высокой антиоксидантной активностью, фенолокислоты выступают в качестве донора водорода при торможении перекисного окисления липидов, биомембран клеток, предотвращают образование аддуктов с ДНК, предупреждая активацию мутагенных процессов [1-3].

Согласно литературным данным, идентификацию и количественное определение ПК проводят, в основном, хроматографическими методами. Предложено определение ПК во фруктовых соках методом ВЭЖХ с предварительным селективным выделением [4]. В качестве твердой матрицы использованы магнитные молекулярно-импринтированные полимеры. Чувствительность определения составляет 0.45 мкг/мл. Идентификация красных вин по содержанию флавонолов и фенолкарбоновых кислот, в том числе и протокатеховой, проведена в [5-7]. Методом газовой хромато-масс-спектрометрии и ВЭЖХ с ультрафиолетовой детекцией идентифицирована и количественно определена ПК в растительном сырье и фармацевтических препаратах [8-11]. Кинетическое определение ПК проведено спектрофотометрическим методом в сочетании с хемометрической интерпретацией результатов [12]. Однако, существующие методы определения ПК требуют специальной пробоподготовки, длительны во времени и сложны в аппаратурном оформлении.

В последние годы для определения биологически активных веществ, в том числе и фенольной природы, предложено использовать различные варианты люминесцентного метода, в том числе основанного на характеристической 4f-люминесценции ионов лантанидов, сенсибилизированной лигандным окружением центрального иона [13,14].

В настоящей работе поставлена задача разработать высокочувствительную и экспрессную методику определения ПК в винах и соках с использованием в качестве люминесцентного маркера ионов Tb(III).

Экспериментальная часть

Хлориды Eu(III) и Tb(III) готовили растворением их высокочистых оксидов (99.998%) в хлористоводородной кислоте (1:1) с последующим удалением ее избытка упариванием. Концентрацию устанавливали комплексонометрическим титрованием. Раствор 1,10-фенантролина готовили растворением точной навески (до четвертого знака после запятой) вещества в бидистиллированной воде с подкислением соляной кислотой до pH 5. Растворы стандарта протокатеховой кислоты и донорно-активных веществ (2,2'-дипиридила, трифенилфосфиноксида (ТФФО), триоктилфосфиноксида, β-циклодекстрина готовили растворением их точных навесок в этаноле.

Спектры возбуждения и люминесценции сорбатов комплексов Eu(III) и Tb(III) регистрировали в области 560-650 и 450-650 нм с помощью спектрофлуориметра Fluorolog FL3-22 «Horiba Jobin Yvon» (Франция) с ксеноновой лампой 450 W, предварительно соскоблив с хроматографической пластины зоны соответствующих пятен и поместив твердые образцы в кюветы. Полученные данные обрабатывали с использованием программы OriginPro 7.5; Microcal software (2009 OriginLab). Для изучения кинетики затухания люминесценции применяли осциллографическую регистрацию. Люминесценцию возбуждали при этом импульсным азотным лазером с длиной волны излучения 337 нм. Спектры поглощения растворов регистрировали на спектрофотометре UV-2401 PC Shimadzu (Япония). Количественное определение ПК проводили на спектрометре ИСП-51 с фотоэлектрической приставкой ФЭП-1 (люминесценцию возбуждали светом ртутно-кварцевой лампы СВД-120 А со светофильтром УФС-2, выделяющим излучение с $\lambda_{макс}$ = 365 нм). Значения pH растворов измеряли с помощью pH-метра ОР-211/1 Radelkis (Венгрия) со стеклянным электродом. Необходимое значение pH создавали в растворе с помощью уротропина.

Обсуждение результатов

Для оценки возможной сенсибилизации люминесценции ионов Eu(III) и Tb(III) в присутствии ПК определены ее основные спектральные характеристики. Величина энергии триплетного уровня ПК (21505 см$^{-1}$) выше энергии возбужденного $^5D_4$ уровня иона Tb(III) (20500 см$^{-1}$), вследствие чего принципиально возможен эффективный перенос энергии возбуждения на резонансный уровень иона Tb(III). В то время как значительный энергетический зазор между триплетным уровнем ПК и излучающим уровнем иона Eu(III) $^5D_0$ (17300 см$^{-1}$) способствует увеличению степени

ТОРИЧНИЙ

безызлучательных потерь энергии возбуждения и $I_{люм}$ иона Eu(III) в этом случае практически равна нулю.

В спектре поглощения ПК имеются коротковолновые полосы с максимумом при $\lambda_{макс}$ = 259-260 нм. Спектр люминесценции ПК представляет собой широкую полосу с максимумом при $\lambda_{макс}$ = 455-462 нм, в связи с чем наиболее интенсивные полосы в спектре люминесценции иона Tb(III), соответствующие переходам $^5D_4 \rightarrow {}^7F_6$ (λ = 490 нм) и $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$ (λ = 545 нм) перекрываются длинноволновым крылом спектра лиганда, что способствует переносу энергии возбуждения от лиганда на ион Tb(III).

Установлено, что образующиеся комплексные соединения ПК с ионами Tb(III) обладают значительно большей $I_{люм.}$ в слое сорбента на пластинах для ТСХ. Кроме того, применение ТСХ позволяет селективно выделять ПК из многокомпонентных систем. В спектре твердофазной люминесценции Tb(III), обусловленной переходами с излучающего уровня $^5D_4$ на подуровни основного уровня: $^7F_6$ (λ = 490 нм), $^7F_5$ (λ = 544 нм), $^7F_4$ (λ = 584 нм), $^7F_3$ (λ = 592 нм) и $^7F_2$ (λ = 620 нм), наиболее интенсивной является полоса, соответствующая электро-дипольному переходу $^5D_4 \rightarrow {}^7F_5$, сверхчувствительному (СЧП) к влиянию поля лиганда (рис.1).

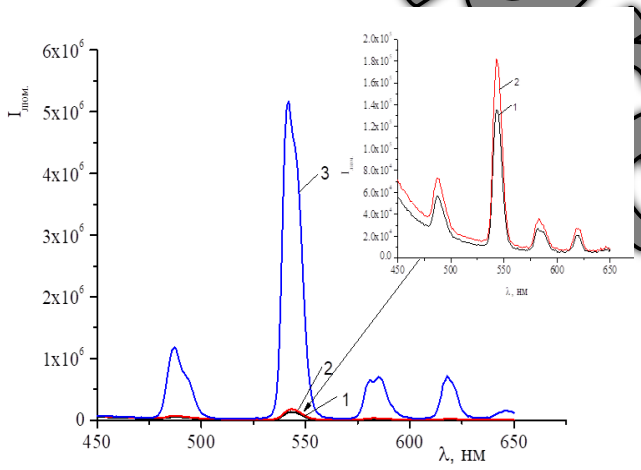


Рис.1. Спектр люминесценции сорбатов комплексов Tb(III) с ПК (1) в присутствии ТОФО (2) и Тритон Х-100 (3); (C_{Tb} = 1·10^{-5} М; $C_{ПК}$ = 5·10^{-5} М; $C_{ТОФО}$ = 4·10^{-5} М; $C_{Тритон\ X\text{-}100}$ = 4·10^{-5} М).

Комплексообразование Tb(III) с ПК протекает в слабокислой или нейтральной среде, максимум люминесценции обнаруживается при pH 6.5-6.9. Методом ограниченного логарифмирования найдено соотношение компонентов в комплексе Ln:Lig = 1:2.

С целью оптимизации люминесцентных характеристик сорбатов комплексов изучено влияние поверхностно-активных веществ и донорно-активных добавок, которые могут принимать участие в процессах передачи энергии возбуждения от лиганда к иону Ln(III). Вследствие этих процессов возможно снижение безызлучательных потерь энергии, а также увеличение интенсивности и квантового выхода люминесценции. Исследовано влияние различных ПАВ и ДАД, содержащих в своей структуре донорные атомы азота и кислорода. Так в присутствии катионных ПАВ цетилтриметилпиридиния бромида и этония $I_{люм}$ сорбата комплекса снижается в 3 и 5 раз соответственно. Анионные (додецилсульфат и гексадецилсульфат натрия) и неионные (Твин-80, Бридж-35, Неонол 9-12) либо не изменяют, либо незначительно (до 5-8 %) тушат аналитический сигнал. Введение в качестве второго лиганда 2,2-дипиридила и 1,10-фенантролина снижает $I_{люм}$ сорбата в 10 и 5 раз соответственно. Значительное тушение $I_{люм}$ происходит, вероятно, вследствие разрушения люминесцирующего комплекса, а также увеличения степени безызлучательных потерь энергии возбуждения.

Наибольшее увеличение интенсивности люминесценции наблюдалось в присутствии триоктилфосфиноксида, при этом $I_{люм}$ сорбата возрастает на 40%. Увеличение аналитического сигнала происходит в результате образования разнолигандных комплексов (РЛК), что способствует уменьшению безызлучательных потерь энергии возбуждения. Значительное увеличение аналитического сигнала РЛК в 29 раз (рис. 1) наблюдается в мицеллярной среде Тритон Х-100.

Расщепление наиболее интенсивных полос в спектрах люминесценции сорбатов комплексов свидетельствует о понижении симметрии координационного полиэдра, что подтверждается изменением характера спектров возбуждения люминесценции (рис. 2) при образовании сорбатов РЛК иона Tb(III) с ПК в присутствии ТОФО в мицеллах Тритон Х-100.

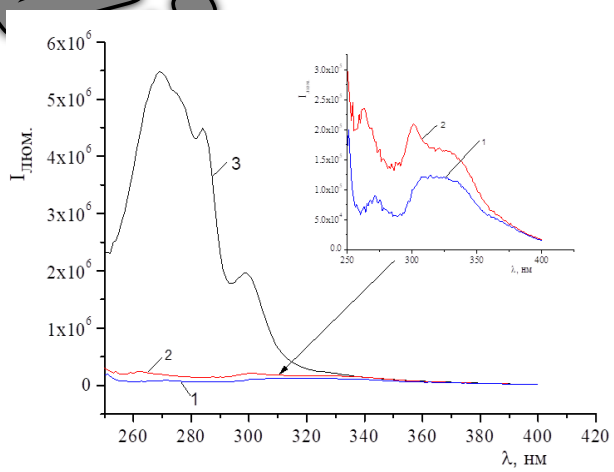


Рис. 2. Спектры возбуждения люминесценции сорбатов комплексов Tb(III) с ПК (1) в присутствии ТОФО (2) и Тритон Х-100 (3); (C_{Tb} = 1·10^{-5} М; $C_{ПК}$ = 5·10^{-5} М; $C_{ТОФО}$ = 4·10^{-5} М; $C_{Тритон\ X\text{-}100}$ = 4·10^{-5} М).

Спектр возбуждения люминесценции сорбата комплекса Tb(III) с ПК имеет широкую полосу поглощения в области 290-350 нм. В присутствии ТОФО происходит гипер- и гипсохромный сдвиги максимумов поглощения. В мицеллярной среде появляется широкая полоса в области 250-320 нм с максимумами при 270, 285 и 298 нм, которая может быть отнесена к $\pi \leftarrow n$ переходам в молекулах лигандов. Широкая полоса возбуждения при $\lambda = 315$ нм сдвигается в область более коротких длин волн ($\lambda = 298$ нм). Взаимное перекрывание полос спектров возбуждения соединений Tb-ПК и Tb-ПК-ТОФО в мицеллярном растворе Тритон Х-100 обусловливает значительное увеличение эффективности внутримолекулярного переноса энергии и вследствие этого интенсивности люминесценции сорбата комплекса. Также в микрогетерогенных мицеллярных средах, очевидно, происходит солюбилизация комплекса Tb(III) в мицеллах ПАВ с возможным увеличением константы устойчивости комплекса.

Длительность люминесценции определяется временем жизни возбужденного состояния молекул (τ) и является одной из ее основных характеристик. Изучение кинетики затухания люминесценции сорбата комплекса Tb-ПК (τ=121 мкс) показало, что при образовании РЛК с ТОФО в мицеллярной среде Тритон Х-100 τ возрастает в 13.3 раза и составляет 1609 мкс. Значительное усиление люминесцентного сигнала достигается вследствие более полной трансформации поглощенной энергии в люминесцентное излучение при образовании РЛК на твердой матрице.

Для выбора условий хроматографирования исследован ряд неподвижных фаз, различающихся по свойствам. Оптимальный результат был достигнут при использовании хроматографических пластин Merck TLC Aluminum Plates. В качестве элюирующих систем использованы системы кислого характера (бензол-метанол-уксусная кислота (100:50:1); этилацетат-уксусная кислота (95:5); бензол-диоксан-уксусная кислота (90:25:4)). Подвижность ПК в этих условиях составила 0.49 – 0.72. Для дальнейших исследований выбрана система бензол-метанол-уксусная кислота.

На основании проведенных исследований разработана методика определения протокатеховой кислоты в соках и винах.

Методика определения

Анализируемую пробу вина или сока предварительно разбавляли дистиллированной водой в соотношении 1:10.

На линию старта хроматографической пластинки микрошприцем наносили 2 мкл пробы. Параллельно на пластинку наносили стандартный раствор протокатеховой кислоты, содержащий $4 \cdot 10^{-7} – 1 \cdot 10^{-4}$ мг/л ПК в зависимости от предполагаемого содержания в пробе. Пластинку подсушивали и помещали в хроматографическую камеру в подвижную фазу (смесь бензол : метанол : уксусная кислота (100:50:1)). При достижении линии фронта растворителя, пластинку извлекали из камеры. Полученную хроматограмму высушивали. Идентификацию ПК кислоты проводили по стандартному образцу вещества-свидетеля. Величина Rf для определяемого компонента и стандарта составила 0.72. Хроматографическое пятно, соответствующее ПК, обрабатывали последовательно растворами хлорида Tb(III) ($1 \cdot 10^{-5}$ М), ТОФО ($4 \cdot 10^{-5}$ М), Тритона Х–100 ($4 \cdot 10^{-5}$ М) и уротропина 4%-ного. Регистрацию интенсивности люминесценции осуществляли при $\lambda_{излуч} = 545$ нм ($\lambda_{возб} = 365$ нм).

Количественное определение ПК проводили по градуировочному графику, построение которого выполняли следующим образом. На пластинку наносили различные количества стандартного раствора ПК и проводили хроматографирование и проявление хроматограммы, как описано выше. Затем из пластинки вырезали пятна с ПК, помещали в кювету для твердых образцов и измеряли интенсивность люминесценции при $\lambda = 545$ нм. По полученным данным $I_{люм}$ Tb(III) – концентрация ПК строили градуировочный график, по которому определяли содержание ПК в анализируемой пробе. Предел обнаружения ПК c_{min} составляет 0.02 мг/л.

Точность и достоверность определения ПК проверена методом статистической обработки результатов анализа, правильность - методом «введено-найдено».

Результаты определения ПК в различных объектах и проверка правильности полученных результатов методом добавок приведены в таблице 1.

При n=5, P=0.95 величина относительного стандартного отклонения Sr составляет 0.04 – 0.08.

Таблица 1. Результаты определения протокатеховой кислоты в винах и соках (n = 5; P = 0.95).

Объект анализа	Введено, мг/л	Найдено в пробе с добавкой, мг/л	Найдено в пробе, мг/л	S_r,%
Сок гранатовый ООО «Зейтун» Азербайджан	0.5	2.31±0.04	1.81	5.8
	1.0	2.85±0.05	1.85	3.9
Свежевыжатый гранатовый сок	1.0	4.60±0.07	3.60	5.1
	2.0	5.65±0.08	3.65	4.9

ТОКАТЕВ

Объект анализа	Введено, мг/л	Найдено в пробе с добавкой, мг/л	Найдено в пробе, мг/л	S_r,%
Вино «Ашан» «Лопез Моренас» Испания	0.5 1.0	2.25±0.05 2.78±0.06	1.75 1.78	7.7 6.2
Сухое красное вино «Мерло» ТМ «Французский бульвар», Украина	0.5 1.0	1.15±0.01 1.70±0.04	0.65 0.70	5.8 3.8
«Кагор»ТМ «Вина Комрата», Молдова	0.5 1.0	1.65±0.04 2.18±0.06	1.15 1.18	7.5 5.7
Киндзмараули, Тов. «Братья Асканели», Грузия	1.0 2.0	3.15±0.03 4.17±0.05	2.15 2.17	6.0 4.8

Выводы

Показана возможность использования твердофазной сенсибилизированной люминесценции ионов Tb(III) в комплексе с протокатеховой кислотой и триоктилфосфиноксидом в присутствии Тритона Х-100 для определения протокатеховой кислоты в винах и соках.

Литература

1. Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acid. *Free radical Biology and Medicine.*1996, 20 (7), 933–956.

2. Pokorny J., Yanishlieva N., Gordon M. Antioxidants in food. CRC Press. 2001. P. 380.

3. Robbins R.J. Phenolic acids in foods: an overview of analytical methodology. *J.Agric.Food Chem*. 2003, 51, 2866-2887.

4. Xie L., Guo J., Zhang Y., Shi S. Efficient determination of protocatechuic acid in fruit juices by selective and rapid magnetic molecular imprinted solid phase extraction coupled with HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 2014, 62(32), 8221–8228.

5. Положишникова М.А. Перелыгин О.Н. Определение биологической ценности и идентификация красных виноградных вин по содержанию флавонолов и фенолкарбоновых кислот. *Виноделие и виноградарство*. 2005, 6, 22-24.

6. Andreu-Navarro A., Russo P., Aguilar-Caballos M. P., Fernandez-Romero J.M., Gomez-Hens A. Usefulness of terbium-sensitized luminescence detection for the chemometric classification of wines by their content in phenolic compounds. *Food Chem*. 2011, 124(4), 1753-1759.

7. Akalin H, Bayram M, Ertan Anli R. Determination of some individual phenolic compounds and antioxidant capacity of mead produced from different types of honey. *J. Institute of Brewing.* 2017, 123(1), 167-174.

8. Верниковская Н.А., Темердашев. З.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном. *Аналитика и контроль*. 2012, 16(2), 188-195.

9. Zgorka G., Kawka S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Analysis*. 2001, 24(5-6), 1065-1072.

10. Мяделец М.А., Дутова С.В. Хроматографическое изучение фенольных соединений Coluria Geoides. *Растит. мир Азиат. России.* 2012, 2(10), 43-48.

11. Li Q, Jia Y, Xu L, Wang X, Shen Z, Liu Y, Bi K. Simultaneous determination of protocatechuic acid, syringin, chlorogenic acid, caffeic acid, liriodendrin and isofraxidin in Acanthopanax senticosus Harms by HPLC-DAD. *Biol Pharm Bull.* 2006, 29(3), 532-534.

12. Khodaveisi J., Shabani A. M. H., Dadfarnia S., Moghadam M. R., Hormozi-Nezhad M. R. Simultaneous determination of protocatechuic aldehyde and protocatechuic acid using the localized surface plasmon resonance peak of silver nanoparticles and chemometric methods. *Quím. Nova.* 2015, 38(7), 896-901.

13. Бельтюкова С., Степанова А., Теслюк О. Применение твердофазной спектрометрии для определения антиоксидантов. Возможности использования твердофазной люминесценции в анализе полифенольных соединений. Saarbrucken: Palmarium academic publishing, 2015. С.184.

14. Егорова А.В., Скрипинец Ю.В. Применение сенсибилизированной люминесценции ионов лантанидов в биоанализе. Одесса: Астропринт, 2008. С.198 .

Прорецензовано