

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**  
**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**  
**ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

**На правах рукопису**

**Бас Юлія Петрівна**

УДК 543.42:546-328:615.074:543.87:547.98:577.175.5

**ФОСФАТНІ ГЕТЕРОПОЛКИСЛОТИ ЯК ТВЕРДОФАЗНІ ОКИСНО-  
ВІДНОВНІ РЕАГЕНТИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ,  
ПОЛІФЕНОЛІВ ТА ОЦІНКИ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ**

02.00.02 – аналітична хімія

Дисертація на здобуття наукового ступеню  
кандидата хімічних наук

**Науковий керівник**  
Запорожець Ольга Антонівна  
доктор хімічних наук, професор

Київ – 2013

## ЗМІСТ

УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ .....	3
ВСТУП .....	4
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ІНДИКАТОРНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ГЕТЕРОПОЛІКИСЛОТ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОВНИКІВ .....	10
1.1. Будова та властивості гетерополікислот.....	10
1.2 Застосування ГПК як окисно-відновних аналітичних реагентів .....	13
1.3. Методи визначення катехоламінів .....	14
1.4 Антиоксиданти та методи їх визначення .....	27
1.5 Твердофазні редокс реагенти для визначення окисників та відновників	34
1.6 Висновки до розділу 1 .....	37
РОЗДІЛ 2. РЕАГЕНТИ, АПАРАТУРА ТА МЕТОДИКИ ЕКСПЕРИМЕНТУ ..	40
2.1. Приготування та стандартизація розчинів реагентів .....	40
2.2. Обладнання .....	44
2.3. Вибір матриці, модифікаторів та способу їх іммобілізації .....	44
2.4. Методи та методики дослідження .....	48
2.5. Висновки до розділу 2 .....	53
РОЗДІЛ 3. ВЗАЄМОДІЯ МОЛІБДОСТИБІЄВОФОСФАТНОЇ ТА МОЛІБДОВОЛЬФРАМОФОСФАТНОЇ ГПК ІЗ ПОВЕРХНЕЮ МОДИФІКОВАНОГО ТДАН СИЛІКАГЕЛЮ .....	55
3.1. Синтез та ідентифікація різнолігандної молібдостибієвофосфатної ГПК.....	55
3.2. Взаємодія на межі розділу фаз «розчин окиснених форм ГПК – іммобілізований на силікагелі ТДАН».....	59
3.3. Іоно-асоціативний зв'язок: можливі механізми. Роль інших типів взаємодій..	65
3.4. Висновки до розділу 3 .....	72
РОЗДІЛ 4. ВЗАЄМОДІЯ РОЗРОБЛЕНИХ ТР ІЗ ВІДНОВНИКАМИ РІЗНОЇ ПРИРОДИ .....	73
4.1. Дослідження умов автоокиснення адреналіну люмінесцентним методом.....	73
4.2. Оптимізація умов визначення катехоламінів методом ТСФ.....	82
4.2.1. Встановлення оптимальних умов взаємодії іммобілізованої молібдостибієвофосфатної ГПК з катехоламінами .....	82

4.2.2. Дослідження впливу сторонніх іонів на результати визначення катехоламінів .....	88
4.3. Встановлення оптимальних умов взаємодії іммобілізованого реактиву Фоліна (ГПК2) з поліфенолами.....	90
4.3.1. Дослідження впливу сторонніх іонів на результати визначення поліфенолів .....	98
4.4. Розробка кольорових шкал для візуального тест-визначення катехоламінів та поліфенолів .....	100
4.5. Висновки до розділу 4 .....	103
<b>РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ ТР НА ОСНОВІ ІММОБІЛІЗОВАНОЇ НА КРЕМНЕЗЕМІ ОКИСНЕНОЇ МОЛІБДОСТИБІЄВОФОСФАТНОЇ ГПК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ .....</b>	<b>104</b>
5.1. Визначення вмісту катехоламінів у фармацевтичних препаратах ТСФ та візуальним тест-методом.....	107
5.2. Визначення вмісту катехоламінів у біологічних рідинах ТСФ і візуальним тест-методом.....	111
5.3. Висновки до розділу 5 .....	113
<b>РОЗДІЛ 6. ЗАСТОСУВАННЯ ТР НА ОСНОВІ ЗАКРІПЛЕНОГО НА КРЕМНЕЗЕМІ РЕАКТИВУ ФОЛІНА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ ТА ОЦІНКИ ЇХ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ .....</b>	<b>115</b>
6.1. Визначення загального вмісту поліфенолів у препаратах «Кверцетин. Гранули» та «Вин-Віта» ТСФ і візуальним тест-методом.....	117
6.2. Визначення загального вмісту поліфенолів у соках, винах та фруктах ТСФ методом і оцінка їх антиоксидантної активності візуальним тест-методом..	122
6.3. Висновки до розділу 6 .....	128
<b>ВИСНОВКИ .....</b>	<b>130</b>
<b>ЛІТЕРАТУРА.....</b>	<b>132</b>
<b>ДОДАТКИ.....</b>	<b>132</b>

**УМОВНІ ПОЗНАЧЕННЯ ТА СКОРОЧЕННЯ**

Адр	адреналін
CuТААВ	тетрабензотетраазоциклогексадецинкупрум(II)
АОА	антиоксидантна активність
Аск	Аскорбінова кислота
ВЕРХ	високоєфективна рідинна хроматографія
ВТ	візуальний тест-метод
ГГ	градувальний графік
ГПА	гетерополіаніон
ГПК	гетерополікислота
ГПК1	молібдофосфорностибієва гетерополікислота
ГПК2	молібдовольфрамофосфорна гетерополікислота
ГПС	гетерополісполука
ДМСО	диметилсульфоксид
Доф	дофамін
ІА	іонний асоціат
ІТ	індикаторні трубки
КЗ	кремнеземи
МВ	межа виявлення
ППУ	пінополіуретан
РФ	реактив Фоліна
РФЧ	реактив Фоліна-Чокальте
СГ	силікагель
СФ	спектрофотометричний
ТДАН	тетрадециламоній нітрат
ТДАН–СГ	ТДАН закріплений на силікагелі
ТР	твердофазний реагент
ТСФ	твердофазно–спектрофотометричний
ХЛ	хемілюмінесцентний
ЦНС	центральна нервова система
ЯМР	ядерний магнітний резонанс

## ВСТУП

### Актуальність теми

Останнім часом спостерігається стрімке зростання виробництва лікарських форм, фітопрепаратів, біологічних добавок і продуктів харчування з високим вмістом органічних відновників, так званих антиоксидантів. Їхня популярність обумовлена здатністю нейтралізувати негативну дію на здоров'я людини вільних радикалів, що утворюються в організмі за несприятливих екологічних умов, викликаючи онкологічні та серцево-судинні захворювання. До таких речовин відносять інгібітори вільних радикалів – поліфеноли. Для контролю якості фітопрепаратів та біодобавок застосовують такі інтегральні показники, як сумарний вміст поліфенолів та загальну антиоксидантну активність (АОА). Переважна більшість існуючих методик оцінки АОА вимагають застосування спеціального обладнання і малодоступних та дорогих реактивів, оскільки базуються на радикальних реакціях. Тому розробка простих та експресних методик оцінки вмісту поліфенолів та контролю АОА різноманітних об'єктів є нагальною потребою сучасної аналітичної хімії.

Катехоламіни – важливий клас фізіологічно активних сполук, що беруть участь у регулюванні діяльності серцево-судинної системи і функцій гладкої мускулатури. Завдяки судинозвужуючій дії такі катехоламіни, як адреналін і дофамін, входять до складу лікарських препаратів, зокрема анестетиків місцевої дії. Однак поряд із пролонгацією анестезуючої дії основного компоненту катехоламіни підвищують кров'яний тиск і збільшують серцеві ритми, тому контроль мінімального заявленого вмісту їх у таких препаратах є необхідною та актуальною задачею аналізу.

Незважаючи на наявність новітніх інструментальних методів визначення відновників органічної природи, найбільш доступними залишаються спектрофотометричні (СФ) методики, що базуються на відновленні гетерополікіслот (ГПК) структури Кеггіна. Втім основним недоліком таких методик є незадовільна відтворюваність результатів аналізу, яка зумовлена псевдоколоїдним станом та незадовільною стабільністю ГПК у розчині. Більш

стабільними, чутливими і водночас простими для використання виявилися твердофазні окисно-відновні реагенти (ТР). Для визначення аскорбінової кислоти і гідразину запропоновано твердофазно-спектрофотометричні (ТСФ) та візуально-тестові (ВТ) методики, що базуються на отриманні у розчині з наступним вилученням модифікованими сорбентами «синіх» форм молібдофосфатних ГПК структури Доусона та Кеггіна. Втім такий підхід не дає можливості повністю позбавитись вказаних недоліків. Більш перспективними вбачаються методи із застосуванням ТР на основі іммобілізованих ГПК. Втім, даних щодо застосування іммобілізованих «жовтих» форм різнолігандних ГПК для визначення катехоламінів, поліфенолів, а також оцінки АОА в літературі не виявлено.

Таким чином, актуальність роботи обумовлена нагальною потребою розробки чутливих і водночас експресних та комерційно доступних ТР для твердофазно-спектрофотометричного та візуального тест-визначення катехоламінів та поліфенолів рослинного походження, насамперед у лікарських препаратах, природних і біологічних об'єктах, а також оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Дослідження за темою дисертації виконувалось на кафедрі аналітичної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка відповідно до науково-дослідної тематики кафедри та держбюджетних тем «Комбіновані та гібридні методи аналізу із застосуванням адсорбентів, композиційних матеріалів та міцелярних екстрагентів» (номер державної реєстрації 0108U003866) та «Органомінеральні наноматеріали та супрамолекулярні системи для вилучення, концентрування та визначення аналітів різної природи» (номер державної реєстрації 0111U006261).

**Мета і задачі дослідження.** *Мета роботи* – розробка твердофазних редокс реагентів на основі окиснених форм різнолігандних молібдостибієвофосфатної та молібдовольфрамофосфатної (реактив Фоліна) гетерополікіслот структури Кеггіна для визначення загального вмісту

біологічно активних органічних відновників, а саме катехоламінів та поліфенольних сполук, які виявляють антиоксидантні властивості.

Для досягнення цієї мети необхідно було вирішити такі задачі:

- здійснити вибір індикаторних систем для визначення катехоламінів та поліфенолів;
- дослідити оптимальні умови вилучення окиснених форм фосфатних ГПК із водного розчину кремнеземом, що модифікований тетрадециламонію нітратом;
- розробити твердофазні реагенти на основі кремнезему, послідовно модифікованого тетрадециламоній нітратом та молібдостибієвофосфатною і молібдовольфрамфосфатною гетерополікислотами структури Кеггіна;
- розробити оптимальні умови взаємодії іммобілізованих ГПК із катехоламінами та поліфенолами на межі розділу фаз для твердофазно-спектрофотометричного їх визначення;
- розробити оптимальні умови для візуального тест-визначення загального вмісту катехоламінів та поліфенолів із застосуванням іммобілізованих «жовтих» форм ГПК;
- охарактеризувати метрологічні характеристики розроблених твердофазно-спектрофотометричних та візуальних тест-методик із застосуванням робочих розчинів та провести їх апробацію при аналізі лікарських препаратів, сечі, біологічно активних добавок та напоїв.

*Об'єкт дослідження:* окиснені молібдостибієвофосфатна та молібдовольфрамфосфатна гетерополікислоти структури Кеггіна, адсорбовані на кремнеземі, модифікованому тетрадециламонію нітратом.

*Предмет дослідження:* взаємодія іммобілізованих на органомінеральному аніоніті на основі кремнезему молібдостибієвофосфатної і молібдовольфрамфосфатної гетерополікислот з органічними відновниками природного походження, зокрема адреналіном, дофаміном, кверцетином та таніном.

*Методи дослідження:* адсорбція, УФ/Вид-,  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопія, термодесорбція, молекулярно-абсорбційна та емісійна спектроскопія у розчині, твердофазна спектрофотометрія, спектроскопія дифузного відбиття, рН-потенціометрія, кольорометрія.

*Наукова новизна отриманих результатів* полягає у розробці окисно-відновних твердофазних реагентів на основі силікагелю послідовно модифікованого тетрадециламоній нітратом (ТДАН) та окисненими формами фосфатних гетерополікіслот. Встановлено закономірності сорбційного вилучення «жовтих» форм молібдостибієвофосфатного (ГПК1) і молібдовольфрамофосфатного (ГПК2) гетерополіаніонів. Методами адсорбції, термодесорбції та спектроскопії встановлено, що закріплення ГПК на поверхні модифікованого ТДАН силікагелю відбувається як за іоно-асоціативним механізмом, так і завдяки утворенню водневих зв'язків з ОН-групами кремнезему, що за умов утворення моношару сприяє міцному утримуванню ГПК на поверхні кремнезему та стабілізації її окисненої форми. Показано, що при ємності сорбенту за ГПК, що відповідає ділянці моно шару, на поверхні формуються іонні асоціати (ІА) із співвідношенням ТДАН:ГПК1 = 6:1 та ТДАН:ГПК2 = 3:1. Ліпшою аналітичною формою для ТСФ і ВТ визначення катехоламінів є іммобілізована ГПК1. Для визначення поліфенолів та оцінки антиоксидантної активності більш чутливою є ГПК2, іммобілізована за полімолекулярним механізмом. За оптимальних умов перебігу гетерофазних редокс реакцій іммобілізовані на силікагелі окиснені форми ГПК відновлюються катехоламінами (адреналіном, дофаміном) та поліфенолами (кверцетином, таніном), що супроводжується контрастною зміною забарвлення сорбенту. На основі іммобілізованої на кремнеземі ГПК2 розроблено твердофазний реагент для ТСФ визначення загального вмісту поліфенолів та візуальний тест-метод для оцінки загальної антиоксидантної активності. Межа виявлення поліфенолів за кверцетином та таніном становить 1,0 і 14 мг/л, відповідно. На основі іммобілізованої ГПК1 розроблено ТСФ та ВТ методики для визначення загального вмісту катехоламінів. Межа

виявлення адреналіну та дофаміну становить 1,7 та 10 мг/г, відповідно. Розроблено кольорові тест-шкали для визначення катехоламінів та оцінки антиоксидантної активності за стандартом кверцетин і танін у межах (мг/л) відповідно: 3,0–34 та 1,0–36, 5,0–179.

Новизну отриманих результатів підтверджено двома патентами України на винахід.

**Практичне значення одержаних результатів.** ТР на основі силікагелю послідовно модифікованого ТДАН та ГПК1 запропоновано для ТСФ та ВТ визначення катехоламінів у фармацевтичних препаратах місцевих анестезій і біологічних рідинах. Тест-визначення адреналіну у фармпрепаратах не вимагає проведення попередньої пробопідготовки Розроблені методики є простими та експресними і можуть бути використані для цілей фармацевтичного та клінічного аналізу. На основі іммобілізованої ГПК2 розроблено ТСФ та ВТ методики для визначення загального вмісту поліфенолів та оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів, вин і фруктових соків. Методики характеризуються задовільними правильністю та повторюваністю. Порівняно з кращими аналогами підвищено чутливість визначення і вибірковість методики відносно аскорбінової кислоти.

Окремі матеріали дисертаційної роботи, а саме твердофазно-спектрофотометричне та візуальне тест-визначення кверцетину, впроваджено у навчальні практикуми спецкурсів „Методи молекулярної спектроскопії” та „Фотометричний та люмінесцентний аналіз об’єктів довкілля” для студентів ІV курсу підготовки за ОКР «Бакалавр хімії» хімічного факультету Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

**Особистий внесок здобувача.** Постановка задачі досліджень здійснювалась науковим керівником за участі дисертанта. Аналіз даних літератури і експериментальні дослідження проводились автором самостійно. Обговорення, узагальнення, тлумачення результатів досліджень та формулювання загальних висновків проводилося спільно з науковим керівником д.х.н., проф. Запорожець О.А. Обробка результатів

спектроскопічних досліджень методом кольорометрії при розробці тест-шкал здійснювалась за участю к.х.н., доц. Зінько Л. С. Експериментальні дослідження закріплення ГПК на поверхні проводились за участю к.х.н., м.н.с. Качана І. А., дослідження гетерофазної взаємодії іммобілізованих ГПК з поліфенолами та катехоламинами проводились за участі студентів Петрух М. В. та Манчук В. В.

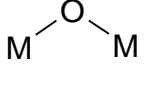
**Апробація результатів дисертації.** Основні результати роботи було оприлюднено на: X Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 18–19 травня 2009 р.); 76-й науковій конференції молодих вчених, аспірантів та студентів «Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у XXI столітті» (Київ, 12–13 квітня 2010 р.); VIII Всеукраїнської конференції молодих учених, студентів та аспірантів з актуальних питань хімії (Харків, 11–14 травня 2010 р.); XI Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 18–19 травня 2010 р.); Третій Всеукраїнській науково-практичній конференції «Вода: проблеми і шляхи вирішення» (Житомир, 21–22 грудня 2010 р.); XII Всеукраїнській конференції з міжнародною участю студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 18–20 травня 2011 р.); XIII науковій конференції «Львівські хімічні читання – 2011» (Львів, 28 травня – 1 червня 2011 р.); VI спільній науковій конференції з хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка та університету Поля Сабатьє, м. Тулуза (Тулуза, Франція, 1–3 червня 2011 р.); XIII Всеукраїнській конференції студентів та аспірантів «Сучасні проблеми хімії» (Київ, 24–26 квітня 2012 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових робіт, з них: 5 статей, дві з яких у високорейтингових міжнародних журналах, 2 патенти України на винахід та 9 тез доповідей на наукових конференціях, в тому числі і міжнародних.

## РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ. ІНДИКАТОРНІ СИСТЕМИ НА ОСНОВІ ГЕТЕРОПОЛІКИСЛОТ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ВІДНОВНИКІВ

### 1.1. Будова та властивості гетерополікіслот.

Гетерополікіслотами (ГПК) називають похідні оксигеновмісних неорганічних кислот, в яких іони  $O^{2-}$  повністю або частково заміщені кислотними залишками інших кислот, загальної формули  $[X_xM_mO_y]$ , де  $X$  – гетероатом (центральный атом), яким найчастіше виступають  $P^V$ ,  $Si^{IV}$ ,  $As^V$ ,  $Ge^{IV}$  тощо,  $M$  –  $Mo$ ,  $W$ ,  $Nb$ ,  $Ta$ ,  $V$  або суміш цих елементів у найвищих ступенях окиснення [1]. На сьогоднішній день для ГПК молібдену, вольфраму і ванадію відомо понад 20 типів структур, які містять від 4 до 40 атомів металів і від 1 до 9 гетероатомів [2], однак найбільше застосування як в аналітичній хімії, так і у каталізі знайшли ГПК структури Кеггіна та Доусона.

Структура Кеггіна для аніону  $XM_{12}O_{40}^{n-}$  показана на рис.1. Вона включає центральний тетраедр  $XO_4$ , оточений 12-ма октаедрами  $MO_6$ , які мають спільні вершини та ребра. Октаедри  $MO_6$  з'єднані у чотири тріади  $M_3O_{13}$ , які з'єднані між собою спільними вершинами. Радіус гетерополіаніону (ГПА) дорівнює  $\sim 0,6$  нм. ГПА містить 12 квазілінійних зв'язків  $M-O-M$  між октаедрами, які входять в різні тріади, 12 кутових зв'язків  між октаедрами всередині однієї тріади, 4 зв'язки  $X-O-M$ , якими тріади з'єднані з центральним атомом, і 12 кінцевих зв'язків  $M=O$  [3]. Кеггінівська структура досить стійка, вона зберігається в процесах гідратації–дегідратації і розчинення ГПК, а також при заміщенні металу в ГПА, заміні катіонів в зовнішній сфері і при неглибоких окисно–відновних перетвореннях [4].

ГПК структури Доусона (рис. 1.1) – ненасичені гетерополіаніони 9-го ряду  $XM_9$  отримують із сполук 12-го ряду видаленням фрагменту  $M_3O_{13}$  з наступною димеризацією та утворенням двоядерних похідних загальною формулою  $X_2M_{18}O_{62}^{n-}$ .

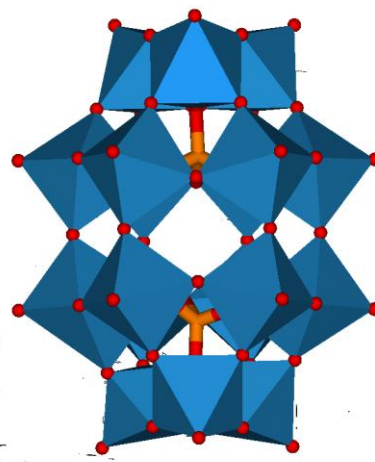
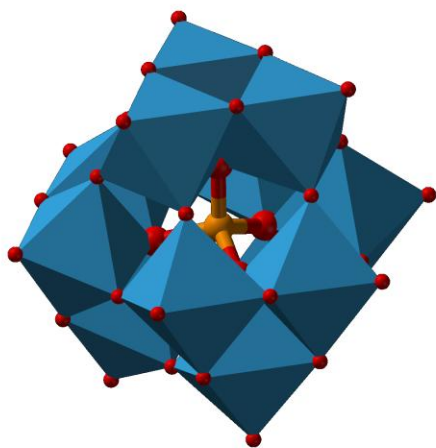
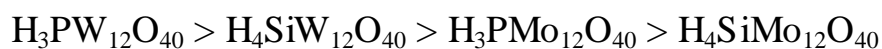


Рис.1.1. Структура Кеггіна  $X\text{M}_{12}\text{O}_{40}^{n-}$       Рис.1.2. Структура Доусона  $X_2\text{M}_{18}\text{O}_{62}^{n-}$

Найбільш вивчені та найчастіше застосовуються в аналітичній хімії для визначення як неорганічних, так і органічних сполук ГПК структури Кеггіна.

ГПК структури Кеггіна у водних розчинах є багатоосновними кислотами [5–7], які значно перевищують по силі звичайні мінеральні кислоти [8]. В розчині ГПК повністю дисоціюють за першими трьома ступенями [9]. За силою ГПК можна розмістити в ряд [10]

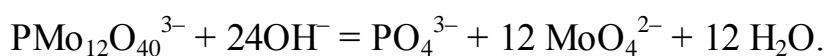


Видно, що вольфрамові ГПК сильніші за молібденові. Деякий вплив на силу ГПК проявляє і природа центрального атома, так, ГПК P(V) сильніші за ГПК Si(IV). Крім того сила ГПК знижується при переході від окиснених форм до відновлених. [9].

Форми ГПК у розчині суттєво залежать від кислотності середовища, концентрації сполуки, а також природи розчинника [11]. ГПА утворюються та існують у кислих розчинах. У слабо кислому середовищі ГПА гідролізують з утворенням сполук ненасиченого 11-го ряду [9]:



У лужному середовищі ГПА повністю руйнуються з утворенням аніонів простих кислот відповідних гетероатомів та металів:



Стійкість гетерополіаніону до гідролізу у водних розчинах знижується в ряду металів  $W > Mo > V$  [11].

ГПК структури Кеггіна мають унікальну здатність до зворотного відновлення, внаслідок чого утворюються інтенсивно забарвлені у синій колір змішановалентні сполуки, наприклад:

$$XM_{12}^{VI}O_{40}^{x-8} + ne^{-} + mH^{+} \leftrightarrow H_mXM_{12-n}^{IV}M_n^{IV}O_{40}^{x+m-n-8}$$
, де  $x$  – валентність гетероатома, а  $m \leq n$  [12].

Окиснені форми ГПК поглинають в УФ ділянці спектру (при 250–300 нм). Для відновлених ГПК характерним є поглинання у видимій ділянці спектру (при 600–1100 нм), що обумовлено присутністю в цих сполуках двох валентних форм гетероатома у різних ступенях окиснення  $M^n - M^{n-1}$  [13]. При відновленні ГПК структури Кеггіна можливі чотири двоелектронні переходи [14]. При цьому від двох до восьми атомів ліганду змінюють свій ступень окиснення на одиницю. Відомо, що спектральні характеристики «синіх» форм ГПК змінюються залежно від кількості відновлених атомів ліганду, що в свою чергу залежить від використаного відновника [15]. Зокрема, при відновленні ГПК відновниками середньої сили, такими як аскорбінова кислота, утворюються продукти відновлення, які містять, як правило, чотири відновлені атоми ліганду.

Окисно-відновна здатність ГПК збільшується в ряду центральних атомів:  $Si < Ge < P < As$  [16]. Ця закономірність спостерігається у молібденових, вольфрамових і змішаних сполуках. Молібденові ГПК більш сильні окисники, ніж вольфрамові, тому у змішаних молібдовольфраматах, які проявляють властивості молібдену та вольфраму, в першу чергу відновлюються атоми молібдену. При цьому, чим більше атомів молібдену у складі ГПК, тим більший її окисно-відновний потенціал [17].

Отже, завдяки своїм властивостям, зокрема здатності до оборотної окисно-відновної взаємодії, з одночасним контрастним кольоровим переходом від окисненої до відновленої форми, та високим молярним коефіцієнтам поглинання, перспективним напрямком застосування ГПК у практиці аналізу,

зокрема, і спектрофотометричного, є використання їх як окисно-відновних реагентів. Одними з кращих для визначення відновників з точки зору стабільності у розчині та величини окисно-відновного потенціалу мають бути різнолігандні ГПК молібдену і вольфраму, що містять декілька гетероатомів.

## 1.2. Застосування ГПК як окисно-відновних аналітичних реагентів

Окиснені та відновлені форми ГПК і дотепер залишаються основними аналітичними формами для визначення таких елементів як Фосфор [18–22], Силіцій [23–26], Арсен [27–32], також їх використовують для визначення Германію [33, 34], Титану [35], Галію [36–38], кобальту [39] та інших елементів [40]. Крім того відновлені форми ГПК успішно використовують для визначення окисників, наприклад, нітритів [41–43] та нітратів [44], а окиснені форми – низки неорганічних та органічних відновників [45], зокрема сірководню [45], стануму (II) [46], гідразинів [47], катехоламінів [48, 49] та аскорбінової кислоти [50–53].

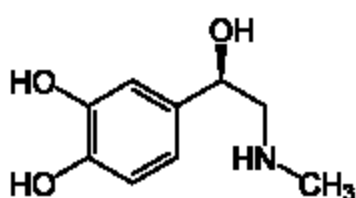
Так в роботі [54] для спектрофотометричного (СФ) визначення аскорбінової кислоти (Аск) запропоновано використовувати молібдостибієвофосфатну (ГПК1) та молібдовольфрамофосфатну (ГПК2) гетерополікислоти. Чутливість методики при застосуванні ГПК2 у 5 разів вища порівняно з ГПК1. Межа виявлення відповідно становить 0,2 і 1,0 мг/л. Однак ці методики є недостатньо вибірковими: визначенню Аск заважають цукри, сульфіти, гідрохінон, фенол, танін, пірокатехін, резорцин і пірамідон.

Підвищення чутливості визначення аскорбінової кислоти досягається при застосуванні молібдофосфатного гетерополіаніону структури Доусона  $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$  [55, 56]. Відновлення ГПК аскорбіновою кислотою відбувається миттєво при  $pH = 3,75-4,25$  при цьому утворюється інтенсивно забарвлена в синій колір сполука з молярним коефіцієнтом поглинання  $\epsilon_{680} = 2,16 \cdot 10^4$  л/моль·см. Методика була використана для визначення Аск у фармацевтичних препаратах і вітамінах. Межа виявлення становить 0,2 мг/л.

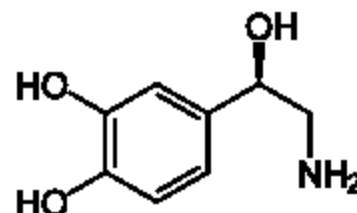
ГПК різної природи також запропоновано використовувати для визначення поліфенолів і біологічно активних амінів, зокрема катехоламінів [57].

### 1.3. Методи визначення катехоламінів

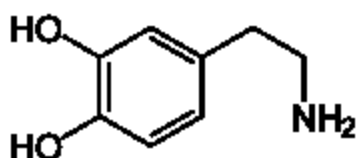
Катехоламіни – фізіологічно-активні речовини, які виконують роль хімічних посередників, медіаторів і нейрогормонів в міжклітинних взаємодіях в організмах тварин і людини. Катехоламіни є похідними пірокатехіну, до них належать такі нейромедіатори, як адреналін (епінефрин), норадреналін (норепінефрин), дофамін (допамін) та L-допа (рис. 1.3).



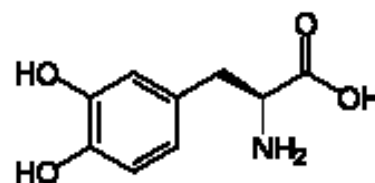
Адреналін



Норадреналін



Дофамін



L-дігідроксофенілаланін (L-Дофа)

Рис. 1.3. Структурні формули представників класу катехоламінів

Адреналін – головний гормон мозкового шару наднирників, норадреналін, як і адреналін, виконує функції гормону мозкового шару наднирників і медіатору центральної і симпатичної нервових систем. Дофамін – попередник норадреналіну і медіатор ЦНС, L-Дофа – бере участь у біосинтезі катехоламінів [58]. Визначення катехоламінів у біологічних рідинах має важливе значення у клінічній діагностиці різних хвороб, оскільки зміна їх концентрацій у біологічних рідинах є індикатором багатьох патологічних станів організму, зокрема інфаркту міокарду, атеросклерозу на різних стадіях, феохромоцитомі [59].

Більшість методик визначення катехоламінів ґрунтуються на їх окисно-

відновних властивостях. Найбільш широко для їх визначення застосовуються титриметричні, спектрофотометричні, люмінесцентні та електрохімічні методики.

*Титриметричні методики* визначення, згідно Фармакопеям, використовуються для контролю вмісту катехоламінів у фармацевтичних препаратах. За даними міжнародної фармакопеї [60] титрування адреналіну та дофаміну проводять 0,1 М хлорною кислотою у середовищі безводної оцтової кислоти. Як індикатори точки кінця титрування використовують метиловий-фіолетовий при визначення адреналіну та кристалічний фіолетовий при визначенні дофаміну. У Державній фармакопеї України прописана методика титриметричного визначення адреналіну у середовищі безводного мурашиного альдегіду та оцтового ангідриду. Титрування здійснюється 0,1 М хлорною кислотою з потенціометричним встановленням точки еквівалентності [61] або індикатором кристалічним фіолетовим [62].

Титриметричні методики не застосовуються для визначення катехоламінів в біологічних об'єктах, оскільки вони мають незадовільну чутливість та вибірковість, межа виявлення катехоламінів становить  $n \cdot 10^{-2}$  моль/л.

В роботі [63] запропоновано кількісно визначати адреналін та норадреналін у розчині *полярнографічним методом*. Чутливість визначення становить  $10^{-5}$  моль/л. Для попереднього розділення катехоламінів було використано метод В. О. Осинської [64]. Однак, не зважаючи на досить високу чутливість методу, головним його недоліком є незадовільна вибірковість та відтворюваність, тому широкого застосування полярнографічні методики не знайшли.

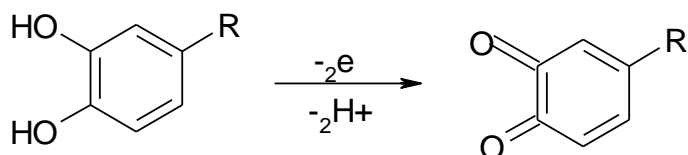
В роботі [65] показана можливість застосування *кулонометричного титрування* для визначення катехоламінів. Для проведення аналізу таким методом отримували електрогенерований  $I_2$  із розчину KI в тартратному буфері та електрогенеровані  $Br_2$  і  $Cl_2$  із розчинів KBr і KCl в середовищі  $H_2SO_4$ . Встановлено, що адреналін реагує швидко та кількісно тільки з

електрогенерованими  $\text{Br}_2$  та  $\text{I}_2$  за участю 3 молекул галогену. З  $\text{Cl}_2$  реакція протікає з утворенням різних продуктів. Дофамін взаємодіє лише з електрогенерованими  $\text{Br}_2$  та  $\text{Cl}_2$  за участю 2 молекул галогену.

Дану методику було апробовано методом „введено–знайдено” для визначення адреналіну та дофаміну у фармацевтичних препаратах. Методика має задовільні аналітичні характеристики, однак проведення аналізу ускладнюється побічними реакціями адреналіну з хлором.

Широко для визначення катехоламінів застосовують *вольтамперометричні методику*. Для селективного визначення катехоламінів застосовують полікристалічні золоті електроди з рядом модифікацій, платинові та паладієві електроди [66]. Крім цього катехоламіни визначають окисненням на скловугільному та графітовому електродах, реєструючи на циклічних вольтамперограмах зворотні хвилі окиснення.

Гідрохінон та подібні сполуки, що містять у своїй структурі гідрохіноновий фрагмент, окиснюються за двоелектронним механізмом, що відбувається за схемою:



В роботі [65] для кількісного визначення катехоламінів (адреналіну, дофаміну) використовували метод циклічної вольтамперометрії на графітовому та скловуглецевому електродах. Визначення проводили у середовищі 0,1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , щоб уникнути окиснення гідрохінонового фрагменту молекули катехоламінів киснем повітря. Авторами встановлено, що при окисненні катехоламінів на графітовому електроді максимум оберненої хвилі окиснення спостерігається при 0,7 В, а МВ адреналіну і дофаміну при цьому становить 16 мкмоль/л та 33 мкмоль/л відповідно. При проведенні реакції окиснення на скловугільному електроді обернений пік спостерігається при

0,58 В, при цьому дещо знижується МВ адреналіну до 11 мкмоль/л. Значення МВ дофаміну не залежить від типу використаного електроду. Правильність методики перевірено методом „введено–знайдено”, вона характеризується задовільними аналітичними характеристиками, однак, чутливості методики достатньо для кількісного аналізу тільки лікарських форм катехоламінів (розчину адреналіну гідротартрату та дофаміну гідрохлориду).

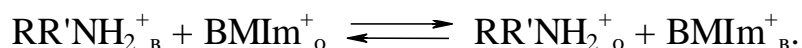
В роботі [67] електрохімічну поведінку адреналіну вивчали за допомогою циклічної вольтамперометрії на золотому електроді, модифікованому самоорганізованим моношаром  $\beta$ -меркаптоетанолу. При рН 4 перша хвиля окиснення адреналіну спостерігалася при  $-0,444$  В. Для норадреналіну та дофаміну вона була відсутня. Діапазон лінійності ГГ становив 0,1 мкмоль/л – 0,1 ммоль/л, МВ – 0,033 мкмоль/л. Визначенню 8 мкмоль/л адреналіну за таких умов не заважають 10-кратний надлишок норадреналіну та 40-кратний надлишок дофаміну. Методику апробовано при аналізі фармацевтичних форм.

Полікристалічний електрод, що модифікований наночастинками золота іммобілізованими на самоорганізованому моношарі аміносполук, використовували для селективного визначення дофаміну в присутності аскорбінової кислоти [68]. На вольтамперограмах спостерігалися чіткі розділені піки завдяки зсуву окисного потенціалу аскорбінової кислоти в бік менш позитивного потенціалу через високу каталітичну активність наночастинок золота. Межа виявлення дофаміну становила 0,13 мкмоль/л.

З використанням екстракту гриба *Pleurotus ostreatus* для визначення адреналіну та дофаміну був розроблений біосенсор на основі вугільного пастового електроду [69, 70]. Даний екстракт містить фермент – лактазу, що каталізує окиснення катехоламінів до відповідних хінонів. Межі лінійності для адреналіну зберігаються в межах 0,06–0,7 ммоль/л, а для дофаміну – 0,07–0,4 ммоль/л. МВ адреналіну та дофаміну становить 7,9 мкмоль/л та 9,8 мкмоль/л відповідно.

У роботі [71] був розроблений мікроелектрод з вуглеволокна для визначення адреналіну. Для збільшення адсорбції визначуваної речовини відносно поверхні електроду проводилася його електрохімічна активація, що виконувалася відразу ж після процедури полірування шляхом циклічного сканування електроду від 0,0 до 1,500 В зі швидкістю 200 мВ/с в середовищі 0,04 М фосфатного буферного розчину ( $\text{H}_3\text{PO}_4/\text{H}_2\text{PO}_4^-$  рН = 3). Активація електроду відбувалася за рахунок появи на ньому залишкового струму. МВ адреналіну після активації електроду становила 27,6 нг/мл. МВ досить низька, однак вона залежить від підготовки електроду та відрізняється від партії до партії електроду, оскільки процес його виготовлення включає процедури шліфування та полірування.

В роботі [72] показано можливість визначення катехоламінів екстракційно-вольтамперометричним методом. Для екстракції адреналіну використовували іонні рідини – органічні солі, які за кімнатної температури перебувають у розплавленому стані, а саме гексафторфосфат  $\text{BMImPF}_6$  та біс(трифторметилсульфоніл)іміді-1-бутил-3-метилімідазол  $\text{BMImTf}_2\text{N}$ . Автори припускають, що катехоламіни екстрагуються в катіонній формі і, ймовірно, протікає катіонообмінна екстракція з переходом катіону катехоламонію  $\text{RR}'\text{NH}_2^+$  в органічну фазу, а катіону йонної рідини – у водну фазу, що схематично можна представити так:



Подібний іонний обмін був описаний для катіонів амінокислот і металів із води в  $\text{BMImPF}_6$  [73–75]. Співвідношення об'ємів водної і органічної фаз складає 3:1, час встановлення рівноваги в такій екстракційній системі не перевищує 15 хв. Ступінь вилучення катехоламінів не залежить від кислотності водної фази в широкому діапазоні рН (до рН 9). До переваг методу також можна віднести екологічну безпеку іонних рідин. У порівнянні зі звичайними розчинниками, вони нелеткі, вибухобезпечні, а також малотоксичні. Однак, вивчення вольтамперограм розчинів адреналіну в  $\text{BMImPF}_6$  показало, що аналітичний сигнал є не відтворюваним через

незадовільну стійкість адреналіну. При використанні як екстрагенту  $\text{VImTf}_2\text{N}$  було отримано прямолінійну залежність висоти вольтамперометричної хвилі від концентрації адреналіну, але ступінь вилучення аналіту у фазу такої іонної рідини становить лише 11 %. Це свідчить, що визначення сполук класу катехоламінів таким методом буде залежати від ступеня їх гідрофобності.

Гідроксильні групи молекул катехоламінів здатні до швидкого і зворотного утворення ковалентних ефірних зв'язків з похідними борної кислоти [76]. Гідрофобні борвмісні реагенти можуть слугувати електроактивними компонентами потенціометричних датчиків для експресного і простого визначення полігідроксисполук *потенціометричним методом*. Показана можливість визначення катехоламінів (адреналіну, норадреналіну та дофаміну) з використанням пластифікованого мембранного електроду на основі 3-(4-толїлазо)фенілборної кислоти [76]. Межі лінійності при визначенні катехоламінів таким методом зберігаються в діапазоні 0,5–5,7 ммоль/л для адреналіну та 0,1–10 ммоль/л – для дофаміну, а МВ цих сполук становить 0,25 та 0,06 ммоль/л відповідно. Такий метод придатний для визначення катехоламінів у фармацевтичних препаратах, де вміст аналіту досить значний. Крім того чутливість електродноактивного компоненту мембрани залежить від гідрофобності катехоламіну. Зі зменшенням гідрофобності в ряду дофамін > адреналін > норадреналін значно звужується діапазон лінійності, зростає межа виявлення та погіршується відтворюваність вимірювань потенціалу.

Запропоновано *амперометричну методику* одночасного визначення аскорбінової кислоти, адреналіну та дофаміну з використанням золотого електроду, а також електродів, модифікованих шляхом електроосадження платини, паладію та суміші платини–паладію [77]. Аналіз виконувався багаторазовим методом калібрування, використовуючи 16 стандартних розчинів. Вимірювання проводилося на потенціостаті з чотирма каналами.

Досить перспективним для визначення катехоламінів є метод *капілярного*

*електрофорезу з УФ-* [78], мас-спектрометричним [79, 80], амперометричним [81] та люмінесцентним [77.] детектуванням. Компоненти зразка у капілярному електрофорезі розділяються за рахунок їх різних електрофоретичних рухливостей. Основними перевагами цього методу є мала кількість зразка, що вводиться (2 нл) й мала кількість реагентів, що необхідні для визначення.

*Хроматографічні* методи широко застосовуються у якісному та кількісному аналізі багатьох органічних сполук, зокрема катехоламінів [68]. Через полярність та низьку леткість катехоламінів, для газохроматографічного визначення їх необхідно переводити у леткі похідні. Тому одним з основних методів визначення катехоламінів залишається обернено-фазова ВЕРХ з амперометричним [82, 83], флуориметричним [84], спектрофотометричним [85] детектуванням тощо. Основним недоліком визначення методом ВЕРХ є тривала пробопідготовка, а також висока собівартість аналізу.

Для визначення катехоламінів у різноманітних об'єктах широко застосовують *люмінесцентні та хемілюмінесцентні* методи [86–93]. Люмінесцентні методи вважаються одними з найчутливіших при визначенні катехоламінів у біологічних об'єктах. Як правило, вони передбачають попереднє розділення катехоламінів, їхнє окиснення до адренохрому за допомогою перйодату чи гексаціаноферату (III) калію та наступним перетворенням у лужному середовищі до 3,5,6-тригідроксиіндолів, що мають флуоресцентні властивості. Останні є нестабільними при високих значеннях рН розчину за відсутності відновника, наприклад аскорбінової кислоти [191]. Такі методики використовують для окремого визначення адреналіну, норадреналіну та інших катехоламінів. Здатність катехоламінів до люмінесценції у жовтому діапазоні спектру [192] покладено в основу низки методик їхнього визначення за власною люмінесценцією [193, 194]. На відміну від методик, які передбачають попередню дериватизацію, вони менш чутливі, однак простіші для виконання і експресніші, що робить перспективним їхнє застосування у клінічному аналізі [195].

Розрізняють два способи пробопідготовки, які застосовують у цих методах. Перший спосіб – етилендіаміновий – базуються на утворення продуктів конденсації катехоламінів з етилендіаміном, здатних до люмінесценції. Застосування етилендіамінового способу описано у роботі [87]. Визначення адреналіну базувалося на вимірюванні люмінесценції продукту його конденсації з *o*-фенілдіаміном. Лінійність ГГ зберігається в межах 0,02–6 мкмоль/л, МВ становить 9,3 нмоль/л. Етилендіаміновий спосіб, хоча і є досить чутливим, широкого використання в аналітичній практиці не знайшли, оскільки включає складні процедури аналізу.

Друга спосіб пробопідготовки – триоксиіндоловий – базується на перетворенні катехоламінів у люмінесцентні продукти окиснення – лютини, що мають жовто-зелену люмінесценцію під дією УФ–випромінювання [66, 86]. Такий спосіб пробопідготовки найчастіше застосовують для аналізу біологічних рідин.

Стандартною флуорометричною методикою визначення катехоламінів можна вважати диференційно-флуорометричну методику В. О. Осинської [88] та А. М. Бару [89]. На сьогодні в клінічній лабораторній практиці для визначення адреналіну, норадреналіну та дофаміну рекомендують використовувати об'єднаний метод Осинської та Бару [90]. Суть методики полягає у вилученні катехоламінів із сечі шляхом адсорбції на  $Al_2O_3$  при рН 8,2–8,5. Далі десорбують катехоламіни 0,5 М сульфатною кислотою. Диференціацію сполук проводять шляхом окиснення йодом при різних значеннях кислотності середовища (рН = 4,6; рН = 7,2). Отримані розчини флуорометрують в діапазонах довжин хвиль 360–400 нм і 500–550 нм. Вміст катехоламінів визначають по різниці значень аналітичного сигналу між трьома пробами, люмінесценція яких обумовлена речовинами відмінної від катехоламінів природи, сумішшю адренолютину та іншими речовинами не катехоламінової природи та продуктами перетворення адреналіну, норадреналіну, дофаміну та некатехоламінів.

В роботі [91] визначення катехоламінів базувалося на люмінесценції, яка зростала при використанні системи «люмінал – періодат калію». В оптимальних умовах діапазон лінійності складав для Адр – 0,1–100 нг/мл, норадреналіну – 5–50 нг/мл, дофаміну – 0,1–10 нг/мл, а межа виявлення – 0,01 нг/мл, 0,1 нг/мл, 0,02 нг/мл, відповідно. Дана методика була використана для аналізу фармпрепаратів.

Описана проточно-інжекційна методика хемілюмінесцентного визначення адреналіну з використанням полімеру, отриманого шляхом молекулярного імпринтингу. Такий полімер дає відгук на молекули певної форми [92]. Синтез полімеру включає розчинення адреналіну, метакрилатної кислоти та етиленглікольдиметакрилату у бензойній кислоті та ацетонітрилі, додавання 2,2'-азобіс(2-метилпропінітрилу), обробку отриманої суміші азотом та полімеризацію при 65 °С впродовж 24 годин. Отриманий полімер, який містить аналіт, обробляють люмінолом у лужному розчині у присутності гексаціаноферату та гексаціанофериту та вимірюють інтенсивність хемілюмінесценції, яка лінійно залежить від логарифму концентрації адреналіну в діапазоні 1–22 мкг/л. Межа виявлення становить 0,7 мкг/л. Чутливість даної методики досить висока, однак вона передбачає складний синтез полімеру.

У роботі [93] описано визначення адреналіну та дофаміну у сумішах кінетико-флуорометричним методом, який базується на різниці швидкостей каталітичного синтезу й розпаду флуоресціюючих похідних катехоламінів 3,5,6-тригідросиіндолем. Таким методом можна визначати адреналін у межах 0,05–1,2 мкмоль/л та норадреналін в межах 0,03–1,4 мкмоль/л.

Триоксиндоловий спосіб дає можливість селективно і чутливо визначати L-норадреналіну і L-адреналіну, але не має достатньої чутливості для визначення дофаміну.

В основу *спектрофотометричних* (СФ) методів визначення катехоламінів покладено утворення забарвлених продуктів їх взаємодії з різноманітними реагентами.

Так, спектрофотометрично у розчині адреналін визначають за реакцією з Fe (III) [94]. Як похідне пірокатехіну, адреналін при взаємодії з іонами Fe (III) утворює комплексну сполуку смарагдово-зеленого кольору, що при додаванні розчину амоніаку переходить у сполуку вишнево-червоного, а потім помаранчево-червоного кольору. Таким методом визначають вміст адреналіну у фармацевтичних препаратах.

У роботі [95] запропонована методика для непрямого спектрофотометричного визначення невеликих кількостей катехоламінів за реакцією з періодатами. Катехоламіни окиснюються періодатом у кислому середовищі. Методика базується на визначенні кількості періодату, що не прореагував. Періодат взаємодіє з йодидом з утворенням йоду. Утворений йод взаємодіє з метиленовим блакитним та знебарвлює останній. Отже, спостерігається зворотна залежність між вмістом катехоламінів та вимірною оптичною густиною розчину. МВ адреналіну становить 0,10 мг/л. Як окисник використовують розчин йоду [96] у присутності гідротартратного буферного розчину з рН = 3,56. При цьому утворюється адренохром темно-червоного кольору. У середовищі тартратного буферного розчину з рН = 6,5 утворюється сполука червоно-фіолетового забарвлення. Перевагою такого методу визначення є можливість з однієї проби визначити адреналін та норадреналін, який утворює забарвлення тільки при рН = 6,5. Однак такі методики є багатостадійним та довготривалим, що є значним недоліком для проведення рутинних аналізів.

Особливе місце серед відомих методів визначення катехоламінів завдяки своїй простоті та точності належить СФ методам із застосуванням ГПК. Так, запропонована СФ методика визначення адреналіну і норадреналіну у біологічних об'єктах, що базується на здатності катехоламінів за певних умов відновлювати молібдоарсенатну геторополікислоту (реакція Уайтхорна) [48, 49]. Детектування аналітів здійснюють вимірюванням поглинання забарвлених у синій колір продуктів відновлення. Методика придатна для визначення 0,04–0,12 мг/л адреналіну та 0,02 – 1,0 мг/л норадреналіну. Аналіз

біологічних об'єктів на вміст катехоламінів обов'язково включає стадію їх відокремлення та очищення від речовин неадреналінової природи, оскільки вони також можуть взаємодіяти з молібдоарсенатною ГПК. Пробопідготовка зразка при аналізі включає попереднє окиснення катехоламінів лугом. Відомо, що короточасна обробка адреналіну лугом збільшує інтенсивність забарвлення розчину ГПК в два–п'ять разів [49], що можна пояснити здатністю відновлювати молібдоарсенатну кислоту діюльними сполуками. Отже, після обробки адреналіну лугом збільшення інтенсивності забарвлення розчину спричинене продуктом окиснення адреналіну, що містить гідроксильні групи і є більш сильним відновником, ніж сам адреналін. Виходячи з цього, було запропоновано схему окиснення адреналіну [97]:

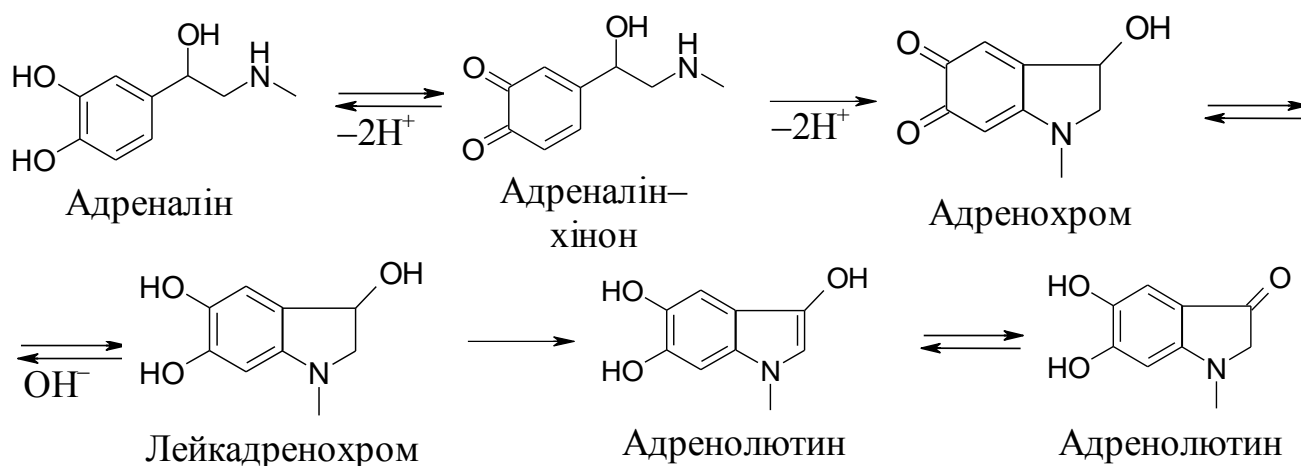


Рис.1.4. Схема окиснення адреналіну у присутності лугу

Перший продукт – адреналін-хінон – при наявності відновників легко відновлюється до адреналіну. Він не відновлює реактив Уайтхорна через те, що не містить гідроксильних груп в хіноновому ядрі. Адренохром також не відновлює молібдоарсенатну ГПК з тієї ж самої причини. В присутності гідроксид-іонів адренохром перетворюється в лейкадренохром, який має гідроксильні групи в орто-положенні. Подальше окиснення призводить до перебудови молекули адренохрому з утворенням адренолютину (3,5,6-триоксиіндол), який може відновлювати молібдоарсенатну ГПК. Потім відбувається полімеризація молекул продукту окиснення з утворенням меланінів, які не мають відновних властивостей. Таким чином, серед

продуктів окиснення адреналіну, тільки лейкадренохром і адренोलютин можуть відновлювати ГПК.

Відомо, що в сильно лужному середовищі при  $\text{pH} > 10$  катехоламіни існують в аніонній формі [98], а у нейтральному і кислому середовищі при  $\text{pH} < 8$  – у катіонній формі [99] ( $\text{pK}_{\text{a}1} \approx 8,5$ ;  $\text{pK}_{\text{a}2} = 9,8$ ;  $\text{pK}_{\text{a}3} = 11,8$ ;  $\text{pK}_{\text{a}4} = 13,5$ ) [100–102].

### Катіонні форми катехоламінів



### Аніонні форми катехоламінів



Як видно із діаграм розподілу (рис. 1.5), побудованих з використанням спектрофотометричного та титриметричного методів у роботі [102] різні форми катехоламінів у чистому вигляді не можна виділити для аналізу при будь-якому  $\text{pH}$ . Тому для отримання продуктів окиснення адреналіну запропоновані спеціальні способи, зокрема адренохром отримують шляхом обробки адреналіну одним із окисників –  $\text{I}_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{MnO}_2$  при  $\text{pH} 3\text{--}7$  [48].

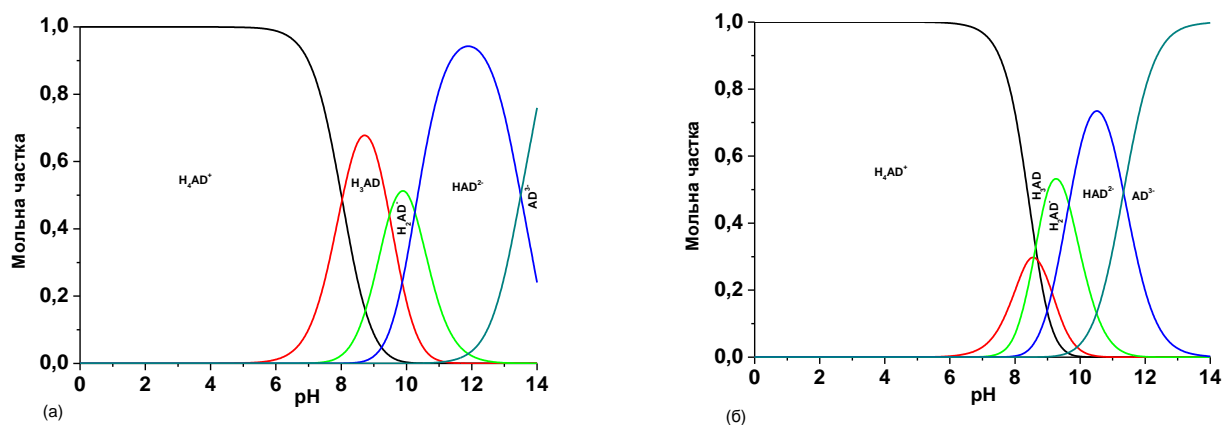


Рис. 1.5. Діаграми розподілу форм адреналіну залежно від рН розчину, отримані методами спектрофотометрії (а) та титриметрії (б)

Підсумовуючи дані літератури, можна зробити висновок про те, що на сьогодні існує досить велика кількість методів визначення катехоламінів, однак, не всі вони задовольняють вимогам щодо вибіркової, чутливості та повторюваності, а деякі з них потребують використання дорогого обладнання та малодоступних реактивів. Так, титриметричні методики можуть бути застосовані лише для стандартизації чистих препаратів катехоламінів. Кращі метрологічні характеристики мають електрохімічні методики, однак їх використання обмежується необхідністю застосування електродів із дорогоцінних металів або модифікаторів, характеристики яких швидко змінюються в процесі експлуатації. Найвищою чутливістю, необхідною для аналізу біологічних рідин, характеризуються люмінесцентні методики, однак, основними їх недоліками є довготривалість та багатостадійність аналізу. Крім того, більшість запропонованих методик є придатними лише для аналізу чистих субстанцій катехоламінів.

СФ методики визначення катехоламінів з використанням ГПК виявились досить чутливими, однак вони мають незадовільну відтворюваність через низьку стабільність ГПК у розчині та існування їх у псевдоколоїдному стані.

З огляду на простоту, доступність та точність значний інтерес викликають ТСФ та візуальні тест-методики для визначення катехоламінів. Розробка окисно-відновних твердофазних реагентів та використання їх як готової аналітичної форми, зокрема і на основі ГПК, має позитивний ефект з

точки зору простоти використання та економічності аналізу. Крім того, актуальною задачею клінічного аналізу є розробка тест систем для експресного моніторингу катехоламінів у зразках різного типу.

#### 1.4. Антиоксиданти та методи їх визначення

На сьогоднішній день розвиток багатьох хвороб пов'язують з руйнівною дією оксидантів – вільних радикалів. Стоннення, розвиток запалень та інфекцій, передчасне старіння, виникнення багатьох важких захворювань – у всіх цих випадках механізми згубних для організму процесів запускаються вільними радикалами [103].

Вільні радикали можуть утворювати сполуки кисню, наприклад пероксид водню, азоту, хлору тощо (табл. 1.2). Розрізняють первинні, вторинні і третинні вільні радикали. Первинні вільні радикали утворюються в процесі життєдіяльності організму як засоби захисту проти бактерій, вірусів, чужорідних клітин, що переродилися (онкоклітин). Вторинні радикали, на відміну від первинних, не виконують фізіологічно корисних функцій. Навпаки, руйнують клітинні структури, прагнучи відняти електрони у «повноцінних» молекул, унаслідок чого «постраждала» молекула сама стає вільним радикалом (третинним), але найчастіше слабким, не здатним до руйнівної дії. Саме утворення вторинних радикалів (а не радикалів взагалі) призводить до розвитку патологічних станів і лежить в основі дегенеративних хвороб.

Таблиця 1.2

#### Вільні радикали і радикалоутворюючі речовини

Формула	Назва	Формула	Назва
$O^{\cdot -}$	Оксид	$H_2O_2$	Гідроген пероксид
$^1O_2$	Диоксиген	$NO^{\cdot}$	Нітроген оксид
$O_2^{\cdot -}$	Супероксид	$LO^{\cdot}, L^{\cdot}, LOO^{\cdot}$	Ліпідні радикали
$O_3$	Озон	$ClO^{\cdot}$	Гіпохлорит
$O_3^{\cdot -}$	Озонід	$RO^{\cdot}$	Алкоксил
$HO^{\cdot}$	Гідроксил	$C_2H_5O^{\cdot}$	Етоксил
$HO_2^{\cdot}$	Гідродіоксид	$RO_2^{\cdot}$	Алкілдіоксил

Відомо [104], що на утворення вільних радикалів в організмі істотно впливають якість харчування і стан довкілля. Радіація, паління, напої з високою окиснювальною здатністю, хлорована вода, забруднене повітря, непомірна кількість консервантів і напівфабрикатів, антибіотики і ксенобіотики, випромінювання від комп'ютерів, телевізорів, мобільних телефонів – чинники, що викликають порушення окисно-відновної рівноваги у бік окиснення та утворення вторинних вільних радикалів.

Останнім часом для боротьби з вільними радикалами в організмі людини використовуються антиоксиданти – речовини природного чи синтетичного походження, здатні нейтралізувати вільні радикали [105]. Існує чотири загальних джерела надходження антиоксидантів до організму:

- низькомолекулярні речовини: вітаміни, поліфеноли, флавоноїди (аскорбінова кислота, сечова кислота, катехіни, поліфеноли, зокрема кверцетин);
- ферменти, наприклад, пероксидаза, каталаза;
- високомолекулярні речовини (альбумін, ферритин та інші протеїни);
- деякі гормони, наприклад естроген, мелатонін.

Механізм дії найбільш поширених антиоксидантів полягає в обриві реакційних ланцюгів: молекули антиоксиданту взаємодіють з активними радикалами з утворенням або малоактивних радикалів, або речовин нерадикальної природи (рис. 1.6). У практиці гальмування окисних процесів велике значення має явище синергізму – взаємного посилення ефективності антиоксидантів у суміші, або у присутності інших речовин.

Широко поширена думка, що антиоксиданти можуть запобігти руйнівній дії вільних радикалів на клітини живих організмів, і тим самим уповільнити процес їх старіння, проте численні результати досліджень не підтвердили цієї гіпотези [106, 107]. Однак доведено, що споживання продуктів, які містять велику кількість антиоксидантів, зменшує ризик захворювань багатьма хворобами [108], в тому числі онкологічних [109].

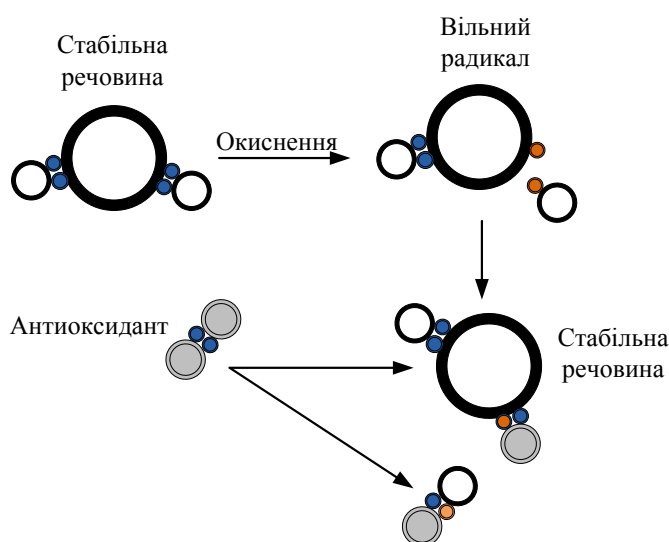


Рис. 1.6. Схема дії сполук, що проявляють антиоксидантні властивості

За механізмом дії антиоксиданти можна розділити на три групи [110]:

1) антиоксиданти, які очищують організм від всіх вільних радикалів, найчастіше відновлюючи їх до стабільних неактивних продуктів (scavenger of free radicals);

2) антиоксиданти, які мають спорідненість до якогось певного вільнорадикального продукту, наприклад спорідненість до синглетного кисню, гідроксил-радикалу (trap of free radicals). Цей тип антиоксидантів часто використовують для уточнення механізму вільнорадикальної реакції;

3) антиоксиданти, що обривають ланцюгову реакцію – речовини, молекули яких більш реакційноздатні, ніж їх радикали (chain breaking antioxidants). Найчастіше це феноли, які легко віддають свої електрони, перетворюючи радикал, з яким вони прореагували, в молекулярний продукт, а самі при цьому перетворюються на слабкий феноксил-радикал, який вже не здатний брати участь в продовженні ланцюгової реакції.

Найбільш дослідженими з антиоксидантів є вітаміни С, Е, В, А (неферментні антиоксиданти), що вводяться ззовні [111]. Аскорбінова кислота або вітамін С нейтралізує окисники, що поступають із забрудненим повітрям ( $\text{NO}^\bullet$ , вільні радикали сигаретного диму), редукуючи канцерогени.

Антиоксидантні властивості багатьох рослинних продуктів значною мірою обумовлено вмістом флавоноїдів, зокрема катехинів, кверцетину і

морину. Катехіни особливо ефективно діють проти вільних радикалів пероксинітриту і гідроксил-радикалу. На відміну від катехіно-подібних речовин кверцетин не зменшує кількість гідроксил радикалів, але зв'язує продукти супероксиданіон-радикалу та має антиканцерогенні властивості [112].

Ферментні антиоксиданти – це ферменти, які виробляються самим організмом. Вони каталізують реакції, в яких активні форми кисню і деякі інші окисники відновлюються до стабільних і нетоксичних продуктів. Найбільш відомими ферментами-антиоксидантами є каталаза і пероксидаза [113, 114].

Таким чином, антиоксиданти відіграють важливу роль в регуляції протікання вільно-радикальних перетворень в організмі, істотно впливаючи на його стан. Тому розробка методик визначення сполук, що мають антиоксидантні властивості, останнім часом набуває все більшої актуальності.

Для оцінки антиоксидантних властивостей препаратів все частіше застосовують інтегральні показники, такі як загальна антиоксидантна активність (АОА) або сумарний вміст поліфенолів. Це обумовлено тим, що визначення вмісту окремих антиоксидантів у суміші є тривалою і дорогою процедурою. Під терміном АОА розуміють здатність природного матеріалу нейтралізувати шкідливу дію вільних радикалів, що утворюються в живих організмах внаслідок старіння та негативного впливу довкілля. На сьогоднішній день розроблено досить широкий асортимент методик визначення таких сполук із застосуванням інструментальних, а саме СФ [115–117], хемілюмінесцентного [118–120], люмінесцентного [121–123], електрохімічного [124–126] методів.

Більшість методів визначення АОА базуються на вимірюванні концентрації вільних радикалів, які поглинає досліджуваний зразок. В таких методах часто використовується модельна реакція (найчастіше – окиснення) індивідуальної сполуки, що протікає за радикальним механізмом. У ряді випадків створюються умови для генерування вільних радикалів, шляхом

додаванням ініціаторів [127]. Інша група методів ґрунтується на реакціях окиснення відновників у досліджуваному зразку.

Серед вільно-радикальних методів одним з найбільш поширених, є метод визначення адсорбційної ємності по відношенню до кисневих радикалів («Oxygen Radical Absorption Capacity», ORAC) [128–130]. Метод базується на вимірюванні інтенсивності люмінесценції певної сполуки і її зміні залежно від часу протікання реакції. За присутності антиоксидантів, що зв'язують кисневі радикали, збільшується час флуоресценції. У цій системі [128–130] використовують 2,2'-азобіс-(2-амідінопропан) гідрохлорид (AAPH) як джерело пероксидних радикалів. Тролокс – синтетичний аналог вітаміну Е (визначення пероксидів) і галова кислота (гідроксил-радикали) використовуються як стандартні сполуки. Кількісне визначення АОА здійснюється вимірюванням площі між двома кривими – за відсутності та у присутності антиоксидантів.

Метод ORAC відносно простий і чутливий, але тривалий (близько 95 хв на визначення) і вимагає наявності флуоресцентного детектора. З ряду найбільш шкідливих реакційноздатних частинок (табл. 1.2) метод ORAC дає можливість визначати тільки антиоксидантну активність відносно пероксидного і гідроксильного радикалів. Метод може бути використаний для оцінки АОА харчових продуктів, напоїв, хімічних добавок, плазми і сироватки крові.

Хемілюмінесцентні методики оцінки АОА базуються на реакції радикалів оксидантів з речовиною-маркером, що супроводжується зміною інтенсивності хемілюмінесценції в індикаторній реакції. Будь-які сполуки, які вступають в реакцію з ініціаторами радикалів, зменшують їх хемілюмінесцентне випромінювання. Описано хемілюмінесцентне детектування пероксид-радикалів і проведено порівняння антиоксидантної активності фенольних сполук [118]. Як індикаторну реакцію використовували реакцію окиснення люмінолу вільними радикалами. Як інгібітори використовували 2,6-ди-трет-бутил-п-крезол (ВНТ) і Тролокс. Перевагою методу можна вважати

можливість виявлення низки специфічних оксидантів, наприклад,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $HO^{\cdot}$ ,  $HOCl$ ,  $LO(O)^{\cdot}$ ,  $^{\cdot}OONO$  і  $^1O_2$ , замінюючи ініціатор радикалів.

Авторами роботи [125] запропоновано простий електрохімічний спосіб визначення антиоксидантної активності флавоноїдів, що базується на вимірюванні потенціалу напівхвилі окиснення на проточному колонковому електроді. Повідомляється, що електрохімічна активність сполук корелює із здатністю пригнічувати окиснення флавоноїдів перманганатом, але реакція проходить не кількісно і ускладнюється візуальним визначенням точки еквівалентності.

Найбільш численні методики, що описані у літературі, базуються на фотометричному способі детектування, ймовірно, через його зручність і доступність.

Леонг і співробітники [131] проводили аналіз фруктів на вміст антиоксидантів, використовуючи радикали 1,1-дифеніл-2-пікрилгідразилу ( $DPPH^{\cdot}$ ) та 2,2'-азинобіс(3-етилбензтіазолін-6-сульфонової кислоти) ( $ABTS^{2+}$ ). Радикал  $ABTS^{2+}$  генерували реакцією  $ABTS$  з персульфатом калію у водному розчині, а радикал  $DPPH^{\cdot}$  – розчиненням  $DPPH$  у метанолі. Система калібрувалася за аскорбіновою кислотою. Будували залежності часу індукції (до появи забарвлення) від концентрації аскорбінової кислоти, оскільки низькомолекулярні антиоксиданти затримують утворення забарвлення пропорційно своїй кількості. Окрім аскорбінової кислоти, як речовину-стандарт використовували тролокс, гідрохінон і пірогалол. Зміну оптичної густини вимірювали при 414 і 517 нм відповідно. Отримані дані свідчать про високу кореляцію між двома методиками, що частково пояснюється однаковим механізмом зв'язування вільних радикалів. СФ методи з використанням вказаних радикалів були застосовані для визначення АОА вин [132, 133], соків [134], фруктових екстрактів [131, 135]. Для оцінки АОА радикалом  $ABTS$  розроблено тест-набір RANDOX (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, U.K.) [134]. Методи визначення АОА з використанням вказаних радикалів швидкі, але потребують використання органічних розчинників,

мало стабільних аналітичних реагентів і є **найдорожчими** зі всіх вище розглянутих.

Серед групи методів визначення АОА, що ґрунтується на окисно-відновних реакціях, можна виділити також методику, що базується на реакції відновлення антиоксидантами іонів феруму (III) (ferric reducing/antioxidant power, FRAP). Ця методика застосовується при аналізі чаїв [136], вин [137] тощо. При низьких рН розчину відновлення Fe(III)-трипіридилтриазинового комплексу до Fe(II)-комплексу супроводжується появою інтенсивного блакитного забарвлення із максимумом поглинання при 593 нм. Визначення АОА базується на здатності антиоксидантів пригнічувати окисну здатність реакційних частинок, що генеруються у даній реакційній суміші. Як речовину-стандарт використовують аскорбінову кислоту. Ця методика вирізняється простотою, високою експресністю і дешевизною при виконанні та дає змогу безпосередньо визначати низькомолекулярні антиоксиданти.

У роботі [138] для визначення АОА в чаях запропоновано метод («cupric reducing antioxidant capacity», CUPRAC), в якому замість феруму, використовують окисно-відновну реакцію іонів купруму. Аналіз базується на відновленні Cu(II) до Cu(I) загальною дією всіх антиоксидантів (відновників) у зразку. У цій роботі, неокупроїн утворює з Cu(I) комплексну сполуку у співвідношенні реагентів 2:1, що поглинає при  $\lambda_{\max} = 450$  нм. CUPRAC реагент селективний, стійкий, простий у використанні, чутливий до оксидантів. Ще однією перевагою цього методу є те, що під час виконання дослідів зберігається фізіологічне значення рН, що в свою чергу забезпечує більш точні результати [139].

Загальна антиоксидантна активність корелює із сумарним вмістом поліфенолів [110, 140]. Для їх оцінки використовують редокс реакцію із застосуванням реактиву Фоліна-Чокальте (РФЧ), що являє собою різнолігандну молібдовольфрамфосфатну ГПК або суміш молібдо- та вольфрамфосфатних ГПК [141]. В основі методики лежить реакція відновлення реактиву, що супроводжується утворенням молібденової сині.

Метод визначення сумарного вмісту поліфенолів із застосуванням РФЧ є зручним, простим і характеризується задовільною повторюваністю. Але РФЧ не є специфічним до фенолів та їх похідних, і може відновлюватись вітаміном С, Cu(I) та рядом інших відновників органічної та неорганічної природи.

Отже, аналіз даних літератури свідчить, що серед методів визначення антиоксидантної активності найбільш поширеними є «вільнорадикальні» методики. Недоліком цих методик є складність та довготривалість процедури аналізу, тому вони малопридатні для проведення рутинних аналізів. Крім того, більшість «вільнорадикальних» методик вимагає застосування дорогих реактивів, які є не стабільними при зберіганні.

Методики, що базуються на окисно-відновних реакціях, вигідно відрізняються від «вільнорадикальних» простотою виконання, більшою експресністю та доступністю реактивів. Тому, незважаючи на невисоку вибірковість, саме такі методики вбачаються перспективними для експрес-оцінки АОО.

### **1.5. Твердофазні редокс реагенти для визначення окисників та відновників**

Твердофазно-спектрофотометричні (ТСФ) методики вигідно відрізняються від СФ вищою чутливістю, яка досягається за рахунок концентрування аналіту або продукту його взаємодії з відносно великого об'єму розчину у фазу сорбенту.

Для визначення аскорбінової кислоти, гідразину та його похідних запропоновано ТСФ методику, в основу якої покладено реакцію відновлення молібдофосфатної ГПК, імпрегнованої на ксерогель оксиду силіцію [142, 143]. Визначення проводять в діапазоні концентрацій 0,2 – 6,0 мг/л, МВ становить 0,06 мг/л. Для визначення гідразину розроблена подібна ТСФ методика з використанням молібдофосфатної ГПК [47], яка включає процедури відновлення гетерополіаніону у розчині з наступним вилученням продукту відновлення силікагелем, модифікованим четвертинною амонієвою сіллю

аліфатичної природи. Межа виявлення гідразину при  $V/m = 130$  мл/г становить 0,5 мкмоль/л. За такою самою схемою в цій роботі визначають і аскорбінову кислоту, межа виявлення якої при  $V/m = 200$  мл/г становить 0,1 мкмоль/л. Застосування такої схеми аналізу дозволило підвищити чутливість визначення аскорбінової кислоти та гідразину в 30 та 3 рази відповідно, порівняно з методиками на основі ксерогелю силіцієвої кислоти.

При застосуванні для вилучення ГПК четвертинних амонієвих солей гетероциклічної природи [145, 146] чутливість визначення відновників погіршується, порівняно з методиками на основі ксерогелей силіцієвої кислоти [142] та пінополіуретану (ППУ) [147], втім такі методики є більш експресними і селективними щодо сульфат-іону.

Для визначення аскорбінової кислоти запропоновано також ТСФ методику, що ґрунтується на реакції відновлення молібдофосфатного ГПА структури Доусона  $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$  [56]. Гетерополісінь, одержана при відновленні молібдофосфатного гетерополіаніону, кількісно вилучається пінополіуретаном. Розроблена тест-методика визначення вітаміну С може бути використана в клінічному аналізі або для контролю концентрації аскорбінової кислоти у харчових продуктах.

Останнім часом велика увага приділяється розвитку експресних та простих тест-методів виявлення і напівкількісного визначення речовин, що не потребують лабораторних умов та висококваліфікованого персоналу. Досить зручні тест-методи базуються на використанні іммобілізованих аналітичних реагентів, які швидко реагують з визначуваною речовиною, забезпечують ефект, за яким легко спостерігати, а саме контрастну зміну забарвлення.

Одними з кращих реагентів для визначення відновників є молібдофосфатні гетерополісполуки. Окиснені „жовті” форми цих сполук, що закріплені на твердофазній поверхні, при взаємодії з відновниками (гідрaziном, йодид-йонами, залізом (II) і оловом (II)), переходять у відновлені „сині” форми. При контакті „синіх” форм з окисниками (азотною кислотою, перманганатом калію тощо) спостерігається зворотнє окиснення. Такі

твердофазні реагенти, як правило, є оборотними і витримують до 30 циклів окиснення-відновлення [142, 143, 148]. Так, для визначення Sn(II) використовують ППУ [148] та ксерогелі [143], модифіковані ГПК. На основі ксерогелей розроблено індикаторні трубки (ІТ) для визначення стануму (II) у межах 10–80 мг/г у реагентах для виготовлення фармпрепаратів [143].

Тест-методи аналізу прості та експресні за рахунок можливості використання індикаторної речовини як готової аналітичної форми.

Імобілізовані на носіях різної природи ГПК використовуються у формі різноманітних тест-засобів, а саме індикаторних трубок, індикаторних порошків та індикаторних папірців. На основі молібдофосфатної ГПК розроблено індикаторний папір для напівкількісного визначення Аск [149]. Колір тест-смужки змінюється від зелено-жовтого до блакитного залежно від концентрації вітаміну С у розчині. Діапазон визначуваних концентрацій Аск становить 50–600 мг/л.

Для експрес-визначення гідразинів у польових умовах [143] запропоновано індикаторні трубки, заповнені ксерогелем оксиду силіцію, модифікованого Cu(II) та реактивом Вавеле – сумішшю молібдофосфатних ГПК 12-го і 18-го ряду, а саме  $H_3[PMo_{12}O_{40}]$  і  $H_3[PMo_{18}O_{60}]$ . Аналітичним відгуком є довжина забарвленої зони, а вміст гідразинів визначають за допомогою шкали або розраховують за рівнянням ІТ.

Останнім часом зростає тенденція розробки тест-методів для визначення інтегральних показників, тобто загальної концентрації окисників та відновників. Суму органічних та неорганічних відновників визначають за допомогою іммобілізованих на кремнеземах тіазинових барвників, що утворюють стійкі асоціати з аніоном трийодиду [150]. На основі цієї індикаторної системи виготовлені ІТ для визначення суми сульфуровмісних відновників в інтервалі концентрацій 1–10 мг<sub>сульфіту</sub>/л у стічних водах [151]. Визначенню не заважають 100-кратні кількості феруму (II, III), 5-кратні кількості купруму (II), оксикислоти до 20 г/л. В реакцію вступають всі сильні відновники, зокрема, гідрохінон, 4-амінофенол, п-діаміни. Однак такий

недолік ТР для визначення інтегральних показників, як недостатня вибірковість відносно органічних та неорганічних відновників, робить їх непридатними для визначення біоантиоксидантів в об'єктах природного походження.

Єдиним на сьогоднішній день твердофазним реагентом для оцінки АОА, що виявив найкращі хіміко-аналітичні властивості, зокрема високу чутливість, широкий діапазон лінійності ГГ, експресність (час контакту фаз 5–15 хв) є адсорбційно закріплений на кремнеземі тетрабензотетраазоциклогексадецин-купруму (II) (CuTAAB–СГ) [152, 153], який було застосовано для тест-оцінки АОА рослинних об'єктів: червоних вин [154], препаратів ехінацеї та чаїв [155]. Його перевагою є можливість багаторазової регенерації шляхом промивання дистильованою водою, до недоліків можна віднести складний синтез реагенту. Розроблений CuTAAB–СГ взаємодіє з Аск та природними антиоксидантами, зокрема поліфенолами, що супроводжується контрастною зміною забарвлення від жовтого до синього. Діапазон визначуваних концентрацій відновника становить 40–240 мг/л. Розроблений реагент не вступає в реакцію з неорганічними відновниками, і тому, є специфічним реактивом для визначення органічних антиоксидантів. Методика з використанням CuTAAB–СГ проста у виконанні, швидка та екобезпечна, однак передбачає проведення синтезу модифікатору – комплексу купруму (II) з реагентом, що потребує залучення кваліфікованого персоналу.

Таким чином, проблема створення чутливих і водночас вибіркових ТР для визначення інтегральних показників якості харчових продуктів, напоїв, фітопрепаратів тощо залишається актуальною.

## 1.6. Висновки до розділу 1

Одними з найкращих аналітичних форм для визначення окисників та відновників різної природи дотепер залишаються гетерополікислоти, завдяки своїй здатності до оборотного окиснення-відновлення. В аналітичній практиці найчастіше використовують ГПК структури Кеггіна, через просту процедуру

їх отримання у кислому середовищі та стабільність у розчині. Для визначення відновників широко застосовуються як розчинні форми ГПК, так й іммобілізовані на поверхні сорбентів різної природи, зокрема ППУ, целюлозних фільтрах та оксидах силіцію.

Серед методів визначення органічних відновників, зокрема катехоламінів, найпоширенішими є спектрофотометричні. Хоча вони недостатньо селективні та чутливі, однак є досить дешевими та доступними. Інші методи мають суттєві обмеження при застосуванні для рутинних аналізів, тому що передбачають використання дорогого обладнання, важкодоступних реагентів та залучення висококваліфікованого персоналу.

Підвищення популярності серед населення продуктів та препаратів з антиоксидантними властивостями спричинило появу великої кількості робіт, спрямованих на розробку методик визначення інтегральних показників, зокрема визначення загального вмісту поліфенолів та оцінки антиоксидантної активності. Численна група методик базується на вимірюванні кількості вільних радикалів, що поглинається зразком. Такі методики зазвичай багатостадійні та потребують дорогих реактивів та обладнання, що обмежує широке застосування «вільно радикальних» методик у рутинному аналізі.

Більш простими, доступними та придатними для лабораторій по контролю якості харчових продуктів є методики із використанням окисно-відновних ГР. Перевагами застосування таких аналітичних форм є їхня зручність, стійкість при зберіганні і транспортуванні, що дає можливість використовувати їх для одержання попереднього результату безпосередньо на місці відбору проби. Аналіз проводять швидко, як правило в одну стадію, та без застосування токсичних органічних розчинників.

Асортимент твердофазних редокс-реагентів є незначним. Більшість індикаторних систем запропоновано для визначення неорганічних сполук, або ж синтетичних органічних речовин-забруднювачів. Кількість же тест-методів для визначення органічних сполук природного походження взагалі є дуже обмеженою.

Отже, розробка чутливих, експресних, комерційно доступних методик визначення органічних відновників, в тому числі катехоламінів та поліфенолів природного походження, які включають мінімальну кількість стадій аналізу, залишається актуальною проблемою сучасної клінічної та аналітичної хімії.

## РОЗДІЛ 2. РЕАГЕНТИ, АПАРАТУРА ТА МЕТОДИКА ЕКСПЕРИМЕНТУ

### 2.1. Приготування та стандартизація розчинів реагентів

1. Хлороформний розчин ТДАН ( $C_{10}H_{21})_4N^+NO_3^-$  з концентрацією  $1,0 \cdot 10^{-2}$  моль/л готували розчиненням точної наважки ТДАН у 2,5 мл хлороформу.
2. Реактив Фоліна синтезували згідно [156]. У колбу ємністю 500 мл вносили суміш 9,0 г  $MoO_3$ , 50,0 г  $Na_2WO_4$  та 25,0 мл 85%-ї  $H_3PO_4$ , додавали 375 мл дистильованої води і кип'ятили впродовж 2 год з оборотним холодильником. Після цього розчин охолоджували, фільтрували і розбавляли водою до загального об'єму 500 мл. Концентрацію ГПК розраховували за вмістом молібдену у реакційній суміші, враховуючи співвідношення компонентів у молекулі ГПК.
3. Розчин  $AlCl_3$  з концентрацією 22,5 ммоль/л готували розчиненням точної наважки  $AlCl_3$  у 200 мл води та додавали концентровану соляну кислоту до встановлення рН 2 у розчині.
4. Розчин  $HCl$  з рН 2,0 готували розведенням 1,0 моль/л розчину соляної кислоти.
5. Розчин кверцетину з концентрацією 2 ммоль/л одержували розчиненням точної наважки 0,0151 г кверцетину у 25,0 мл етанолу.
6. Розчин кверцетину з концентрацією 0,2 ммоль/л готували розбавленням 2,5 мл  $2 \cdot 10^{-3}$  моль/л етанольного розчину кверцетину (п. 5) у 6,0 мл етанолу та дистильованій воді до загального об'єму 25,0 мл.
7. Ацетатний буферний розчин з рН 3,8 готували змішуванням розчинів оцтової кислоти і гідроксиду натрію згідно з [157].
8. Розчин  $Na_2CO_3$  з концентрацією 1,0 моль/л готували розчиненням точної наважки карбонату натрію кваліфікації х.ч. у 100 мл дистильованої води.

9. Розчин таніну з концентрацією 0,38 ммоль/л готували розчиненням точної наважки 0,0162 г препарату кваліфікації фарм. у 25,0 мл дистильованої води.
10. Розчин кофеїну з концентрацією 2 ммоль/л готували розчиненням точної наважки препарату кваліфікації фарм. у 25,0 мл дистильованої води.
11. Розчин цитратної кислоти з концентрацією 2,5 ммоль/л готували розчиненням точної наважки речовини кваліфікації х.ч. у 25,0 мл дистильованої води.
12. Розчин винної кислоти з концентрацією 2,5 ммоль/л готували розчиненням точної наважки речовини кваліфікації ч.д.а. у 25,0 мл дистильованої води.
13. Вихідний розчин купруму (II) нітрату з концентрацією 4 мг/мл готували розчиненням точної наважки в дистильованій воді. Отриманий розчин підкислювали сульфатною кислотою. Розчини з меншою концентрацією готували розбавленням аліквотної частини вихідного розчину дистильованою водою.
14. Вихідний розчин  $\text{FeCl}_3$  з концентрацією 0,100 моль/л готували розчиненням точної наважки речовини у сірчаній кислоті з концентрацією 0,01 М. Робочі розчини феруму (III) готували розбавленням аліквотної частини вихідного розчину у сірчаній кислоті з концентрацією 0,01 М.
15. Розчин  $\text{FeSO}_4$  з концентрацією 0,010 моль/л готували розчиненням точної наважки речовини у сірчаній кислоті з концентрацією 0,01 М.
16. Змішаний реактив готували розчиненням точних наважок амоній гептамолібдату масою 2,35 г та антимонілтартрату калію ( $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$ ) масою 29 мг у 53,0 мл концентрованої сульфатної кислоти та доводили дистильованою водою до загального об'єму 500 мл,  $C((\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}) = 3,8 \cdot 10^{-3}$  моль/л,  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 1,9$  моль/л,  $C(\text{Sb}) = 1,76 \cdot 10^{-4}$  моль/л.

17. Розчин молібдостибієвофосфатної гетерополікислоти з концентрацією 83 мкмоль/л готували змішуванням аліквотної частини розчину 8,3 мл калію дигідрофосфату (приготовленого згідно п. 20) та 27,0 мл змішаного реагенту (приготовленого згідно п. 16), додавали дистильовану воду до загального об'єму 100 мл, перемішували та залишали на 10 хв для утворення гетерополікомплексу.
18. Розчин NaOH з концентрацією 0,100 М готували розбавленням концентрованого 45%–го розчину натрій гідроксиду.
19. Розчин калій дигідрофосфату з концентрацією 0,100 моль/л готували розчиненням точної наважки 0,34 г  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  у 25,0 мл дистильованої води.
20. Розчин калій дигідрофосфату з концентрацією  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л готували розбавленням 0,1 М розчину  $\text{KН}_2\text{PО}_4$  у дистильованій воді.
21. Розчин аскорбінової кислоти з концентрацією  $1 \cdot 10^{-2}$  моль/л та  $1 \cdot 10^{-3}$  моль/л готували розчиненням точної наважки 0,0176 г та 0,0018 г відповідно аскорбінової кислоти кваліфікації фарм. у 10,0 мл дистильованої води.
22. Робочі розчини сульфатної кислоти готували розбавленням концентрованого розчину  $\text{H}_2\text{SО}_4$ , кваліфікації ч.д.а., дистильованою водою.
23. Розчин тетраборату натрію з концентрацією 0,05 моль/л готували розчиненням точної наважки  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  кваліфікації ч.д.а. у дистильованій воді.
24. Боратний буферний розчин  $\text{pH}=10,6$  готували змішуванням 0,1 М розчину натрій гідроксиду та 0,05 М розчину натрію тетраборату згідно з [157].
25. Адреналіну гідротартрат з концентрацією 1,82 мг/мл, виробництва фармацевтичної компанії «Здоров'я» (Україна, м. Харків), використовували без додаткової очистки.

26. Дофаміну гідрохлорид з концентрацією 0,032 М, виробництва фармацевтичної компанії «Дарниця» (Україна, м. Київ), використовували без додаткової очистки.
27. Розчин глюкози ( $C_6H_{12}O_6$ ) з концентрацією 0,007 моль/л, кваліфікації фарм., готували розчиненням точної наважки речовини 0,0064 г у 5,0 мл дистильованої води.
28. Розчин  $NaNO_3$  з концентрацією 0,024 моль/л, кваліфікації х.ч., готували розчиненням точної наважки речовини 0,0103 г у 5,0 мл дистильованої води.
29. Розчин  $NaCl$  з концентрацією 0,024 моль/л, кваліфікації х.ч., готували розчиненням точної наважки речовини 0,0071 г у 5,0 мл дистильованої води.
30. Розчин  $Na_2SO_3$  з концентрацією 0,100 моль/л, кваліфікації х.ч., готували розчиненням точної наважки речовини 0,063 г у 5,0 мл дистильованої води.
31. Розчин  $NaF$  з концентрацією 0,010 моль/л, кваліфікації х.ч., готували розчиненням точної наважки речовини 0,0021 г у 5,0 мл дистильованої води.
32. Розчин оцтової кислоти з концентрацією 0,25 моль/л готували розбавленням аліквотної частини льодяної оцтової кислоти, кваліфікації х.ч.
33. Розчин натрійкалій тартрату з концентрацією 0,500 М готували розчиненням точної наважки 3,5 г  $NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$ , кваліфікації ч. у 25,0 мл дистильованої води.

*Розчинники.* Дистильовану воду отримували відповідно до [158]. Гексан, хлороформ, ізобутиловий спирт, кваліфікації “х.ч.”, а також етанол використовували без додаткового очищення.

*Сорбенти.*

Силікагелі Silpearl UV 254, Sillardum для тонкошарової хроматографії виробництва „Chemapol” та силікагель SG-60 („Merck”, Німеччина)

використовували без додаткового очищення. Для пробопідготовки фармацевтичних препаратів, що містили адреналін використовували гідрофобний силікагель Inerton AW та  $Al_2O_3$  для хроматографії.

## 2.2 Обладнання

1. Спектри поглинання сорбентів вимірювали спектрофотометрами VIS Unico 1201/1200 (United Products & Instruments, США) та UV/VIS Evolution600 (Thermo Scientific Spectronic, США).
2. Спектри поглинання розчинів вимірювали UV/VIS спектрофотометром Unico 2800 (United Products & Instruments, США).
3. Спектри дифузного відбиття вимірювали спектрофотометром Specord M40 UV/Vis ("Carl Zeiss Jena", Німеччина);
4. рН розчинів вимірювали скляним електродом за допомогою іонметра лабораторного И-169М, рН-метру GMH 3530 та рН-тестеру Checker ("Greisinger electronic", Німеччина).
5. Термодесорбцію реєстрували маспектрометром MX7304A з роздільною здатністю 500 фірми «Селми» (м. Суми, Україна).
6. ЯМР спектри на ядрах фосфору реєстрували ЯМР-спектрометром Bruker Avance DRX-500, Німеччина.
7. Магнітна мішалка MM-5 (Україна).
8. Центрифуга настільна (ОПн-ЗУХЛ 4.2, Росія).
9. Мірний посуд, піпетки II класу точності.
10. Кварцеві та скляні кювети  $l = 0,1\text{ см}$ ;  $l = 1,0\text{ см}$ .
11. Аналітичні терези.
12. Секундомір з максимально припустимою похибкою  $\pm 0,5\text{ с/5 хв}$ .

## 2.3. Вибір матриці, модифікаторів та способу їх іммобілізації

*Вибір матриці.* Серед твердих носіїв, що використовують для попередньої модифікації органічними реагентами, зокрема вугілля, ППУ, целюлоза, полімерні мембрани, оксид алюмінію [159–162], високодисперсні

кремнезemi в найбільшій мірі задовольняють вимогам щодо матриць для створення твердофазно-спектрофотометричних методик, а саме: хімічна та механічна стійкість, відсутність набухання, висока швидкість масообміну та седиментації, відсутність власного поглинання у видимій ділянці спектру [159–161, 163, 164]. До того ж активними групами поверхні нефункціоналізованих кремнеземів є силанольні групи, які здатні утворювати зв'язки з донорними атомами молекул модифікатора, не погіршуючи при цьому його хіміко-аналітичних властивостей [165].

У роботі використовували комерційно доступні нефункціоналізовані кремнезemi. Їхні основні характеристики наведено у табл. 2.1.

Таблиця 2.1

Характеристики використаних сорбентів (відповідно до даних виробника)

Кремнезем	$S$ , питома площа поверхні, м <sup>2</sup> /г	$d$ (пор), нм	Розмір частинок, мкм	pH водної суспензії
Silpearl UV 254	600	16	Високодисперсний	4,5
Sillardum	300	Непоруватий	–//–	4.4
Silica gel 60	490	6	63–200	7,5

*Вибір модифікаторів.* Оскільки немодифікований силікагель з водного розчину ГПК не вилучає, тому його попередньо модифікували шляхом адсорбції високомолекулярної четвертинної амонієвої солі аліфатичної природи – ТДАН. Вибір ТДАН обумовлений особливостями його хімічної будови, відсутністю власного поглинання у видимій ділянці спектру та здатністю міцно утримуватись на поверхні за рахунок електростатичних та дисперсійних взаємодій [210]. Як було показано раніше [47], СГ при цьому набуває аніонообмінних властивостей і здатність до вилучення гетерополіаніону

Аналіз даних літератури показав (див. розділ 1), що ГПК завдяки своїм окисно-відновним властивостям є чутливими аналітичними реагентами для визначення відновників. Однак псевдоколоїдний стан ГПК у розчині, а також

залежність умов утворення та відновлення гетерополіаніонів від кислотності середовища обмежують застосування цих реагентів в аналізі. Дослідження останніх років показали, що гетерогенізація реагентів, тобто закріплення їх на поверхні носія, у ряді випадків, сприяє їхній стабілізації [164]. Реакції ГПК з органічними відновниками, зокрема поліфенолами та катехоламінами, є чутливими та контрастними і відповідають вимогам, що висуваються до індикаторних реакцій для ТСФ та ВТ визначення.

Раніше показано [47], що нековалентне закріплення «синіх» форм фосфатних ГПК на поверхні силікагелю значно підвищує їхню стабільність у часі, а також відтворюваність та чутливість визначення за їхньої участю. Запропоновані сорбційно-спектроскопічні методики визначення відновників базуються на відновленні молібдофосфатної ГПК у розчині з наступним її вилученням у фазу модифікованого сорбенту. Але такий підхід не дає можливості повністю позбавитись від основних недоліків ГПК у розчині. Більш перспективними вбачаються методи із застосуванням ТР на основі іммобілізованих ГПК, тому нами було здійснено іммобілізацію їх «жовтої» форми.

Різнолігандні ГПК з двома гетероатомами мають сильніші окисно-відновні властивості [17] порівняно з однолігандними гетерополіаніонами, тому в даній роботі для розробки ТР для визначення катехоламінів та поліфенолів обрали різнолігандні молібдостибієвофосфатну (ГПК1) гетерополікислоту та реактив Фоліна (РФ), який являє собою молібдовольфрамфосфатну ГПК (ГПК2). Даних щодо застосування іммобілізованих «жовтих» форм різнолігандних ГПК для визначення катехоламінів, поліфенолів, а також оцінки АОА в літературі не виявлено.

*Модифікування сорбентів.* Модифікування сорбентів здійснювали адсорбційним способом з огляду на простоту, швидкість та зручність такого способу функціоналізації поверхні матриці, порівняно з ковалентним закріпленням [159].

1. СГ, модифікований ТДАН, з ємністю за реагентом 25 мкмоль/г, отримували за методикою: в стакан ємністю 250 мл поміщали 2,5 мл хлороформного розчину ТДАН (п. 2.1) та 37,5 мл гексану. Суміш перемішували з 1,00 г силікагелю впродовж 15 хв, декантували та висушували на повітрі при кімнатній температурі.

2. ТДАН–СГ, модифікований реактивом Фоліна, готували наступним чином: в стакан ємністю 25,0 мл вносили 5,0 мл реактиву Фоліна та 1,0 г ТДАН–СГ. Суспензію перемішували магнітною мішалкою впродовж 15 хв, сорбент відокремлювали декантуванням, тричі промивали дистильованою водою і висушували на повітрі. Зберігали без доступу прямих сонячних променів.

3. ТДАН–СГ, модифікований окисненою ГПК1, готували наступним чином: в стакан ємністю 250 мл вносили 27,2 мл змішаного реактиву, точну наважку калію антимонілтартрату 6 мг, 8,3 мл водного розчину калій дигідрофосфату з концентрацією 1,0 ммоль/л та дистильовану воду до загального об'єму 100 мл. Суміш перемішували та залишали на 10 хвилин для утворення ГПК. Після цього до розчину додавали 1,000 г ТДАН–СГ та перемішували магнітною мішалкою впродовж 10 хв. Сорбент відділяли від розчину декантуванням та тричі промивали 0,5 М розчином сульфатної кислоти. Отриманий ТР зберігали у розчині сульфатної кислоти без доступу прямих сонячних променів.

*Формули для розрахунків.* Ступінь вилучення ( $\Gamma$ , %), ємність сорбенту за певним компонентом ( $a$ , моль/г) та коефіцієнт розподілу ( $D$ , мл/г) розраховували за формулами:

$$\Gamma = \frac{(C - [C])}{C} \cdot 100, \quad (2.1)$$

$$a = \frac{(C - [C]) \cdot V}{m}, \quad (2.2)$$

$$D = (\Gamma \cdot 10^3 \cdot V) / (100 - \Gamma) \cdot m, \quad (2.3)$$

де  $C$  та  $[C]$  – відповідно початкова та рівноважна концентрація адсорбату, моль/л;  $V$  – об'єм розчину, л;  $m$  – маса сорбенту, г.

#### 2.4. Методи та методики дослідження

*Методи дослідження.* Ідентифікацію ГПК1 у розчині здійснювали методом ядерного магнітного резонансу на ядрах фосфору. Як зразки використовували ізобутанольні екстракти молібдофосфатної та молібдостибієвофосфатної ГПК. Перед реєстрацією ЯМР спектрів екстрагент випаровували, як розчинник для противоіону використовували ДМСО.

Для дослідження взаємодії ТДАН та іонного асоціату з поверхнею кремнезему використовували метод термодесорбції. Основою методу є нагрівання модифікованого сорбенту зі сталюю швидкістю з одночасним аналізом продуктів, які десорбуються. Видалення продуктів із поверхні сорбенту в газову фазу аналізують, використовуючи вакуумний варіант, із мас-спектральним аналізом речовин, які десорбуються при нагріванні [166, 209]. Метод термодесорбції дає можливість визначити кінетичні параметри десорбції і базується на рівнянні Полянї–Вігнера:

$$r = -\frac{d\theta}{dt} = \nu\theta^n \exp\left(-\frac{E}{RT}\right) = k\theta^n, \quad (2.1)$$

де  $r$  – швидкість десорбції;  $t$  – час;  $\nu$  – передекспоненціальний множник;  $\theta$  – ступінь заповнення поверхні;  $n$  – кінетичний порядок десорбції;  $E$  – енергія активації десорбції;  $T$  – температура поверхні.

У роботі визначали енергію активації десорбції частинок за способом, який розробили Аменомія та Цветанович [167]. Для цього одержаний термодесорбційний пік переводили у відносні координати  $r/r_m = f(T/T_m)$ , де  $r_m$  та  $T_m$  – швидкість та температура десорбції в точці максимуму, і порівнювали його з запрограмованими значеннями, які відповідають різним значенням  $\varepsilon$  для десорбції першого чи другого порядку. Енергію активації десорбції розраховували за формулою:

$$\varepsilon = \frac{E}{RT_m} \quad (2.2)$$

Дослідження хіміко-аналітичних властивостей ТР проводили методами СДВ, ТСФ, кольорометрії та стандартної кольорової шкали.

У методі СДВ вимірюють дифузне відбиття світлорозсіюючого забарвленого зразку, відносно стандартного зразку (MgO), R [168].

$R=I/I_0$ , де  $I_0$  та  $I$  – інтенсивність падаючого на зразок і відбитого від забарвленого зразку світла.

Відносне дифузне відбиття перераховували на функцію Кубелки-Мунка  $F(R)_{\lambda_i}$  для кожної  $\lambda_i$  за формулою:

$$F(R)=(1-R)^2/2R=2,3\varepsilon c/s \quad , \quad (2.3)$$

де  $\varepsilon$  – молярний коефіцієнт поглинання сорбату,  $c$  – його концентрація,  $s$  – коефіцієнт розсіювання світла. З формули 2.3 видно, що функція Кубелки-Мунка зв'язана лінійною залежністю із концентрацією сорбату, а залежність  $F(R)=f(c)$  співпадає зі спектром його поглинання у розчині [169]. Для кремнеземів оптимальною товщиною поглинаючого шару сорбенту є  $l \geq 4$  мм. Для дослідження оптичних характеристик інтенсивно забарвлених порошкоподібних зразків рекомендовано змішувати їх з немодифікованим сорбентом. У такому разі відносне стандартне відхилення зразків кремнеземів (фракції 40–100 і 100–200 мкм) не перевищує 0,05 ( $n=6$ ). При низькому вмісті аналіту спектр дифузного відбиття сорбенту змінюється внаслідок розсіювання світла матрицею. Для урахування розсіювання матриці значень  $F(R)_{\lambda_i}$  холостого сорбенту віднімають від значення  $F(R)_{\lambda_i}$  забарвленого зразка та одержують спектр дифузного відбиття, що є аналогічним спектрам з малим впливом матриці та спектрам у гомогенній фазі.

У методі ТСФ реєструється світлопоглинання у тонкому шарі сорбенту, обробленого розчином визначуваного компонента [170]. Суттєвим обмеженням методу є власне (“фонове”) поглинання матриці та розсіювання світла високодисперсними сорбентами. На значення і відтворюваність аналітичного відгуку істотно впливає спосіб реєстрації світлопоглинання.

Найбільш раціональним способом реєстрації поглинання сорбентів є гетерохроматична екстраполяція при двох довжинах хвиль та при максимальному наближенні кювети до віконця детектора приладу. Аналітичним відгуком є  $\Delta A$ , що розраховується за рівнянням:  $\Delta A = (A'_{\max} - A'_{\min}) - (A''_{\max} - A''_{\min})$ , де  $A'_{\max}$  і  $A''_{\max}$  – поглинання модифікованого сорбенту при  $\lambda_{\max}$  у присутності та за відсутності аналіту,  $A'_{\min}$  і  $A''_{\min}$  – поглинання при 900 нм у присутності та за відсутності аналіту відповідно. Метод гетерохроматичної екстраполяції дає змогу врахувати власне поглинання матриці та нівелювати похибки, що пов'язані із вимірюванням поглинання у твердій фазі.

У методі кольориметрії [171, 172] аналітичними сигналами є кольориметричні функції: координати кольору – кількості трьох лінійно незалежних кольорів, оптичне змішування яких забезпечує одержання даного кольору (кольору TP), –  $x$ ,  $y$ ,  $z$  у колориметричній системі XYZ; світлота  $L$ , координати кольору  $a$ ,  $b$  у рівноконтрастній системі CIELab;  $S$  – насиченість кольору; кольоровий фон  $T$ , кольорова відмінність за світлотою –  $\Delta L$ , насиченості  $\Delta S$ , тону  $\Delta T$  і загальна кольорова відмінність  $\Delta E$ . Координати кольору  $x$ ,  $y$ ,  $z$  розраховували методом вибраних ординат для прозорих та непрозорих речовин, що не світяться, відносно стандартного джерела „А” за спектрами поглинання або відбиття твердофазних реагентів.

Координати  $L$ ,  $a$  та  $b$  розраховували за формулами:

$$L = 25(100y/y_0)^{1/3} - 16 \quad (1 \leq y \leq 100), \quad (2.4)$$

$$a = 500[(x/x_0)^{1/3} - (y/y_0)^{1/3}], \quad (2.5)$$

$$b = 200[(y/y_0)^{1/3} - (z/z_0)^{1/3}], \quad (2.6),$$

де  $x_0$ ,  $y_0$ ,  $z_0$  – координати кольору стандартного джерела світла.

Значення  $S$  і  $T$ ,  $\Delta S$ ,  $\Delta T$ , а також  $\Delta L$  і  $\Delta E$  розраховували за формулами:

$$S = [(a)^2 + (b)^2]^{1/2} \quad (2.7)$$

$$T = \arctg(b/a) \quad (2.8)$$

$$\Delta S = S_{\text{зразку}} - S_{\text{еталону}} \quad (2.9)$$

$$\Delta T = [(\Delta E)^2 - (\Delta L)^2 - (\Delta S)^2]^{1/2} \quad (2.10)$$

$$\Delta L = L_{\text{зразку}} - L_{\text{еталону}} \quad (2.11)$$

$$\Delta E = [(\Delta a)^2 + (\Delta b)^2 + (\Delta L)^2]^{1/2} \quad (2.12)$$

Загальна кольорова відмінність  $\Delta E$  – відстань між точками, що відповідають даним кольорам.  $\Delta E$  вимірюється у діапазоні 0 – 100 умовних одиниць, а одна одиниця  $\Delta E$  відповідає одному порогу кольоровідмінності.  $\Delta E$  показує, на скільки порогів кольоровідмінності відрізняються кольори, що порівнюються. У роботі [173] показано, що використання кольорометричних функцій може підвищити як вибірковість, так і чутливість визначення, оскільки кольорометричні функції змінюються у більш широких межах, ніж оптична густина чи коефіцієнти дифузного відбиття.

В основі *методу стандартної кольорової шкали* [148] лежить використання твердофазних реагентів, що змінюють своє забарвлення при взаємодії з визначуваними речовинами. Контрастна зміна кольору модифікованого сорбенту залежно від концентрації речовини у розчині дає можливість здійснювати візуальне визначення. Аналітичним відгуком є відтінок або інтенсивність забарвлення ТР. Визначення концентрації аналіту здійснюють за стандартною кольоровою шкалою. Для врахування суб'єктивного фактора людського зору, а також обґрунтування діапазону лінійності шкали використовували залежності зміни координат кольору у системі CIE Lab від концентрації визначуваного компонента. Шкалу готували таким чином, щоб  $\Delta E$  сусідніх точок відрізнялись на 10 умовних одиниць. За таких умов око найкраще фіксує різницю кольору. Імітат кольорової шкали моделювали у графічному редакторі CorelDraw.

### ***Методики дослідження***

#### *Взаємодія поліфенолів з Al(III) у розчині.*

У колби ємністю 25,0 мл вносили 2,0 мл ацетатного буферу з рН 3,7 – 3,9, 2,0 мл 22,5 ммоль/л  $AlCl_3$  з рН 2,2 і від 0,1 до 6,0 мл стандартного розчину кверцетину (таніну). Через 25 хв визначали поглинання при 420 (286) нм.

#### *Взаємодія поліфенолів з РФ у розчині.*

У колби ємністю 25,0 мл вносили від 0,25 до 2,5 мл стандартного розчину кверцетину (таніну), 1,25 мл РФ, 3,0 мл 10% розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , доводили до мітки дистильованою водою, перемішували і через 25 хв вимірювали оптичну густина при 760 нм.

*Дослідження поглинання іммобілізованої ГПК2 залежно від концентрації розчину карбонату натрію.*

В стакани ємністю 50,0 мл вносили 2,5 мл  $2 \cdot 10^{-4}$  моль/л водно-спиртового розчину кверцетину, 2,5 мл розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  з концентрацією 0,05–1 моль/л та перемішували з 0,075 г ТР впродовж 15 хв. Сорбент промивали дистильованою водою, декантували, додавали 2,5 мл розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  з відповідною концентрацією і вимірювали поглинання сорбенту в тонкому шарі  $l=0,1$  см.

*Дослідження поглинання іммобілізованої ГПК1 залежно від рН розчину.*

В стакани ємністю 25,0 мл вносили 0,9 мл розчин адреналіну, створювали рН розчину від 3 до 11, додавали наважку сорбенту масою 0,15 г та перемішували протягом 10 хв. Сорбент відділяли декантацією, промивали розчином з відповідним рН та вимірювали поглинання в тонкому шарі  $l=0,1$  см.

*Дослідження поглинання іммобілізованої ГПК2 залежно від часу контактування з поліфенолами.*

У стакани ємністю 50,0 мл вносили 2,5 мл стандартного розчину кверцетину (таніну) і 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Суміш перемішували з 0,075 г ТР упродовж 0–20 хв, промивали дистильованою водою, декантували, додавали 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і вимірювали поглинання сорбенту в тонкому шарі  $l=0,1$  см.

*Дослідження поглинання іммобілізованої ГПК1 залежно від часу контактування з катехоламинами.*

У стакани ємністю 50,0 мл вносили 0,9 мл стандартного розчину адреналіну (дофаміну) і 9,0 мл боратного буферного розчину з рН 10,6. До необхідного рН розчин доводили декількома краплинами розчину 0,1 М

натрій гідроксиду. Суміш перемішували з 0,15 г ТР упродовж 0–20 хв, промивали дистильованою водою, декантували, додавали буферний розчин та вимірювали поглинання сорбенту в тонкому шарі  $l=0,1$  см

*Взаємодія іммобілізованої ГПК2 з розчином кверцетину.*

У стакани ємністю 50,0 мл вносили 0,25–2,50 мл 0,2 ммоль/л водно-спиртового розчину кверцетину, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та водно-етанольну суміш (2:1) до загального об'єму 5 мл. Перемішували з 0,075 г ТР впродовж 15 хв, промивали дистильованою водою, декантували, додавали 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і вимірювали поглинання сорбенту в тонкому шарі  $l=0,1$  см.

*Взаємодія іммобілізованої ГПК2 з розчином таніну.*

У стакани ємністю 50,0 мл вносили 0,20–1,80 мл 0,38 ммоль/л водного розчину таніну, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та дистильовану воду до загального об'єму 5 мл. Після чого 0,1 мл отриманого розчину таніну наносили на 0,100 г ТР, висушували на повітрі та вимірювали поглинання (дифузне відбиття) у тонкому шарі  $l=0,1$  см.

*Взаємодія іммобілізованої ГПК1 з розчинами катехоламінів.*

У стакан ємністю 50,0 мл вносили 0,2–1,0 мл розчину адреналіну гідротартрату або 0,3–2,0 мл розчину дофаміну гідрохлориду, 8,0–9,7 мл боратного буферного розчину, доводили до загального об'єму 10,0 мл, додавали 0,15 г ТР з нековалентно закріпленою на його поверхні ГПК1 та перемішували впродовж 10 хв. Після цього сорбент відділяли декантацією, промивали дистильованою водою, додавали декілька мілілітрів відповідного боратного буферного розчину та вимірювали оптичну густину у тонкому шарі.

## 2.5. Висновки до розділу 2

Таким чином, як матриці для отримання ТР для твердофазно-спектрофотометричного та ВТ визначення органічних відновників, зокрема катехоламінів та поліфенолів, було обрано кремнеземи, послідовно модифіковані ТДАН і окисненими формами ГПК1 та ГПК2.

Для дослідження сорбції, природи взаємодії на межі розділу фаз „розчин ГПК – модифікований ТДАН силікагель” і хіміко-аналітичних властивостей іммобілізованих реагентів і комплексних сполук було обрано методи адсорбції, ЕПР, термодесорбція, УФ/Вид-спектроскопії, СДВ та ТСФ. Для виготовлення стандартних кольорових шкал використовували методи кольориметрії і стандартної кольорової шкали.

У розділі описано також вихідні речовини і матеріали, а також апаратуру, що використовували у роботі.

### **РОЗДІЛ 3. ВЗАЄМОДІЯ МОЛІБДОСТИБІЄВОФОСФАТНОЇ ТА МОЛІБДОВОЛЬФРАМОФОСФАТНОЇ ГПК ІЗ ПОВЕРХНЕЮ МОДИФІКОВАНОГО ТДАН СИЛКАГЕЛЮ**

Для іммобілізації ГПК як носії було обрано високодисперсні кремнеземи з огляду на такі властивості, як: хімічна та механічна стійкість, відсутність набухання, висока швидкість масообміну та седиментації, відсутності власного поглинання у видимій ділянці спектру. До того ж поверхня нефункціоналізованих кремнеземів містить силанольні групи, які здатні утворювати зв'язки з донорними атомами молекул модифікатора, не погіршуючи його хіміко-аналітичних властивостей [165]. Для надання СГ аніонообмінних властивостей, його попередньо модифікували адсорбцією високомолекулярної четвертинної амонієвої солі аліфатичної природи – ТДАН, що здатна до утворення з аніонами ГПК малорозчинних іонних асоціатів. Вибір ТДАН обумовлений особливостями його хімічної будови, відсутністю власного поглинання у видимій ділянці спектру та здатністю утворювати іонні асоціати з гетерополіаніонами [1А].

З метою вибору кремнеземної матриці для розробки окисно-відновних ТР, було досліджено сорбційю ГПК2 модифікованими ТДАН кремнеземами різних типів (розділ 2, табл. 2.1). Виявилось, що непоруватий кремнезем Sillardum найкраще вилучає гетерополіаніон з водного розчину. Ємність пориватих сорбентів за ГПК2 дещо менша, але з точки зору зручності та швидкості седиментації сорбенту для подальшої роботи обрали сорбент SG-60 фірми “Merk”.

#### **3.1. Синтез та ідентифікація різнолігандної молібдостибієвофосфатної гетерополікислоти**

При виборі ГПК як аналітичних форм керувалися такими критеріями: а) високі окисно-відновні властивості; б) стійкість гетерополікомплексу; в) якомога більша розчинність. З літератури відомо, що окисно-відновна

здатність ГПК збільшується в ряду центральних атомів:  $\text{Si} < \text{Ge} < \text{P} < \text{As}$  [16] та зменшується в ряду металів  $\text{V} > \text{Mo} > \text{W}$  [3]. Тому, молібдофосфатні ГПК є найбільш розповсюдженими аналітичними формами для визначення як центральних атомів, так і ряду відновників [9]. Відомо [22, 174–176], що при заміщенні одного із атомів молібдену у молібдофосфатній ГПК структури Кеггіна на атом багатозарядного металу стійкість комплексу різко підвищується та збільшується інтервал кислотності утворення ГПА. З огляду на це, було обрано різнолігандну молібдотибієвофосфатну ГПК складу  $\text{H}_6\text{PSbMo}_{11}\text{O}_{40}$  (ГПК1). Згідно даних літератури [178] ГПК1 швидко утворюється у розчині та відновлюється при кімнатній температурі впродовж 5 хв і є менш розчинною, порівняно із  $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ , що особливо важливо у випадку іммобілізації ГПА на поверхню сорбенту шляхом сорбції з водних розчинів. Крім того, доступність реагентів та простота процедури отримання та відновлення ГПК1 обумовили вибір даної аналітичної форми для розробки готової аналітичної форми на її основі для подальшої розробки методик ТСФ й тест-визначення відновників.

Однак, у літературі зустрічаються різні дані щодо утворення різнолігандних ГПА у розчині. У роботі [177] стверджується, що за оптимальних умов утворення ГПК структури Кеггіна у присутності  $\text{Sb(III)}$  у розчині утворюється гетерополікомплекс складу  $\text{PSb(III)Mo}_{11}\text{O}_{40}^{6-}$ . Утворення такої ГПК було підтверджено спектрофотометричним методом [178]. З іншого боку за таких умов може утворюватися сіль стибію (III) і сильної триосновної молібдофосфатної ГПК складу  $\text{SbPMo}_{12}\text{O}_{40}$ , при відновленні якої можуть відбуватися зміни спектральних характеристик ГПК. Для встановлення структури та стану ГПК застосовують ряд методів, зокрема рентген-флуоресцентний, ЕПР-, ІЧ- та ЯМР-спектроскопію. Спектроскопія ядерно-магнітного резонансу широко застосовується для дослідження динаміки перетворення гетерополіаніонів у розчині та встановлення структури ГПК, оскільки дає можливість ідентифікувати гетерополіаніони різних структурних типів, а також виявити різні структурні ізомери, не порушуючи рівновагу в

системі. Значних результатів у вивченні стану ГПК у розчинах досягнуто завдяки застосуванню спектроскопії ЯМР на ядрах  $^{31}\text{P}$ ,  $^{51}\text{V}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{183}\text{W}$ ,  $^{95}\text{Mo}$  і ін. [179–183].

У роботі ЯМР-спектроскопію було застосовано для доведення факту утворення різнолігандної молібдостибієвофосфатної ГПК. Для цього було приготовлено розчини більш стійких відновлених форм молібдофосфатної та молібдостибієвофосфатної ГПК. «Сині» форми ГПК отримували дією відновника середньої сили, а саме аскорбінової кислоти, з наступною екстракцією. З літератури відомо, що ГПК і їх солі екстрагуються із підкислених водних розчинів кисневмісними органічними розчинниками (спирти, прості і складні етери, кетони, альдегіди) [184, 185], та розчинами нітрогеновмісних сполук (амінів) у неполярних розчинниках (бензол, хлороформ) [185]. Для ефективної екстракції гетерополісполук необхідна наявність основного атома Оксигену або Нітрогену в органічній молекулі екстрагенту, тому для вилучення фосфатних ГПК використовували ізобутиловий спирт. Найбільш повне вилучення гетерополіаніонів відбувалося з 25,0 мл водного розчину в 6,0 мл ізобутанолу. Спиртові екстракти упарювали за кімнатної температури до повного вилучення розчинника. Для реєстрації ЯМР спектрів на ядрах ізотопу фосфору  $^{31}\text{P}$  проби розчиняли у органічному розчиннику – диметилсульфоксиді (ДМСО). Зі спектрів видно, що молібдофосфатна ГПК має один сигнал при 12,3 ppm (рис. 3.1). За даними літератури [181, 186] саме в діапазоні 12–15 ppm дають сигнал молібдофосфатні, вольфрамофосфатні та ванадієвофосфатні гетерополікислоти при розщепленні на ядрах ізотопу фосфору. Введення у гетерополіаніон двох різних лігандів, наприклад молібдену та ванадію, а також двох різних центральних атомів може зміщувати сигнал у бік менших міліонних долей. З рис. 3.2 видно, що при введенні гетероатома Стилбію (III) фосфор розщеплюється близько 3,3 ppm. Значний хімічний зсув на 8,9 м. д. свідчить про утворення за таких умов двох різних гетерополіаніонів, а не солі  $\text{Sb(III)}$  з молібдофосфатною ГПК.

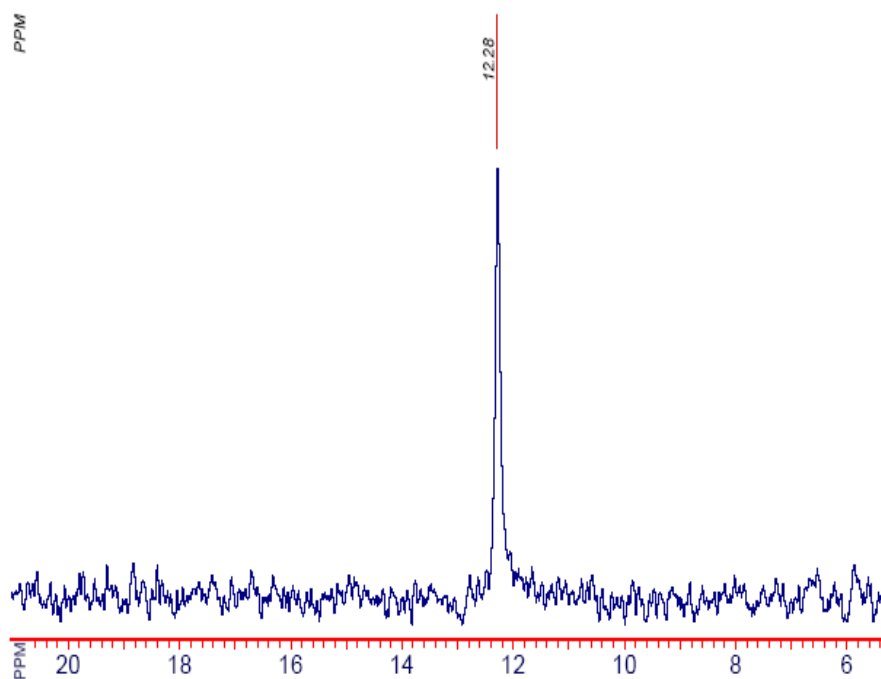


Рис. 3.1. ЯМР спектр молібдофосфатної ГПК на ядрах  $^{31}\text{P}$ . Стандарт – поліфосфатна кислота, розчинник – ДМСО

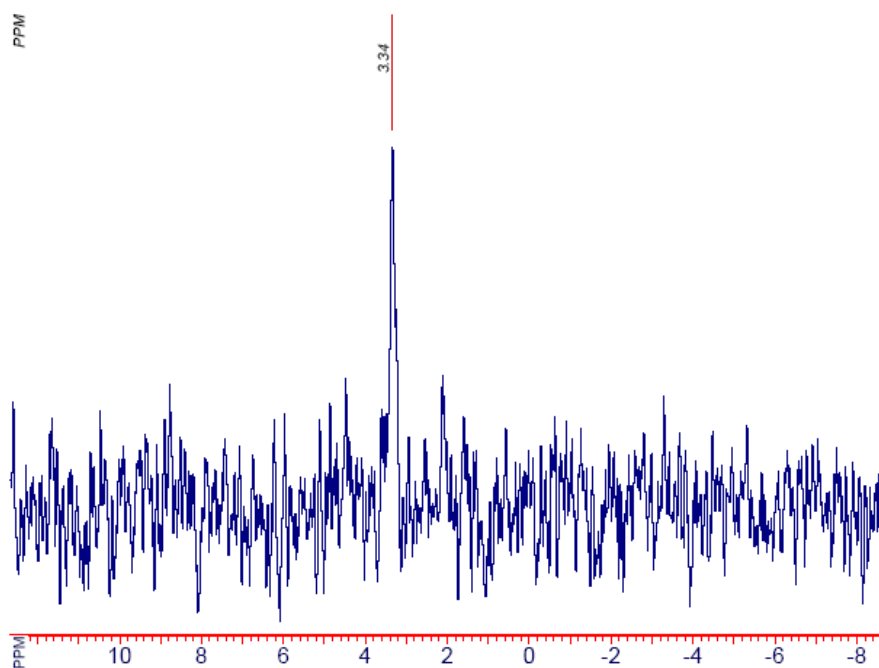


Рис. 3.2. ЯМР спектр молібдостибієвофосфатної ГПК на ядрах  $^{31}\text{P}$ . Стандарт – поліфосфатна кислота, розчинник – ДМСО

Отже, з отриманих даних можна припустити, що за присутності стибію(III) у розчині утворюється різнолігандна молібдостибієвофосфатна ГПК. Вірогідна будова утвореної ГПК зображена на рис. 3.3 [144]:

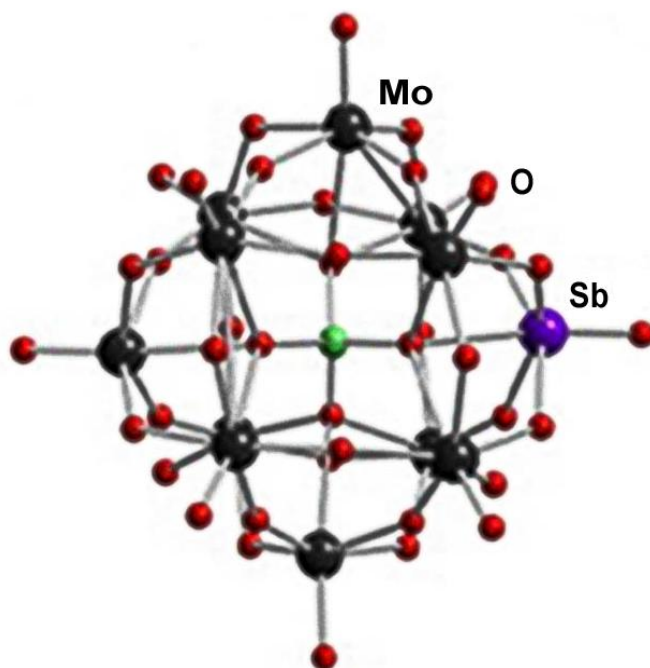


Рис. 3.3. Структурна будова різнолігандної молібдостибієвофосфатної ГПК

### 3.2 Взаємодія на межі розділу фаз «розчин окиснених форм ГПК – іммобілізований на силікагелі ТДАН»

Сорбцію окиснених молібдостибієвофосфатної (ГПК1) та молібдовольфрамфосфатної (ГПК2) гетерополікислот на ТДАН–СГ вивчали у статичному режимі. Отримання ГПК у розчині передбачає введення значного надлишку молібдат-іонів. При контакті з кремнеземною матрицею у такому розчині утворюється у певній кількості молібдосилікатна ГПК, що ускладнює контроль рівноважної концентрації досліджуваних ГПК після сорбції. З огляду на це всі дослідження проводили за присутності 0,1 М розчину солі винної кислоти, яка перешкоджає утворенню молібдосилікатної кислоти при контакті кремнеземної матриці з молібдат-іонами. Контроль рівноважної концентрації «жовтих» фосфатних ГПК за їх власним поглинанням також виявився неможливим через суттєве поглинання

молібдату при  $\lambda = 310\text{--}320$  нм. Тому концентрацію ГПК після сорбції контролювали спектрофотометрично, відновлюючи їх аскорбіновою кислотою до «сині» та вимірюючи оптичну густину при 750 нм. Для цього було побудовано градувальні залежності, параметри яких наведено у табл. 3.1.

Таблиця 3.1.

Параметри градувальних графіків для визначення рівноважної концентрації ГПК у розчині:  $C_{H^+} = 1,0$  моль/л,  $C_{\text{тартрату}} = 0,1$  моль/л,  $l = 1,0$  см.

$$A = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C_{\text{ГПК}}, \text{ ммоль/л}$$

ГПК	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	Діапазон лінійності, ммоль/л
ГПК1	$0,004 \pm 0,018$	$0,165 \pm 0,003$	0,01– 0,1
ГПК2	$-0,02 \pm 0,001$	$0,0304 \pm 0,0002$	0,01– 0,2

Дослідження кінетики сорбції ГПК1 та ГПК2 показало, що рівновага на межі розділу фаз встановлюється впродовж 3 та 5 хв, відповідно (рис. 3.4). При цьому ГПК1 та ГПК2 вилучаються кількісно на 98 % і 90 %, відповідно.

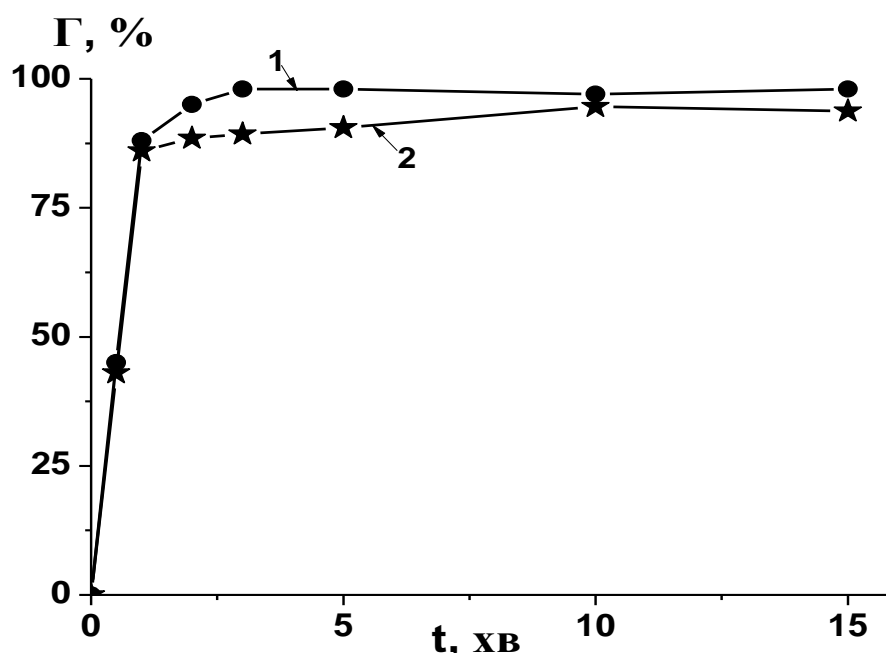


Рис.3.4. Ступінь вилучення ГПК1 (1) та ГПК2 (2) з водного розчину модифікованим сорбентом залежно від часу контакту фаз.  $V/m = 100$  мл/г,  $C_{\text{ГПК1}} = 0,003$  ммоль/л,  $C_{\text{ГПК2}} = 0,368$  ммоль/л,  $C_{\text{тартрату}} = 0,1$  моль/л

З метою встановлення максимального співвідношення об'єму розчину до маси сорбенту для вилучення окиснених ГПК готували серію розчинів, що містять 0,1 мкмоль ГПК1 або 4,6 мкмоль ГПК2 у 5, 10, 25, 50, 100 мл розчину. Сорбцію ГПК проводили у статичному режимі впродовж 5 хв. З рис. 3.5 видно, що ГПК1 та ГПК2 кількісно вилучається при співвідношення  $V/m$  – 0,2 та 0,5 л/г, відповідно. У подальшому ТР на основі ГПК1 та ГПК2 отримували сорбцією модифікованим ТДАН силікагелем при співвідношенні об'єму розчину модифікатора до маси сорбенту 0,1 та 0,005 л/г, відповідно.

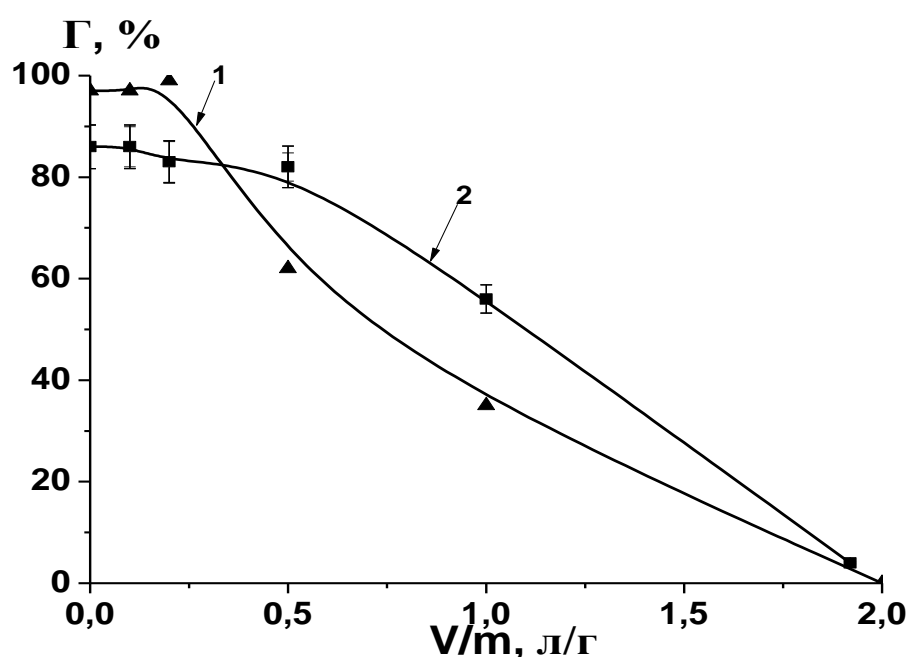


Рис. 3.5. Сорбція ГПК1 (1) та ГПК2 (2) з водного розчину ТДАН-СГ залежно від співвідношення  $V/m$ ;  $\nu(\text{ГПК1}) = 0,1$  мкмоль,  $\nu(\text{ГПК2}) = 2,3$  мкмоль,  $m = 0,05$  г,  $a_{\text{ТДАН}} = 25$  мкмоль/г

За оптимальних умов утворенні у розчині ( $\text{pH} < 1$ ) було досліджено адсорбцію окиснених форм ГПК на силікагелі, модифікованому ТДАН, залежно від їх рівноважної концентрації. З рис. 3.6 видно, що ізотерма адсорбції ГПК1 належить до Н1-типу [190]. Наявність ділянки хемосорбції вказує на високу спорідненість ГПК1 до поверхні сорбенту, що може свідчити про іоно-асоціативну природу її закріплення на ТДАН-СГ.

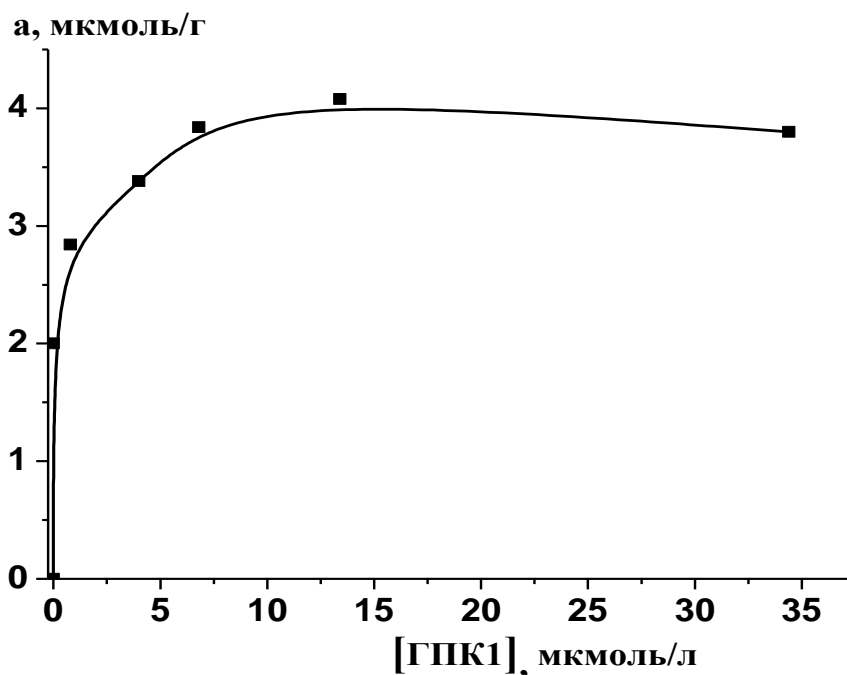


Рис. 3.6. Ізотерма адсорбції ГПК1 на ТДАН–СГ;  $a(\text{ТДАН})=25$  мкмоль/г,  $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5$  моль/л,  $T=291\pm 1$  К,  $V/m = 0,5$  л/г

Ділянка ізотерми сорбції у діапазоні рівноважної концентрації 1,0–8,0 мкмоль/л формально може бути лінеаризована у координатах Ленгмюра.

Рівняння прямої в даних координатах має вид:

$$C/a = (0,22\pm 0,03) + (0,235 \pm 0,005) \cdot [\text{ГПК1}], \text{ мкмоль/л } (R^2=0,995)$$

Гранична ємність сорбенту за ГПК1 становить  $a_{\text{max}} = 4,2\pm 0,2$  мкмоль/л, а умовна константа сорбції –  $K = 2,4 \cdot 10^5$  л/моль. Максимальний коефіцієнт концентрування при  $V/m = 0,2$  л/г рівний 4,8 л/г.

З рис. 3.6 видно, що ізотерма адсорбції ГПК2 на модифікованому силікагелі може бути віднесена до Н4-типу [190]. Наявність ділянки хемосорбції також вказує на високу спорідненість ГПК до поверхні сорбенту, що може свідчити про іоно-асоціативну природу її закріплення на силікагелі. При збільшенні концентрації ГПК2 у розчині понад 0,1 ммоль/л її вилучення відбувається за механізмом міжмолекулярної взаємодії («С»-ділянка ізотерми).

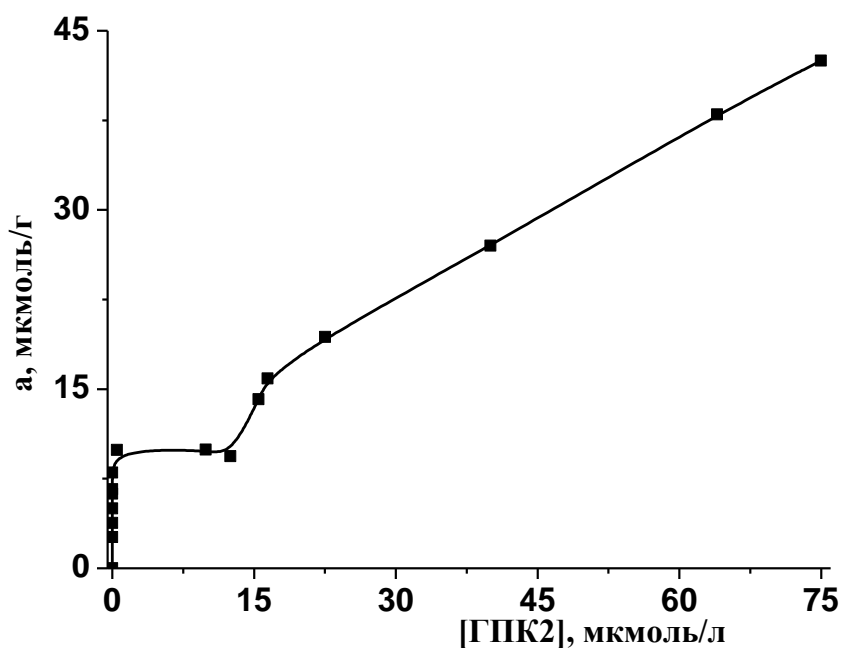


Рис. 3.6. Ізотерма адсорбції ГПК2 на ТДАН–СГ;  $a(\text{ТДАН})=25$  мкмоль/г,  
 $C(\text{H}_2\text{SO}_4) = 0,5$  моль/л,  $T=291\pm 1$  К,  $V/m = 0,25$  л/г

Ємність сорбенту за ГПК2, що відповідає утворенню моношару дорівнює  $a_{\text{max}} = 9,1\pm 0,2$  мкмоль/г при ємності сорбенту за ТДАН 25 мкмоль/г. Максимальний коефіцієнт концентрування при  $V/m = 0,6$  л/г рівний  $2,4 \pm 0,3$  л/г (рис. 3.7).

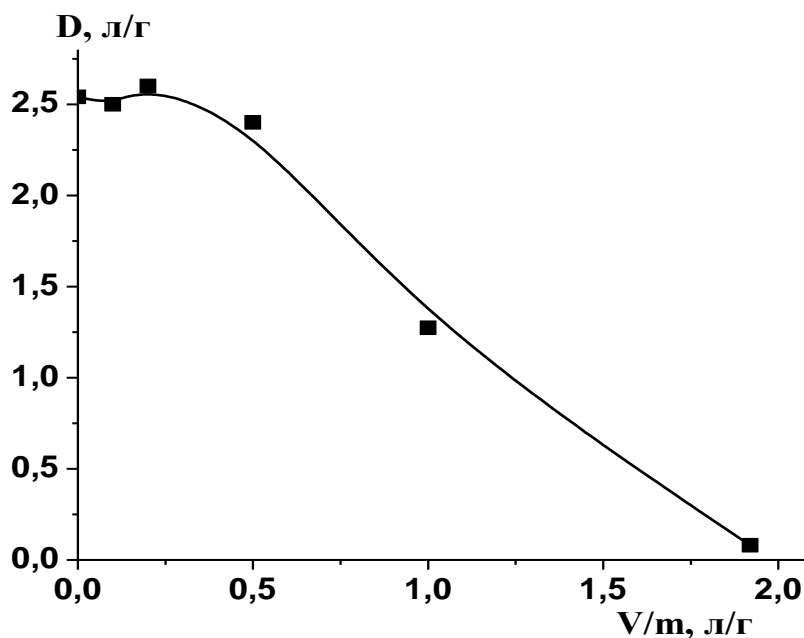
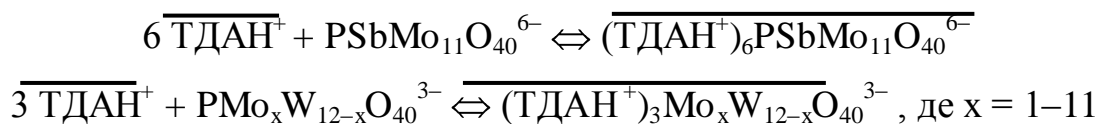
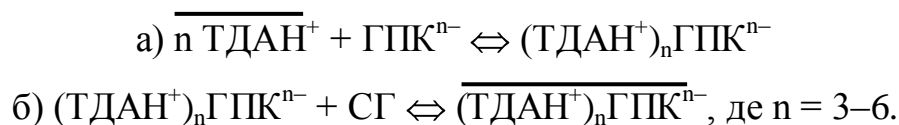


Рис. 3.7. Коефіцієнт концентрування ГПК2 з водного розчину модифікованим сорбентом залежно від співвідношення  $V/m$ .  $v(\text{ГПК2}) = 2,3$  мкмоль,  $m = 0,05$  г,  $t = 5$  хв,  $a_{\text{ТДАН}} = 25$  мкмоль/г.

Співвідношення ємності сорбенту за ГПК1 та ГПК2, що відповідає граничній ділянці хемосорбції, до ємності за ТДАН становить відповідно 1:6 та 1:3. З огляду на домінуючі у розчині за цих умов протолітичні форми «жовтих» ГПК, а саме  $\text{PSbMo}_{11}\text{O}_{40}^{6-}$  та  $\text{PMo}_x\text{W}_{12-x}\text{O}_{40}^{3-}$ , можна припустити утворення на поверхні іонних асоціатів:



Утворення на поверхні ІА такої високої стехіометрії, вірогідно, може бути реалізовано у двох випадках. Один з них – це острівковий характер закріплення ТДАН на силікагелі. На користь такого припущення свідчить виявлений раніше методом  $\text{H}^1$  ПМР спектроскопії заморожених водних суспензій значний внесок дисперсійних сил у закріплення на кремнеземах високомолекулярних аліфатичних ЧАС [210]. З іншого боку, утворення ІА може бути пов'язано із вилученням ГПК у два етапи: а) у сильнокислому середовищі ТДАН частково десорбується і взаємодіє з ГПК у приповерхневому шарі, б) іонний асоціат, який є менш розчинним порівняно із ГПК, вилучається силікагелем. Такий механізм утворення ІА на поверхні силікагелю було раніше виявлено СФ методом для більш розчинної забарвленої гетероциклічної ЧАС [3А]. Утворення ІА у другому випадку може бути представлено схемою:



Для перевірки висунутих припущень щодо природи закріплення «жовтих» ГПК на поверхні модифікованого сорбенту, а саме: острівковий характер закріплення ТДАН і утворення ІА при сорбції ГПК, найбільш інформативні є методи ІЧ-спектроскопії та термодесорбції [187, 188].

### 3.3. Іоно-асоціативний зв'язок: можливі механізми. Роль інших типів взаємодій

Методом ІЧ–спектроскопії через інтенсивне поглинання матриці кремнезему в інтервалі  $790\text{--}1070\text{ см}^{-1}$  не вдалось надійно ідентифікувати смуги поглинання ГПК та ІА. Сигнали активних груп самої поверхні накладаються, а за інтенсивністю вони на декілька порядків перевищують сигнали смуг, обумовлених наявністю на поверхні адсорбційно закріплених речовин. З огляду на це метод ІЧ–спектроскопії виявився не придатним для з'ясування природи іммобілізації ГПК на поверхні модифікованого СГ [189].

У даній роботі для дослідження природи закріплення ТДАН та ГПК на немодифікованому та модифікованому силікагелі відповідно використали метод термодесорбції. Для дослідження природи закріплення ТДАН на поверхні приготували зразки:

- Зразок 1 Холостий (немодифікований силікагель)
- Зразок 2 Адсорбований ТДАН на СГ
- Зразок 3 Імпрегнований ТДАН на СГ
- Зразок 4 Адсорбований ТДАН на непоруватому СГ

Всі зразки нагрівали у діапазоні температур  $30\text{--}800\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

З холостого зразку десорбуються хімічно зв'язана вода і домішки, що містяться у СГ. При нагріванні зразків 2–4, які містять четвертинну амонієву сіль, спостерігається вилучення частинок, маси яких можна віднести до залишків ТДАН. Найбільш характеристичними з них є 69, 70, 83, 84 та 97 m/Z. Ці маси можуть відповідати частинкам  $\text{C}_5\text{H}_9^+$ ,  $\text{C}_5\text{H}_{10}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{11}^+$ ,  $\text{C}_6\text{H}_{12}$ ,  $\text{C}_7\text{H}_{13}^+$ , відповідно. Підтвердженням того, що ці частинки є залишками однієї речовини є однакова форма термодесорбційних спектрів вилучення цих мас (рис. 3.8). На рис. 3.9 видно, що десорбція частинок зі зразку 2, в якому ТДАН закріплено на кремнеземі шляхом адсорбції, відбувається за більш високих температур порівняно зі зразком 3, в якому ТДАН закріплено шляхом імпрегнування. Це підтверджує той факт, що адсорбований ТДАН

утримується на поверхні міцніше імпрегнованого [159], що обумовлено іншим типом зв'язків.

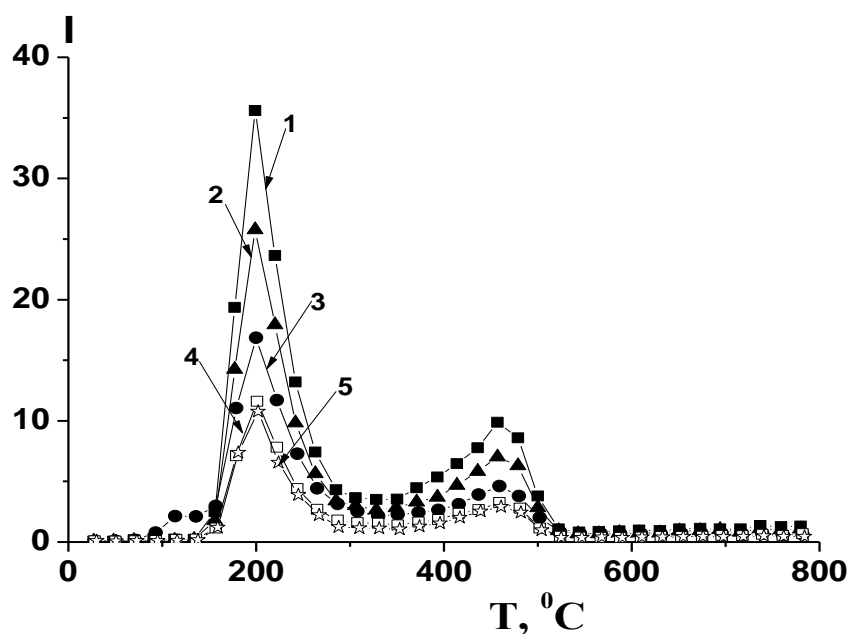


Рис. 3.8 Термодесорбційні спектри частинок адсорбованого ТДАН з масами,  $m/Z$ : 70 (1), 69 (2), 83 (3), 84 (4) та 97 (5)

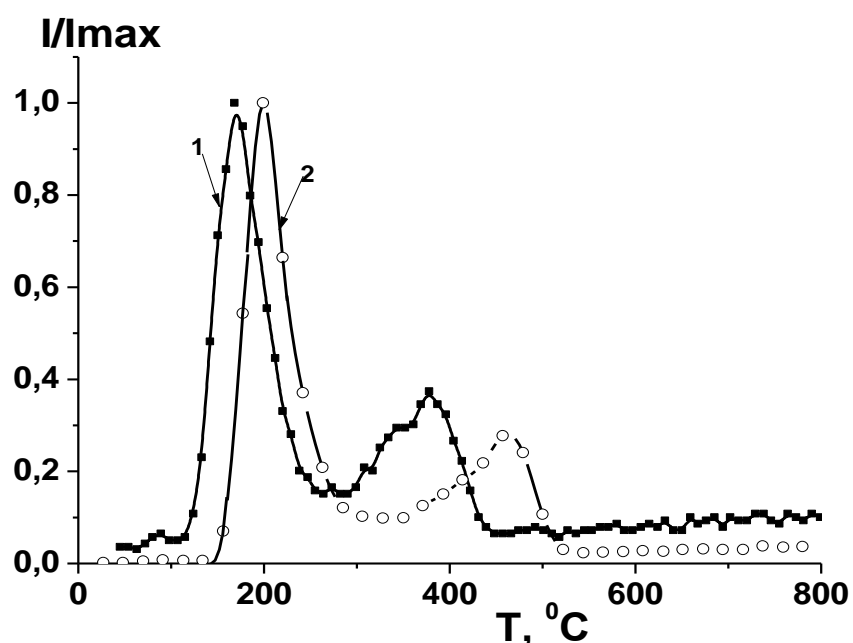


Рис. 3.9. Нормовані термодесорбційні спектри частинок імпрегнованого (1) та адсорбованого (2) ТДАН з масою 70  $m/Z$

При нагріванні модифікованого силікагелю адсорбований (імпрегнований) ТДАН десорбується з поверхні в два етапи, про що свідчить два максимуми на кривій (рис. 3.9).

Для розрахунку кінетичних характеристик термодесорбційні спектри частинок з обраними масами було оброблено як криві першого порядку за методом Цветановича [167] (рис. 3.10). За отриманими даними було розраховано енергію термодесорбції (додаток А). Значення енергії десорбції частинок адсорбованого та імпрегнованого ТДАН, при температурах максимуму, рівні  $100 \pm 10$  і  $81 \pm 6$  кДж/моль, відповідно. Частота вилучення частинок адсорбованого та імпрегнованого ТДАН становить  $1,1 \cdot 10^9$  і  $0,9 \cdot 10^9$  с<sup>-1</sup>, відповідно.

Високотемпературний максимум десорбції ( $T = 462$  °С) також обробили як криву першого порядку за методом Цветановича. Енергія десорбції для цього максимуму значно вища і становить  $141 \pm 5$  кДж/моль з частотою  $8,3 \cdot 10^7$  с<sup>-1</sup>. Це може бути обумовлено або взаємодією ТДАН у порах сорбенту, або наявністю кількох типів взаємодій на поверхні сорбенту. Щоб підтвердити чи спростувати ці припущення дослідили десорбцію частинок ТДАН з непоруватого кремнезему Sillardum. Виявилось, що термодесорбційні спектри непоруватого і поруватого сорбентів характеризується двома максимумами (рис. 3.11). Отже припущення щодо взаємодії у порах сорбенту не підтвердилось. Таким чином, отримані результати підтверджують наявність кількох типів взаємодій у закріпленні ТДАН на поверхні сорбенту, що може бути непрямым підтвердженням раніше отриманих даних щодо важливої ролі дисперсійних взаємодій та острівкового характеру закріплення ТДАН на СГ.

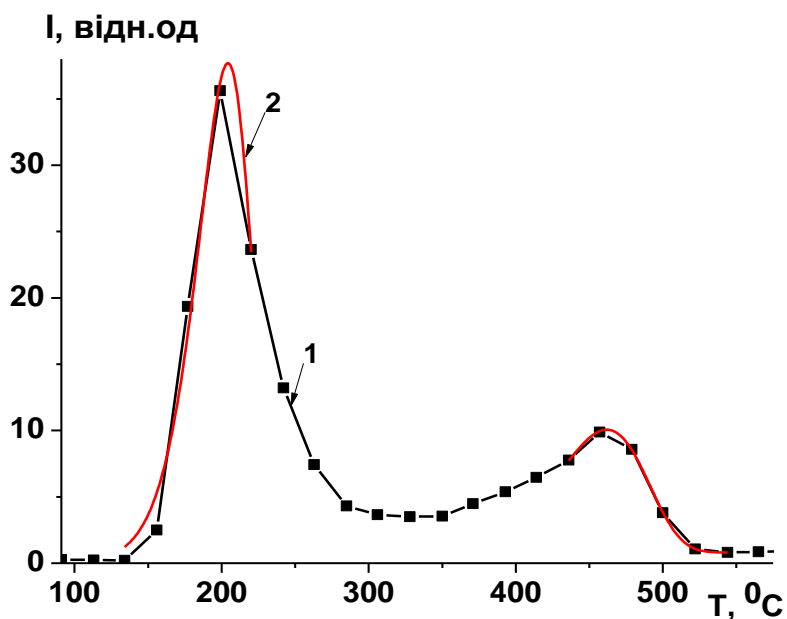


Рис. 3.10. Термодесорбційний спектр частинок адсорбованого ТДАН (1) з масою 70 m/Z та результати його обробки за методом Цветановича (2)

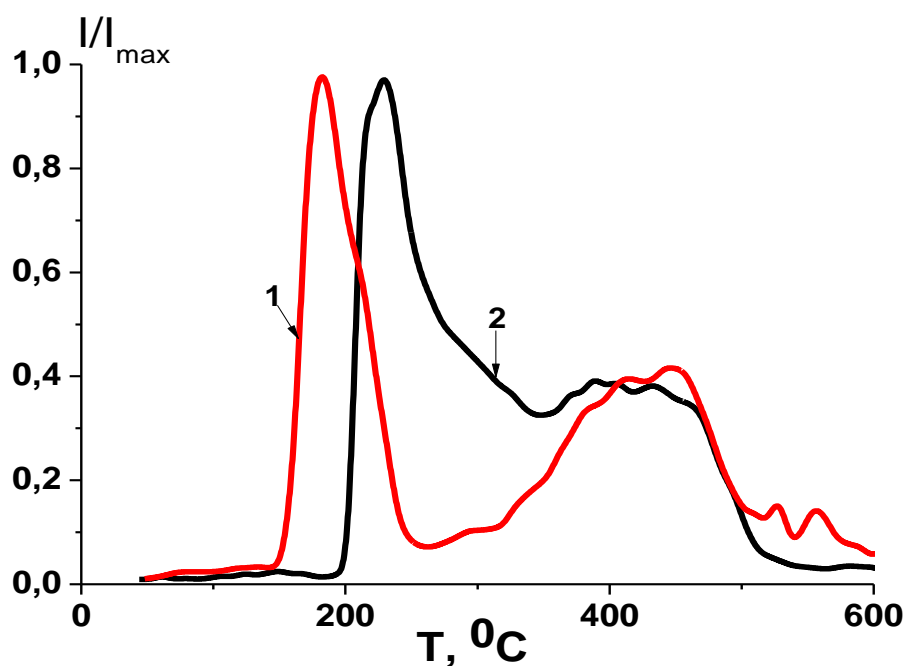


Рис. 3.11. Термодесорбційний спектр частинок ТДАН з масою 70 m/Z імпрегнованого на поверхні поруватого (1) та непоруватого (2) сорбенту

Для дослідження природи закріплення ГПК на поверхні модифікованого ТДАН силікагелю приготували зразки:

Зразок 5 Адсорбований ІА «ГПК1–ТДАН» на СГ

Зразок 6 Імпрегнований ІА «ГПК1–ТДАН» на СГ

Зразок 7 Імпрегнований ІА «ГПК1–ТДАН» на непоруватому СГ

Зразок 8 Імпрегнована ГПК1 на СГ

Всі зразки нагрівали у діапазоні температур 30–800 °С.

З рис. 3.12 (криві 1 та 2) видно, що у присутності адсорбованої на поверхні ТДАН-СГ ГПК максимум у спектрі термодесорбції зміщується у бік вищих температур, а високотемпературний пік практично зникає. Термодесорбційні спектри адсорбованої ГПК1 (рис.3.12, крива 2), та імпрегнованого ІА (ТДАН)<sub>6</sub>ГПК1<sup>6-</sup> (рис. 3.12, крива 3) є подібними, що може свідчити на користь утворення на поверхні модифікованого сорбенту сполуки ідентичного складу.

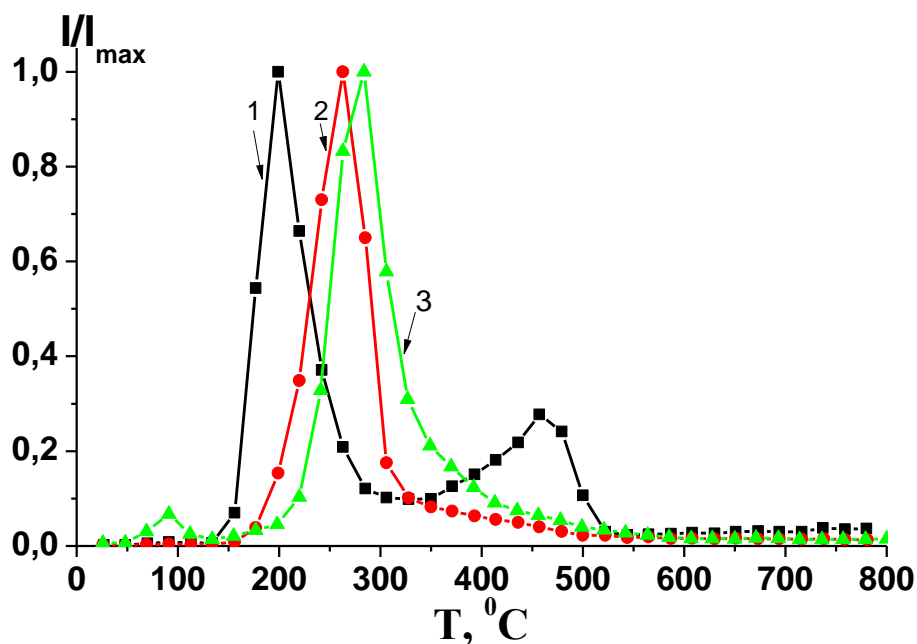


Рис. 3.12. Нормовані термодесорбційні спектри частинок з масою 70 m/Z адсорбованого ТДАН (1); адсорбованої ІА на ТДАН–СГ ГПК1 (2) та імпрегнованого на СГ іонного асоціату (ТДАН)<sub>6</sub>ГПК1<sup>6-</sup> (3)

Значення енергії десорбції частинок адсорбованого ТДАН, імпрегнованого та адсорбованого ІА при температурі максимуму мають близькі значення, а саме  $100 \pm 10$ ,  $104 \pm 10$ ,  $91 \pm 5$  та кДж/моль, відповідно.

Близькі значення енергій десорбції свідчать про те, що частинки ТДАН вилучаються з поверхні в однаковому положенні, не зважаючи на природу закріплення. Частота вилучення частинок адсорбованого ТДАН становить  $1,1 \cdot 10^9 \text{ c}^{-1}$ , що значно перевищує частоту вилучення для ІА: адсорбованого –  $\nu_0 = 7,1 \cdot 10^6 \text{ c}^{-1}$  та імпрегнованого –  $\nu_0 = 5,7 \cdot 10^7 \text{ c}^{-1}$ . Цей факт можна пояснити стеричним фактором та різною силою утримування ТДАН на поверхні, що свідчить про різну природу закріплення.

Таким чином, отримані дані дають підставу вважати, що обидва механізми утворення ІА на поверхні є рівно вірогідними.

Втім наявність іоно-асоціативного зв'язку не дає вичерпного пояснення стійкості адсорбованої ГПК1 до вимивання з поверхні розчинами електролітів з високою іонною силою. Ймовірно, закріплення ГПК на поверхні сорбенту відбувається також за участю водневих зв'язків між донорними атомами гетерополіаніону і ОН-групами поверхні, що було раніше доведено для ряду «синіх» ГПК [1А, 2А].

З рис. 3.13 і 3.14 видно, що, як і у випадку іммобілізованого ТДАН, високотемпературний пік вилучення не може бути обумовлений взаємодією у порах сорбенту, а пов'язаний з наявністю іншого центру сорбції на його поверхні.

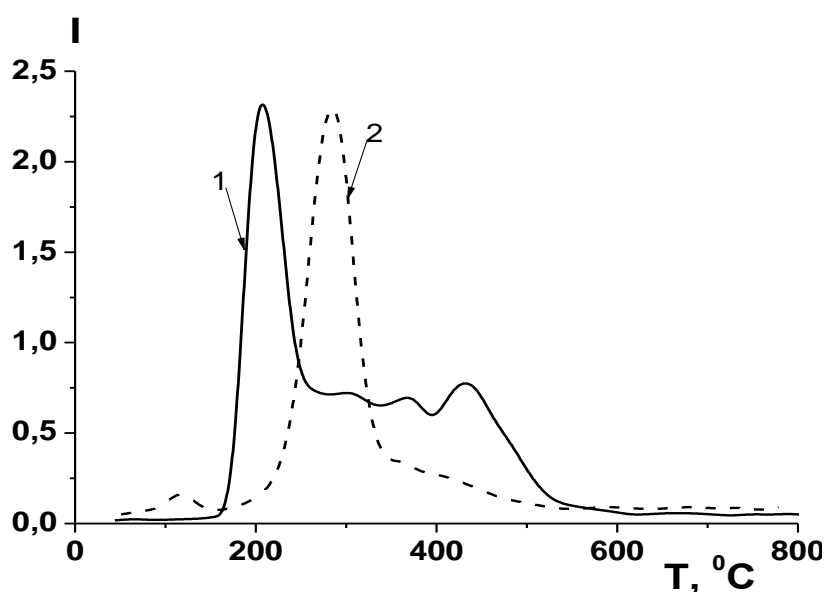


Рис. 3.13. Термодесорбційні спектри частинки адсорбованого ТДАН (1) та ІА (2) масою 70 m/Z з поверхні непоруватого сорбенту

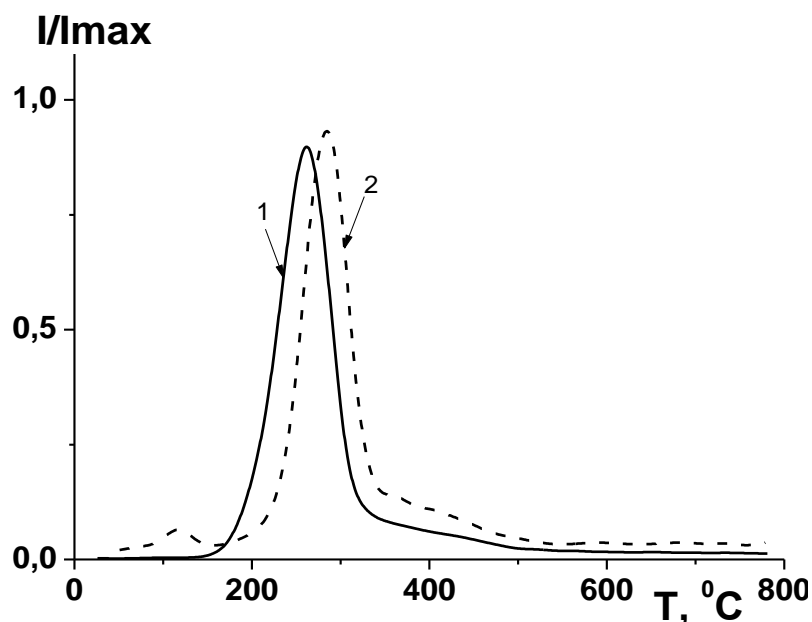


Рис. 3.14. Термодесорбційні спектри частинок адсорбованого ІА (2) масою 70 m/Z з поверхні поруватого (1) та непоруватого (2) сорбенту

При нагріванні зразку 8 спостерігали десорбцію води з поверхні кремнезему та частинок, маси яких відносяться до залишків бутилового спирту, який використовували для екстракції та імпрегнування ГПК. Десорбція з поверхні мас, які б відповідали частинкам ГПК не зафіксовано за будь-якої температури. Це можна пояснити великим розміром гетерополіаніону, особливостями його будови та міцним закріпленням на поверхні, завдяки чому навіть при високих температурах енергії не вистачає для розриву зв'язків ГПК та вилучення її з поверхні.

Отже, дослідження природи закріплення ГПК силікагелі, модифікованому ТДАН, сорбційними та спектроскопічними методами, показало, що закріплення аніонів ГПК на поверхні ТДАН–СГ відбувається не лише за рахунок електростатичних взаємодій, але й за участю активних груп поверхні СГ [2А].

Отримані дані підтверджують раніше висунуте припущення, що четвертинні амонієві солі утримуються на поверхні сорбенту не тільки за рахунок електростатичних сил притягання, а і за рахунок менш сильних взаємодій, зокрема дисперсійних сил [187].

### 3.4. Висновки до розділу 3

Методом ЯМР-спектроскопії було доведено, що у присутності іонів стибію у кислому середовищі утворюється молібдостибієвофосфатна кислота. Модифікований сорбент швидко і кількісно вилучає окиснені форми різнолігандних ГПК1 та ГПК2 з водного розчину за оптимальних умов утворення ГПК у розчині. Встановлено, що на поверхні утворюється іонний асоціат, який має таку саму конфігурацію як і у розчині.

Міцне закріплення ГПК на поверхні ТДАН–СГ за умов утворення моношару обумовлено іоно-асоціативною взаємодією ГПК з іммобілізованим ТДАН та менш сильною дисперсійною взаємодією. Стійкість адсорбованої ГПК до вимивання розчинами електролітів з високою іонною силою дає підставу вважати, що закріплення ГПК на поверхні сорбенту відбуваються також за участю водневих зв'язків між донорними атомами гетерополіаніону і ОН-групами поверхні. Таке закріплення модифікатора на сорбенті сприяє стабілізації окиснених ГПК до дії відновників та підвищення їх стійкості у лужних розчинах.

## РОЗДІЛ 4. ВЗАЄМОДІЯ РОЗРОБЛЕНИХ ТР ІЗ ВІДНОВНИКАМИ РІЗНОЇ ПРИРОДИ

### 4.1. Дослідження умов автоокиснення адреналіну люмінесцентним методом

Для визначення катехоламінів як аналітичну форму обрано різнолігандну молібдостибієвофосфатну ГПК (ГПК1), оскільки стійкість різнолігандних ГПА вища, порівню з одностандними, та більший інтервал кислотності їх утворення [22, 174–176]. Крім того ГПК1 має більший окисно-відновний потенціал та меншу розчинність, що особливо важливо у випадку іммобілізації ГПА на поверхню сорбенту [178]. Через стабілізацію поверхнею СГ окисненої форми ГПК1, вона взаємодіє з більш сильними відновниками, зокрема катехоламінами.

Іммобілізована ГПК1 взаємодіє з катехоламінами у лужному середовищі. Відомо [88-102], що адреналін є багатоосновною кислотою (табл. 4.1) і у лужному середовищі схильний до автоокиснення.

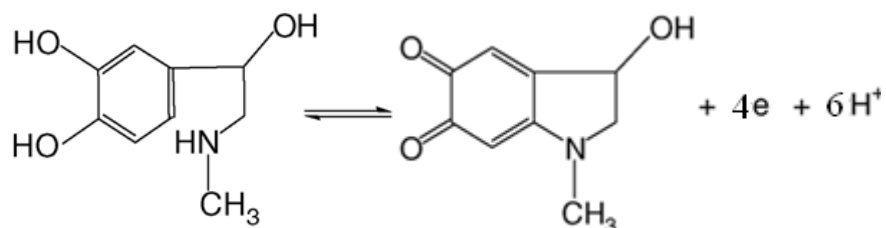
З огляду на це необхідно було встановити, за яких умов у розчині відбувається автоокиснення адреналіну. Одним із найбільш інформативних методів у цьому плані є люмінесцентний метод.

Спектр люмінесценції адреналіну у кислому середовищі при збудженні світлом з довжиною хвилі 215 і 277 нм має дві смуги з максимумами у жовтій та синій ділянках спектру (рис. 4.1). Інтенсивність люмінесценції зростає пропорційно збільшенню концентрації адреналіну у розчині (рис. 4.2). Лінійність зберігається у межах 5-100 мкмоль/л (табл. 4.2)

## Протолітичні форми адреналіну залежно від рН розчину

Протолітична рівновага		pK <sub>a</sub>	Література
 $+ \text{OH}^- \leftrightarrow$	 $+ \text{H}_2\text{O}$	8,5	[100]
<p>pH<sub>існування</sub> 0–8</p>	<p>pH<sub>існування</sub> 8–9,5</p>		
 $+ \text{OH}^- \leftrightarrow$	 $+ \text{H}_2\text{O}$	9,8	[102]
<p>pH<sub>існування</sub> 8–9,5</p>	<p>pH<sub>існування</sub> 9,5–10,5</p>		
 $+ \text{OH}^- \leftrightarrow$	 $+ \text{H}_2\text{O}$	11,8	[101]
<p>pH<sub>існування</sub> 9,5–10,5</p>	<p>pH<sub>існування</sub> 10,5–13,5</p>		
 $+ \text{OH}^- \leftrightarrow$	 $+ \text{H}_2\text{O}$	13,5	[102]
<p>pH<sub>існування</sub> 10,5–13,5</p>	<p>pH<sub>існування</sub> 13,5–14</p>		

Схема автоокиснення адреналіну у лужному середовищі:



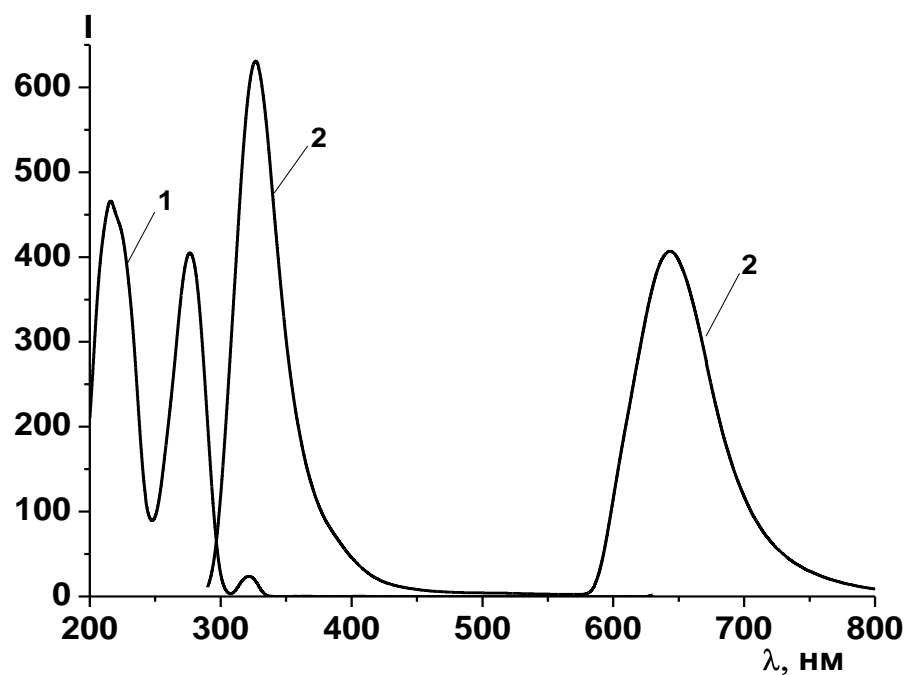


Рис.4.1. Спектри збудження (1) та люмінесценції (2) адреналіну:  $C_{\text{Адр}} = 0,1$  ммоль/л,  $\text{pH} = 4,45$ ,  $\lambda_{\text{Ex}} = 215$  нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 645$  нм, щілини 15:10

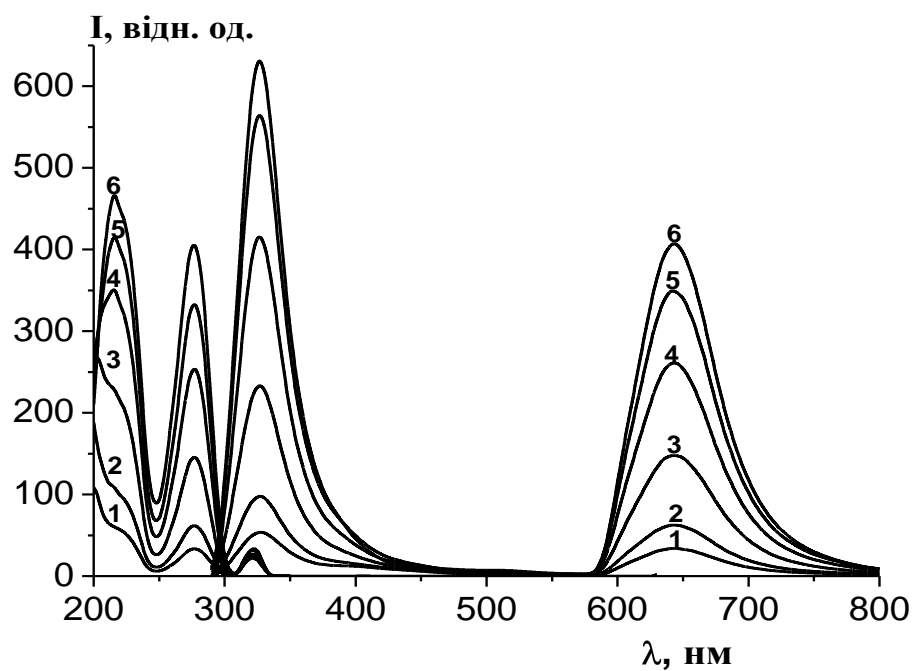


Рис. 4.2. Спектри збудження та люмінесценції залежно від концентрації адреналіну:  $C_{\text{Адр}}$ , мкмоль/л: 5,0 (1), 10 (2), 25 (3), 50 (4), 75 (5), 100 (6);  $\text{pH} = 4,45$ ,  $\lambda_{\text{Ex}} = 215$  нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 645$  нм

Параметри лінійної залежності інтенсивності люмінесценції від концентрації адреналіну у розчині,  $I_{Em} = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C$ , мкмоль/л

Речовина	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	$R^2$	Діапазон лінійності, мкмоль/л
$I_{Em, 327 \text{ нм}}$	$31 \pm 14$	$7,3 \pm 0,3$	0,997	5–100
$I_{Em, 645 \text{ нм}}$	$21 \pm 10$	$4,5 \pm 0,2$	0,996	5–100

Для досліджень використовували комерційний препарат адреналіну гідротартрат, що містить як консерванти хлорбутанол або метабісульфіт натрію [196]. Наявністю цих домішок, зокрема хлорбутанолу, зумовлена присутність мало інтенсивної смуги з  $\lambda = 320$  нм у спектрі збудження адреналіну (рис. 4.1). Хлорбутанол при опроміненні світлом з  $\lambda = 215$  нм не випромінює світло і не заважає визначенню адреналіну в препаратах, що містять консервант.

Дослідження люмінесценції залежно від рН розчину показало, що спектр люмінесценції адреналіну (рН 1–5) характеризуються двома максимумами (рис. 4.3). У спектрі люмінесценції молекулярної і моноаніонної форм (рН = 8–10) з'являється широка смуга люмінесценції з максимумом при 500 нм (рис. 4.3). При підвищенні рН > 11 спостерігається гіпсохромний зсув максимуму до 450 нм, що обумовлено люмінесценцією трианіону адреналіну.

При подальшому додаванні лугу до розчину адреналіну спектр його люмінесценції зазнає змін. При збільшенні концентрації лугу понад 2 моль/л у спектрі люмінесценції з'являється ще одна смуга, максимум якої припадає на 520 нм (рис. 4.4, криві 4–6), що обумовлено, ймовірно, появою у розчині продукту автоокиснення адреналіну – адренохрому [97]. У середовищі 6,0 моль/л лугу окиснення адреналіну відбувається практично миттєво і люмінесценція зумовлена тільки продуктом окиснення. У цьому випадку у спектрі люмінесценції наявна лише одна смуга з  $\lambda = 520$  нм (рис. 4.4, крива 7).

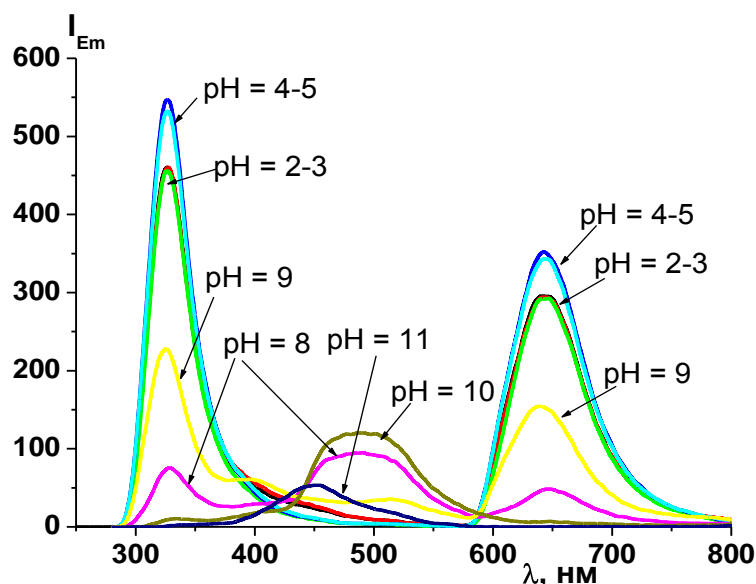


Рис. 4.3. Спектри люмінесценції адреналіну залежно від рН розчину:

$C_{\text{Адр}} = 50$  мкмоль/л,  $\lambda_{\text{Ех}} = 215$  нм, щілини 15:10

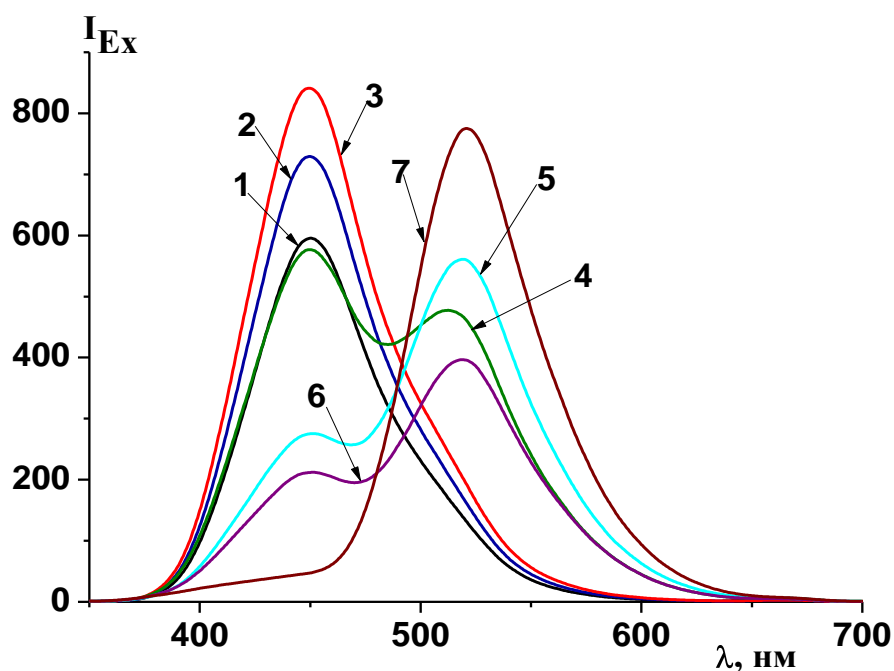


Рис. 4.4. Спектри люмінесценції адреналіну у розчині лугу різної концентрації.  $C_{\text{Адр}} = 50$  мкмоль/л,  $C_{\text{NaOH}}$ , моль/л: 0,5 (1), 1 (2), 2 (3), 3 (4), 4 (5), 5 (6), 6 (7);  $\lambda_{\text{Ех}} = 330$  нм, щілини 15:10

Утворення продукту окиснення адреналіну у лужному середовищі підтверджується також змінами у спектрах збудження (рис. 4.5) поглинання (рис. 4.6) розчину адреналіну. Так, розчин адреналіну у кислому середовищі

має характеристичну смугу поглинання при 279 нм [62]. У середовищі концентрованого лугу ця смуга виражена меншою мірою, що може вказувати на утворення продукту окиснення адреналіну – адренохрому.

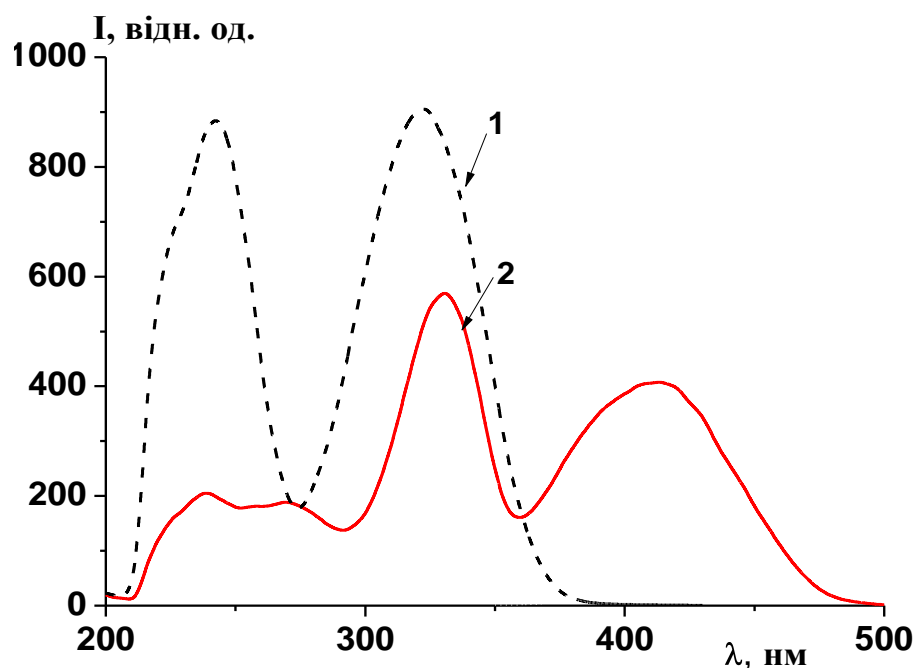


Рис. 4.5. Спектри збудження адреналіну у розчині NaOH різної концентрації,  $C_{\text{Адр}} = 50$  мкмоль/л,  $C_{\text{NaOH}} = 2$  М (1),  $C_{\text{NaOH}} = 6$  М (2),  $\lambda_{\text{Em}} = 520$  (450) нм, щілини 15:5

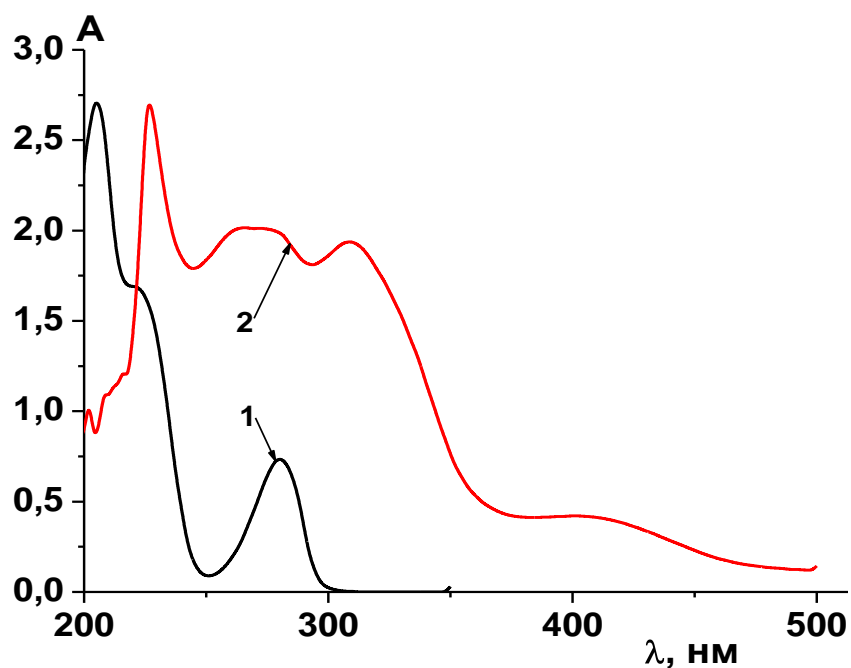


Рис. 4.6. Спектри поглинання адреналіну у кислому та лужному середовищі.  $C_{\text{Адр}} = 50$  мкмоль/л; концентрації, моль/л: HCl – 0,01 (1), NaOH – 6,0 (2)

Таким чином, у діапазоні рН 9–11 адреналін існує у розчині у стабільній до автоокиснення формі моно- і діаніонів.

З метою вибору буферного розчину для підтримування сталого значення рН було перевірено ряд буферують сумішей, серед яких ацетатний, гідрофталатний, фосфатний та боратний буферні розчини.

Виявлено, що у середовищі боратного буферного розчину з рН  $10,1 \pm 0,1$  форма спектрів збудження та люмінесценції розчинів адреналіну відрізняється від спектрів у середовищі гідроксиду натрію при такому самому значенні рН. Із рис. 4.7 видно, що максимум смуги люмінесценції за таких умов спостерігається при довжині хвилі 500 нм, а спектр збудження при довжині хвилі люмінесценції має чотири смуги.

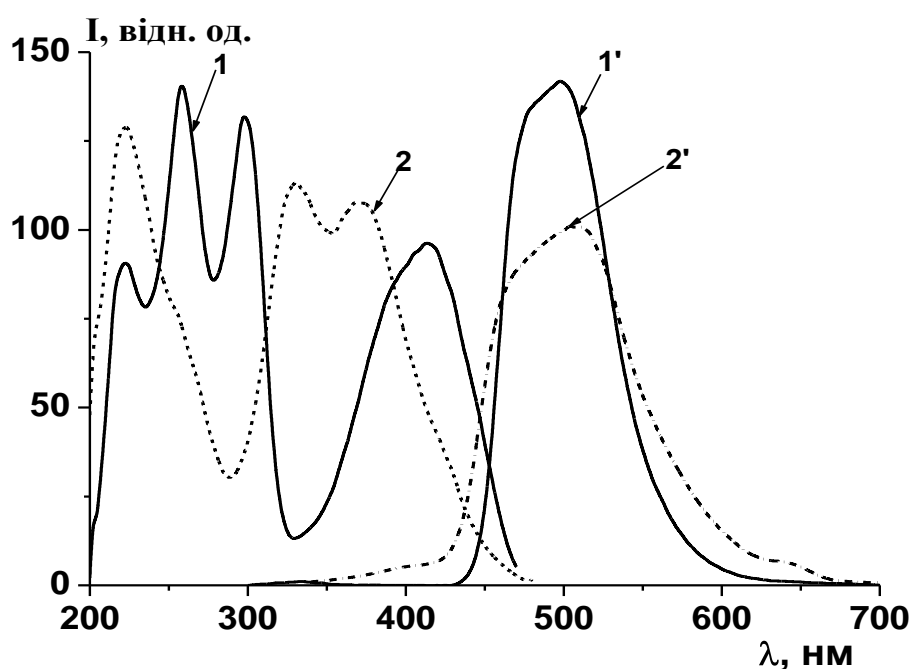
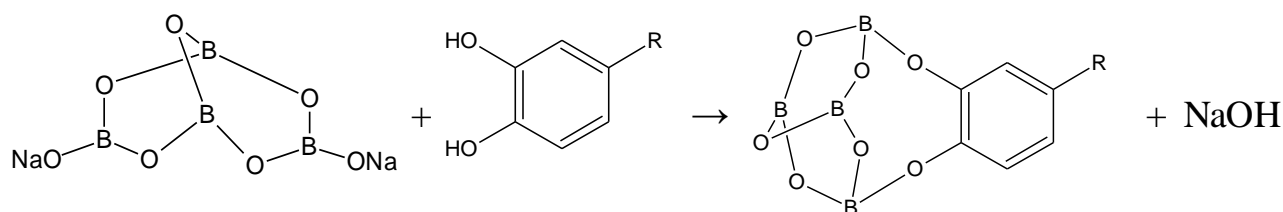


Рис. 4.7. Спектри збудження (1, 2) та люмінесценції (1', 2') адреналіну у присутності (1, 1') та за відсутності (2, 2') тетраборату натрію:  $C_{\text{Адр}} = 50$  мкмоль/л, рН = 10,1;  $\lambda_{\text{Ex}} = 258$  (215) нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 500$  нм

Така зміна у спектрах може бути зумовлена утворенням комплексу адреналіну, який має дві гідроксогрупи у бензольному ядрі, з боратом. За даними літератури [197] борна кислота при рН = 7–8 може взаємодіяти з катехоламіном з утворенням комплексу складу 1:1.

Можна припустити, що у лужному середовищі тетраборат також утворює комплексну сполуку з катехоламинами:



Рівновага в системі «розчин адреналіну – 0,05 М розчин тетраборату натрію» при рН = 10,1 встановлюється впродовж 45 хв (рис. 4.8). Найвища інтенсивність люмінесценції спостерігається у присутності 0,05–0,07 М тетраборату натрію (рис. 4.9).

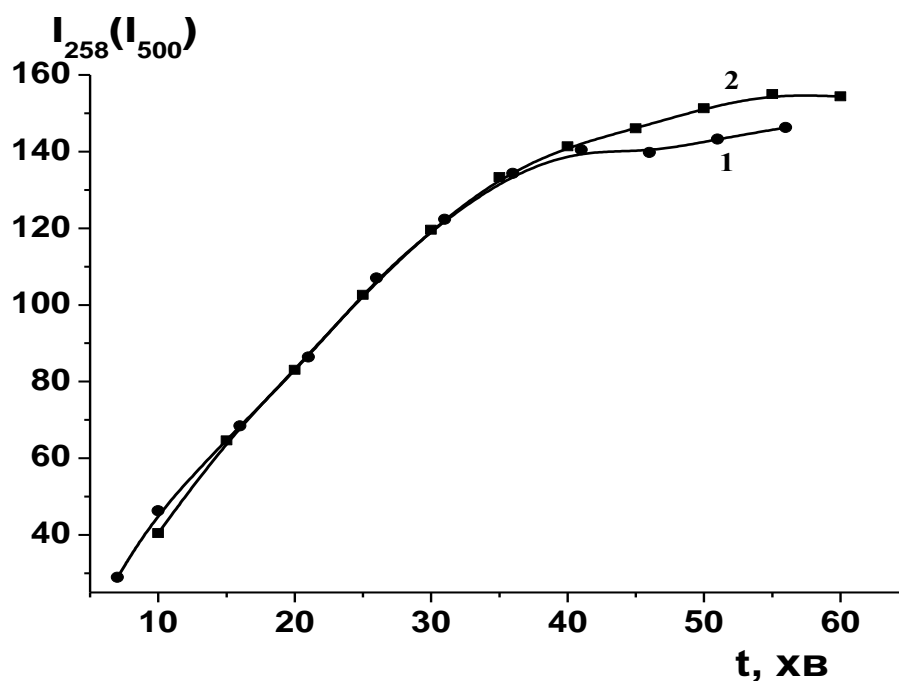


Рис. 4.8. Інтенсивність смуг у спектрах збудження (1) та люмінесценції (2) залежно від часу взаємодії з тетраборатом натрію.  $C_{\text{Адр}} = 5$  мкмоль/л,

$$C_{\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7} = 0,05 \text{ M}, \lambda_{\text{Ex}} = 258 \text{ нм}, \lambda_{\text{Em}} = 500 \text{ нм}, \text{pH} = 10,1$$

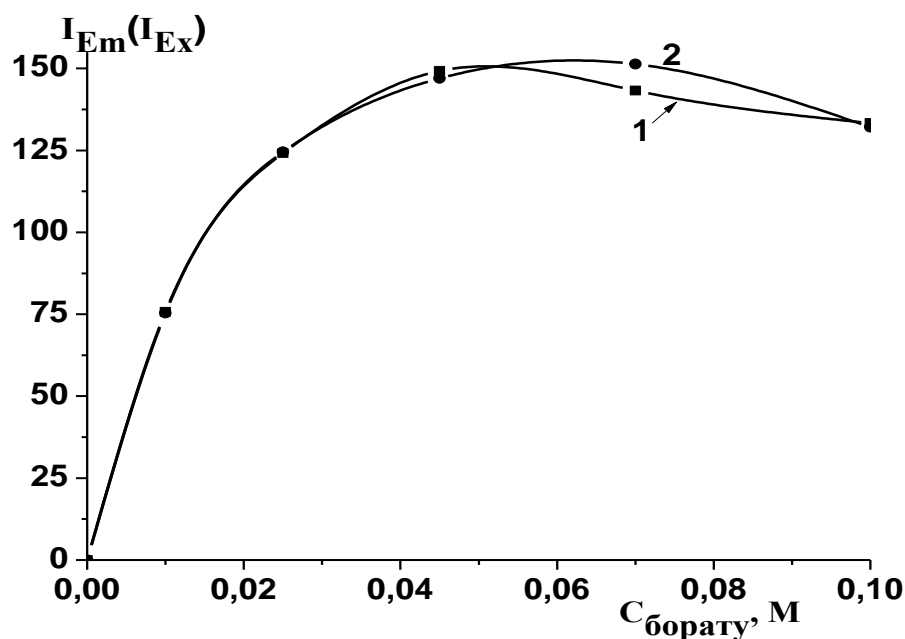


Рис. 4.9. Інтенсивність смуг збудження (1) та люмінесценції (2) адреналіну залежно від концентрації тетраборату натрію:  $C_{\text{Адр}} = 5$  мкмоль/л,  $\lambda_{\text{Ex}} = 258$  нм,  $\lambda_{\text{Em}} = 500$  нм, рН = 10,1

Для підтвердження припущення щодо взаємодії адреналіну з тетраборатом початкову ділянку кривої на рис. 4.9 було оброблено за методом Бента і Френча (додаток Б) [198]. Оскільки тільки один із компонентів реакції випромінює світло, то рівноважну концентрацію комплексу та константу його стійкості розраховували за формулами:

$$[C_{\text{комплексу}}] = \frac{I_i C_{\text{Адр}}}{I_{\text{max}}} \quad (4.1)$$

$$K = \frac{I_i}{(I_{\text{max}} - I_i) [B_4O_7^{2-}]^n} \quad (4.2)$$

Рівноважну концентрацію адреналіну розраховують:

$$[Адр] = C_{\text{Адр}} - C_{\text{комплексу}} = C_{\text{Адр}} \left( \frac{I_{\text{max}} - I_i}{I_{\text{max}}} \right) \quad (4.3)$$

де  $I_i$  – інтенсивність люмінесценції адреналіну в певній точці на кривій,  $I_{\text{max}}$  – максимальна інтенсивність люмінесценції адреналіну на кривій,  $[B_4O_7^{2-}]^n$  – рівноважна концентрація тетраборату натрію.

На початковій ділянці кривої можна вважати, що  $[B_4O_7^{2-}] \approx C(Na_2B_4O_7)$ . Константа стійкості комплексу, а також його склад встановлювали напівлогарифмічним методом, побудувавши залежність в координатах  $\lg\left(\frac{I_{\max} - I_i}{I_{\max}}\right) - \lg[B_4O_7^{2-}]^n$ , що описується рівнянням 4.4.

$$\lg\left(\frac{I_{\max} - I_i}{I_{\max}}\right) = \lg K + n \lg[B_4O_7^{2-}] \quad (4.4)$$

Отримана логарифмічна залежність має лінійний характер і описується рівнянням:

$$\lg\left(\frac{I_{\max} - I_i}{I_{\max}}\right) = (2,2 \pm 0,1) + (1,14 \pm 0,04) \cdot [B_4O_7^{2-}]$$

Отримані результати підтверджують утворення комплексу між адреналіном та тетраборатом натрію складу 1:1. Аналогічні дослідження було проведено для дофаміну.

## 4.2. Оптимізація умов визначення катехоламінів методом ТСФ

Дослідження взаємодії ряду органічних відновників показало, що іммобілізована ГПК1 у лужному середовищі кількісно відновлюється катехоламінами. Водночас більш слабкі органічні відновники, такі як поліфеноли, не взаємодіють із іммобілізованою ГПК1, вірогідно через стабілізацію поверхнею СГ її окисненої форми.

### 4.2.1. Встановлення оптимальних умов взаємодії іммобілізованої молібдостибієвофосфатної ГПК з катехоламінами

З метою розробки методики ТСФ визначення катехоламінів іммобілізованою ГПК1 досліджено залежність аналітичного відгуку від кислотності середовища. Для цього готували серію розчинів адреналіну об'ємом 10,0 мл з концентрацією 0,50 ммоль/л, з різними значеннями рН, додавали наважку сорбенту масою 0,15 г та перемішували впродовж 10 хв.

Після цього сорбент відділяли декантацією, промивали його розчином з відповідним рН та вимірювали оптичну густину у тонкому шарі.

З рис. 4.10 видно, що діапазон рН розчину, в якому аналітичний сигнал залишається практично сталим, становить 9,0 – 11,0. Тому в подальших дослідженнях рН створювали боратним буферним розчином, рН якого рівне  $10,6 \pm 0,2$ . Оскільки концентрація тетраборату натрію у такому буфері рівна  $0,026$  моль/л, тільки деяка незначна частина адреналіну буде зв'язана у комплекс з тетраборатом, що не впливає на величину окисно-відновного потенціалу адреналіну за цих умов.

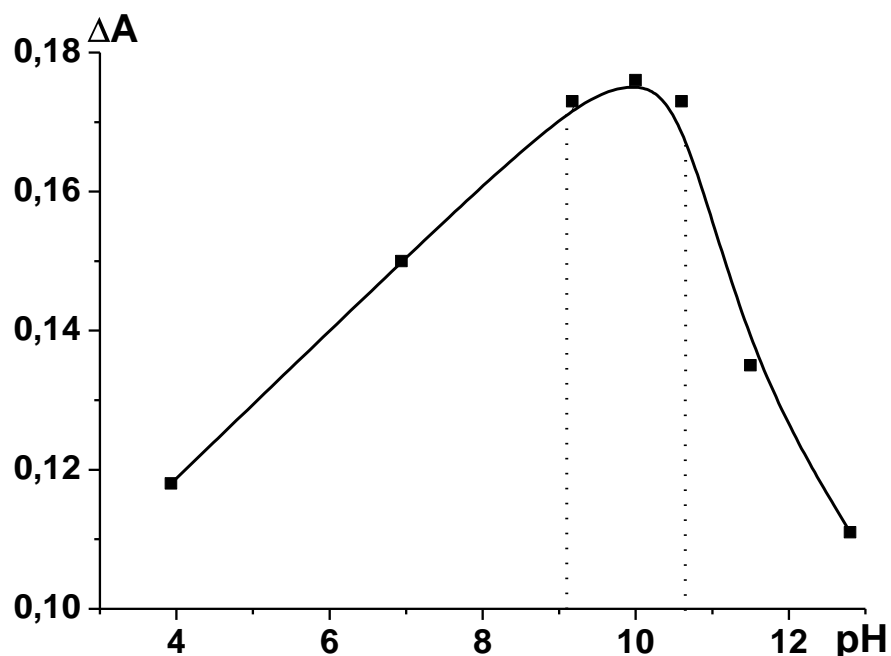
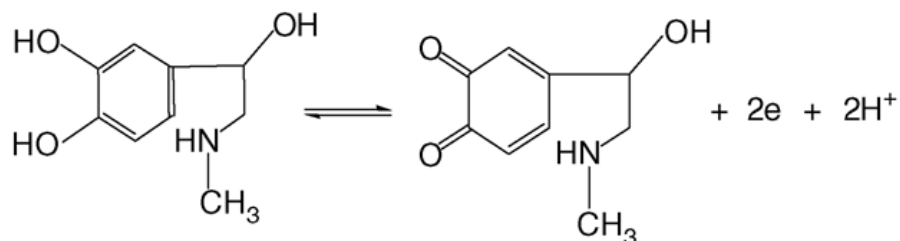


Рис. 4.10. Поглинання іммобілізованої ГПК 1 після обробки розчином адреналіну залежно від рН розчину.  $C_{\text{Адр}} = 0,5$  ммоль/л,  $V/m = 67$  мл/г.

$$\Delta A = A_{730} - A_{996}$$

Дані літератури свідчать, що окисно-відновний потенціал адреналіну та дофаміну коливається в межах  $0,20\text{--}0,38$  В [199, 200]. Із підвищенням рН розчину значення окисно-відновного потенціалу катехоламінів зменшується, а їх відновна здатність збільшується [71, 201], що пояснює пропорційне збільшення поглинання ТР після контакту з адреналіном в діапазоні рН =  $4,0\text{--}10,5$ . Подальше зменшення аналітичного сигналу з підвищенням рН може бути

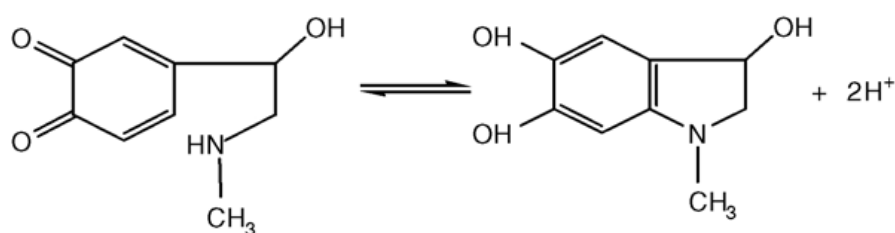
обумовлено частковим автоокиснення адреналіну до адренохрому, який не має відновлювальних властивостей. В окисно-відновній реакції катехоламінів беруть участь два електрони, тому механізм реакції окиснення адреналіну можна представити такою схемою:



Адреналін

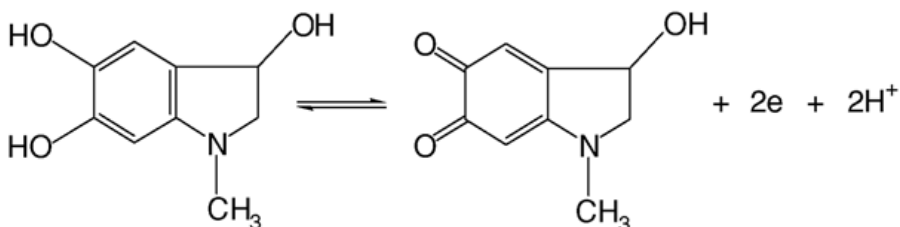
Адреналін-хінон

Із підвищенням рН розчину прискорюється процес перетворення адреналін-хінону у лейкадренохром з подальшим його окисненням до адренохрому [201, 202].



Адреналін-хінон

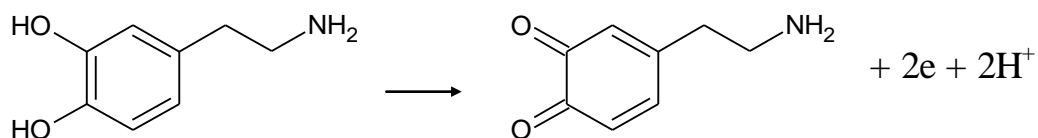
Лейкадренохром



Лейкадренохром

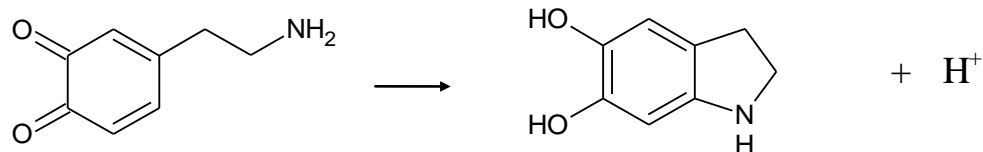
Адренохром

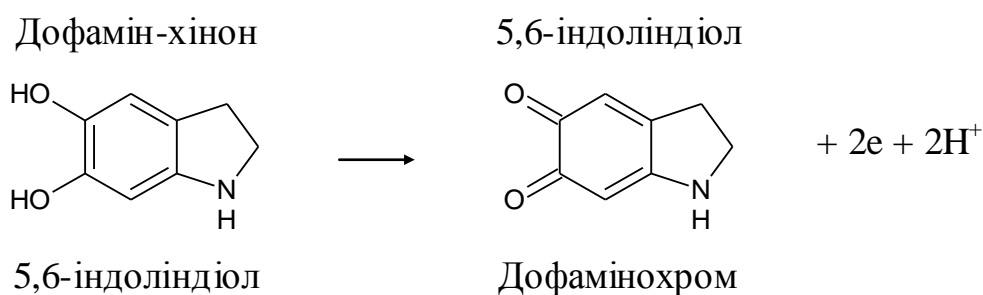
Окиснення дофаміну можна представити подібними схемами [202]:



Дофамін

Дофамін-хінон





За оптимального рН розчину рівновага окисно-відновної реакції адреналіну і дофаміну з іммобілізованою ГПК1 встановлюється впродовж 5 хв (рис. 4.11).

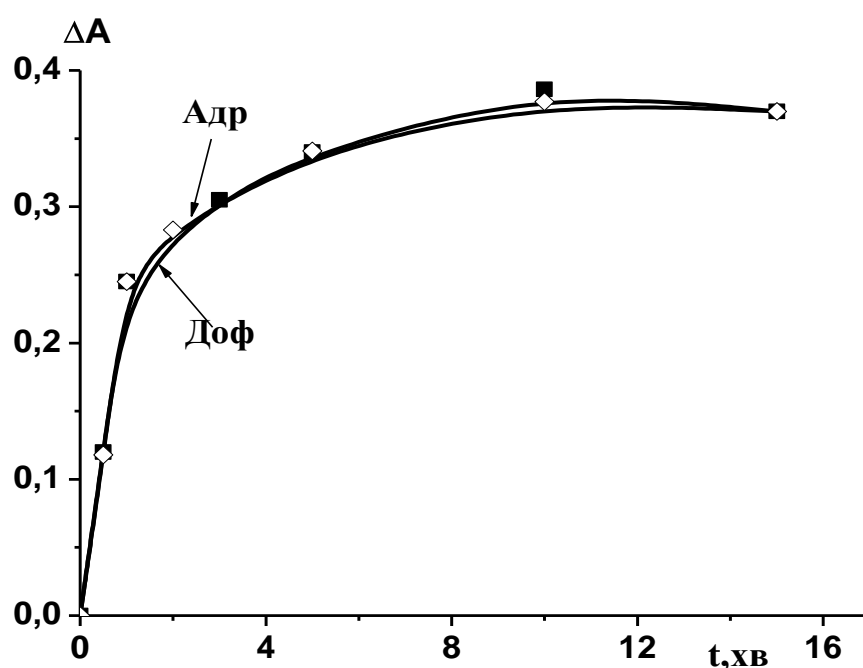


Рис. 4.11. Аналітичний сигнал залежно від часу контакту іммобілізованої ГПК1 з розчином дофаміну та адреналіну.  
 $C_{\text{відновників}} = 0,50 \text{ ммоль/л}$ ,  $\text{pH} = 10,6$ ;  $V/m = 67 \text{ мл/г}$ .  $\Delta A = A_{660} - A_{\text{хол}}$

З метою встановлення оптимального співвідношення об'єму проби до маси ТР, при якому відновник вступає в реакцію кількісно, дослідили залежність аналітичного сигналу від співвідношення об'єму проби до маси сорбенту.

Для окисно-відновної гетерофазної реакції характерно, що найбільший аналітичний сигнал спостерігається при взаємодії з меншим об'ємом

відновника. Так з рис. 4.12 видно, що оптимальним співвідношенням об'єму проби до маси ТР є 25–80 мл/г.

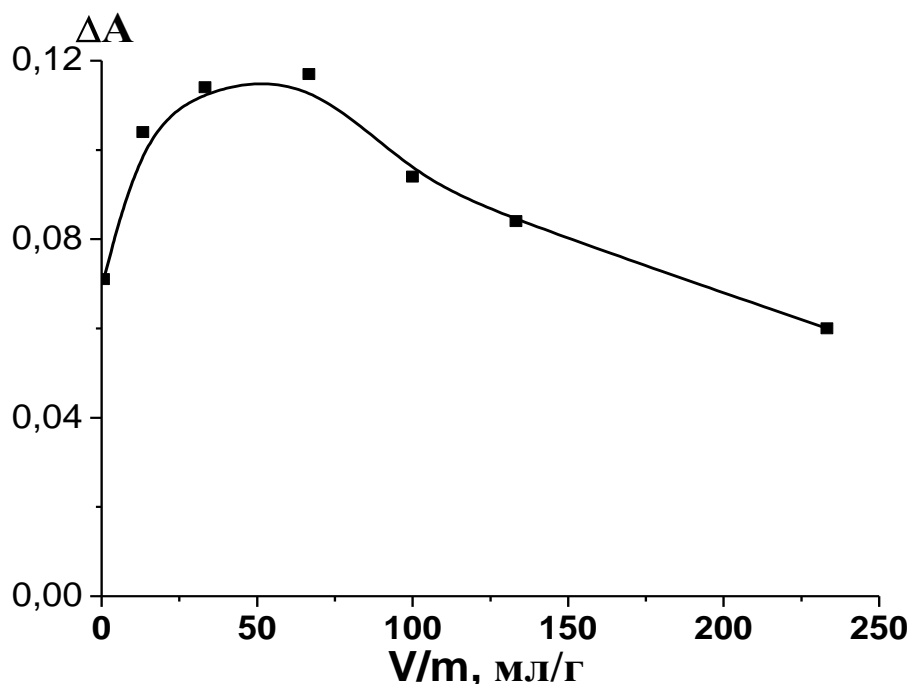
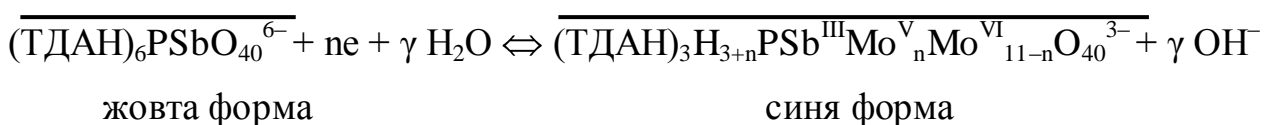


Рис. 4.12. Зміна аналітичного сигналу залежно від співвідношення V/m, рН= 10,6; C<sub>Адп</sub> = 50 ммоль/л

Дослідження залежності поглинання модифікованих сорбентів від концентрації адреналіну та дофаміну показало, що поглинання сорбенту у тонкому шарі при  $\lambda = 730$  нм після обробки іммобілізованої ГПК1 розчином відновника зростає пропорційно збільшенню концентрації відновника у розчині (рис. 4.13). При цьому колір ТР змінюється від жовтого до синього, що може бути використано для розробки кольорової тест-шкали для візуальної оцінки вмісту катехоламінів.

З урахуванням отриманих раніше результатів, при обробці іммобілізованої ГПК1 розчином адреналіну чи дофаміну на поверхні сорбенту утворюється «синя» форма згідно схеми:



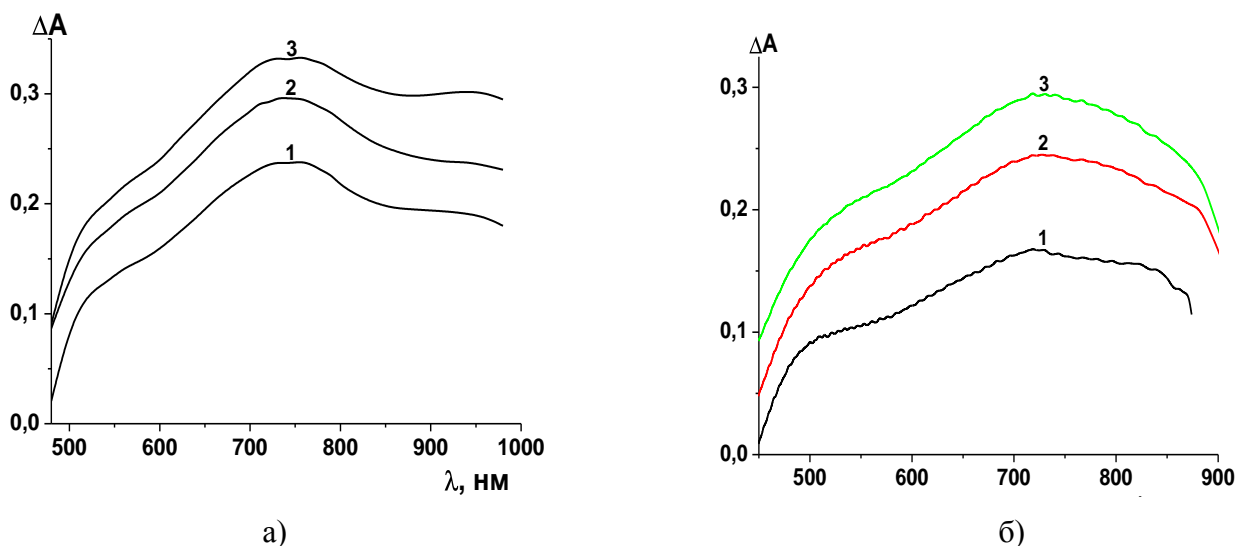


Рис. 4.13. Спектри поглинання іммобілізованої ГПК1 після обробки розчином а) дофаміну з концентрацією, мг/л: 9,5 (1); 19 (2) і 47,5 (3); б) адреналіну з концентрацією, мг/л: 8 (1); 33 (2) і 82 (3);  $V/m = 67$  мл/г,  $pH=10,6$ ,  $l=0,10$  см

На основі отриманих даних було побудовано градувальні залежності для адреналіну та дофаміну. Для цього до 0,15 г ТР на основі іммобілізованої ГПК1 додавали 8,0–9,7 мл боратного буферного розчину, 0,3–2,0 мл розчину дофаміну гідрохлориду, або 0,2–1,0 мл розчину адреналіну гідротартрату, доводили до загального об'єму 10,0 мл, перемішували впродовж 10 хв. Після цього сорбент відділяли декантацією, промивали дистильованою водою, додавали боратний буферний розчин та вимірювали оптичну густину суспензії у тонкому шарі.

Основні метрологічні характеристики методик ТСФ визначення адреналіну та дофаміну наведено у табл. 4.3. Межа виявлення, розрахована за  $3s$  критерієм, для адреналіну становить 1,7 мг/л, що у шість разів нижче, порівняно з дофаміном, що у свою чергу узгоджуються із їхніми окисно-відновними властивостями [207].

Параметри ГГ для ТСФ визначення катехоламінів,

$$\Delta A = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C, \text{ мг/л}$$

Речовина	$a \pm \Delta a$	$(b \pm \Delta b) \cdot 10^3$	$R^2$	МВ, мг/л	Діапазон лінійності, мг/л
Доф	$0,016 \pm 0,002$	$0,60 \pm 0,02$	0,992	10	15,0–92,0
Адр	$0,002 \pm 0,002$	$3,59 \pm 0,06$	0,999	1,7	4,6–92,0

#### 4.2.2. Дослідження впливу сторонніх іонів на визначення катехоламінів

Для розробки методик визначення катехоламінів у фармацевтичних препаратах та біологічних рідинах необхідно було дослідити вплив сторонніх іонів, які наявні у цих об'єктах. Так, у медикаментах для їх стабілізації використовують речовини-відновники, такі як сульфіти, метабісульфіти або аскорбінова кислота. У біологічних рідинах, зокрема сечі та сироватці крові, визначенню катехоламінів можуть заважати іони феруму, флуорид- та хлорид-іони. У сечі, при патологічних станах організму, можуть з'являтися оксалат та тартрат іони, які проявляють слабкі відновні властивості і можуть заважати визначенню катехоламінів (додаток В).

Вплив сторонніх іонів органічної та неорганічної природи на результати визначення катехоламінів вивчали на прикладі адреналіну. Для цього в 10 хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вводили по 2,0 мл розчину адреналіну (0,5 ммоль/л), аліквоту 0,5–1,05 мл розчину солі стороннього іону, вихідні концентрації яких були у межах 0,005 моль/л – 0,1 ммоль/л і залишали на 2-3 хв для встановлення рівноваги, потім додавали боратний буферний розчин з  $pH = 10,6$  до загального об'єму 10,0 мл. Наважку сорбенту 0,150 г перемішували з отриманим розчином впродовж 10 хв, після цього розчин декантували, сорбент промивали дистильованою водою, додавали буферний розчин та вимірювали світлопоглинання у тонкому шарі  $l=0,10$  см при  $\lambda = 750$  нм. Паралельно вимірювали поглинання «холостого» сорбенту, отриманого

обробкою сорбенту з іммобілізованою ГПК1 розчином, який містив всі компоненти крім адреналіну. Розраховували  $\Delta A = A_{750} - A'_{750}$ , де  $A_{750}$  – поглинання сорбенту при  $\lambda = 750$  нм обробленого розчином проби,  $A'_{750}$  – поглинання холостого сорбенту при  $\lambda = 750$  нм. Концентрацію адреналіну у розчині визначали за градувальним графіком (табл. 4.3). Допустимим вважали такий вміст стороннього іону, при якому відносна похибка не перевищувала 5%. Було встановлено, що визначенню адреналіну не заважають катіони лужних металів. Ферум (III) та Ферум (II) з концентраціями  $> 0,5$  ммоль/л та  $> 1,0$  ммоль/л, відповідно, у лужному середовищі утворюють осаді гідроксидів, які співосаджуються на поверхні сорбенту, підвищуючи «фоновий» сигнал. Однак при концентрації  $Fe^{3+} \leq 0,5$  ммоль/л та  $Fe^{2+} \leq 1$  ммоль/л вони не заважають визначенню катехоламінів у об'єктах, зокрема в сечі та фармпрепаратах, і не потребують попереднього маскування. Аскорбінова кислота, як дофамін і адреналін відновлюють ТР за умов протікання досліджуваної гетерофазної реакції. Більш слабкі органічні відновники, такі як кверцетин, а також тартрат і оксалат не відновлюють ГПК1 на поверхні сорбенту. Неорганічні відновники, зокрема сульфіти, сульфіді, хлориди та сполуки селену також не взаємодіють з іммобілізованою ГПК1. Коефіцієнти селективності наведено у табл. 4.4.

Таблиця 4.4

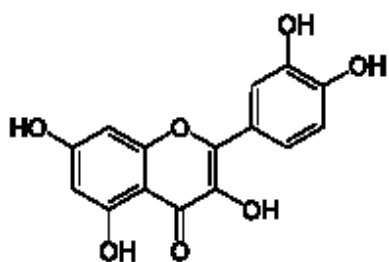
Допустимі кількості сторонніх іонів при визначенні 0,1 ммоль/л адреналіну

№ п/п	Стороння речовина	$C_{\max}$ , ммоль/л	Коефіцієнт селективності $C_{\text{стор.реч.}}/C_{\text{адреналіну}}$
1	$K^+, Na^+$	100	$1 \cdot 10^3$
2	$Fe^{2+}$	1	10
3	$Fe^{3+}, F^-$	0,5	5
4	$SO_3^{2-}, SeO_3^{2-}$	10	100
5	Борат	25	250
7	$Cl^-, S^{2-}$	10	100
8	Аск	0,007	0,07
9	Тартрат	10	100
10	Оксалат	0,5	5

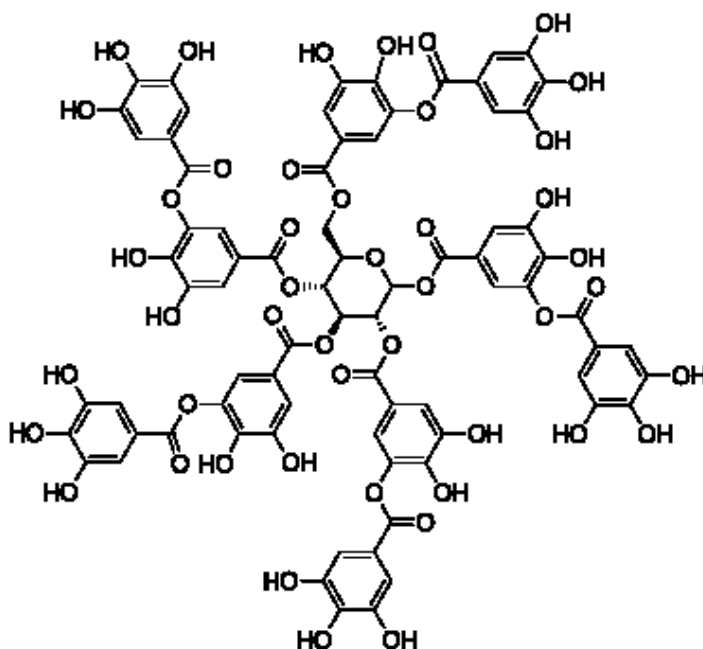
Таким чином, розроблений ГР на основі іммобілізованої окисненої ГПК1, за умови проведення гетерофазної реакції у лужному середовищі, є селективним відносно органічних відновників середньої сили, зокрема катехоламінів.

#### 4.3. Встановлення оптимальних умов взаємодії іммобілізованого реактиву Фоліна (ГПК2) з поліфенолами

Для визначення загального вмісту поліфенолів та оцінки АОА за окисно-відновним механізмом використовують різні стандарти, зокрема кверцетин, рутин, танін, аскорбінову та галову кислоти, тощо. У даній роботі як модельні сполуки для дослідження хіміко-аналітичних характеристик твердофазного редокс реагенту нами було обрано такі поліфеноли як кверцетин та танінову кислоту (танін), оскільки вони відповідають основним вимогам, які висуваються до речовин-стандартів [203], а саме: доступність препарату і наявність типових властивостей, характерних для досліджуваного об'єкту.



Кверцетин



Танінова кислота

Крім того, кверцетин належить до класу флавонолів, що мають в основі своєї будови – будову флавону. Танінова кислота належить до класу

гідролізованих танінів, основою якої є складні ефіри дигалової кислоти з багатоатомним спиртом. Оскільки обрані речовини-стандарти мають різну будову, а також різну кількість гідроксильних груп, можна припустити, що вони проявлятимуть різну антиоксидантну здатність.

Як було показано вище, іммобілізована ГПК1 через стабілізацію поверхнею не взаємодіє з поліфенолами. Та ж сама причина низьких окисних властивостей іммобілізованої ГПК2 у формі моношару. Втім, закріплена за рахунок полімолекулярних взаємодій ГПК2 («С»-ділянка ізотерми) зберігає свої властивості. Тому при розробці ТСФ методики було обрано сорбент з ємністю за ГПК2 200 мкмоль/л.

Іммобілізована на кремнеземі ГПК2 поглинає з максимумом при  $\lambda = 360$  нм (рис. 4.14, крива 1). Після обробки розчином відновника, максимум поглинання іммобілізованої ГПК2 зміщується у «синю» область (рис. 4.14, крива 2 і 3).

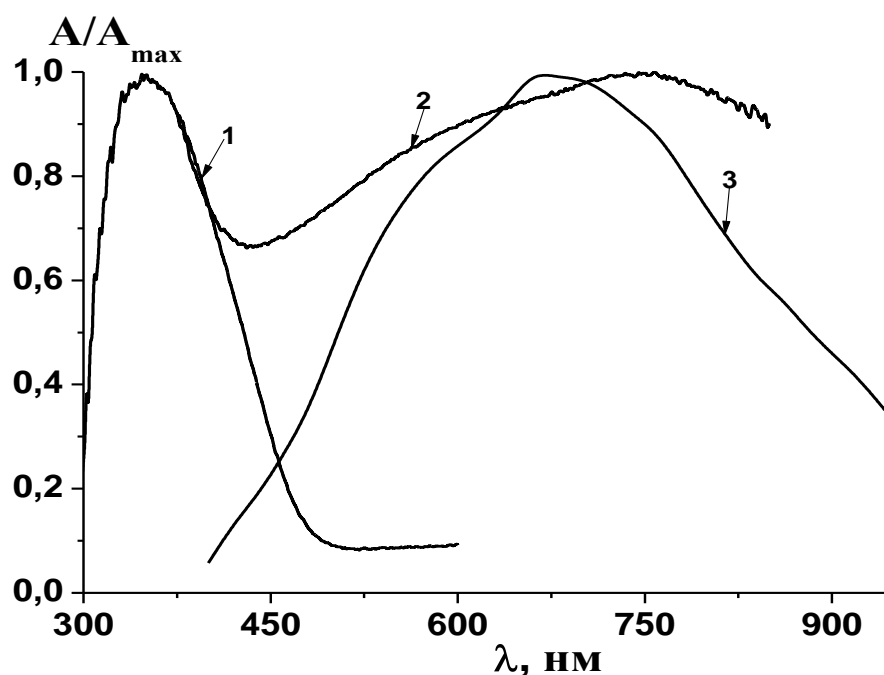


Рис.4.14. Нормовані спектри поглинання іммобілізованої ГПК2 до(1) та після обробки розчином таніну (2) і кверцетину (3).

З метою встановлення оптимальних умов взаємодії іммобілізованої ГПК2 з поліфенолами досліджено залежність аналітичного відгуку від кислотності середовища на прикладі кверцетину. Для цього готували серію розчинів кверцетину об'ємом 10,0 мл з концентрацією 0,1 ммоль/л і різними значеннями рН, додавали наважку сорбенту масою 0,075–0,100 г та перемішували впродовж 5 хв. Після цього сорбент відділяли декантацією, промивали його розчином з відповідним рН та вимірювали оптичну густину у тонкому шарі.

Відомо, що у розчині РФ взаємодіє із відновниками у лужному середовищі [110]. Дійсно, із підвищенням рН розчину аналітичний сигнал зростає. Але не зважаючи на закономірне збільшення аналітичного сигналу при підвищенні рН розчину, прямопропорційної залежності оптичної густини від кислотності середовища не спостерігалось. Проте, виявилось, що величина сигналу залежить від вмісту карбонату натрію в реакційній суміші (рис. 4.15).

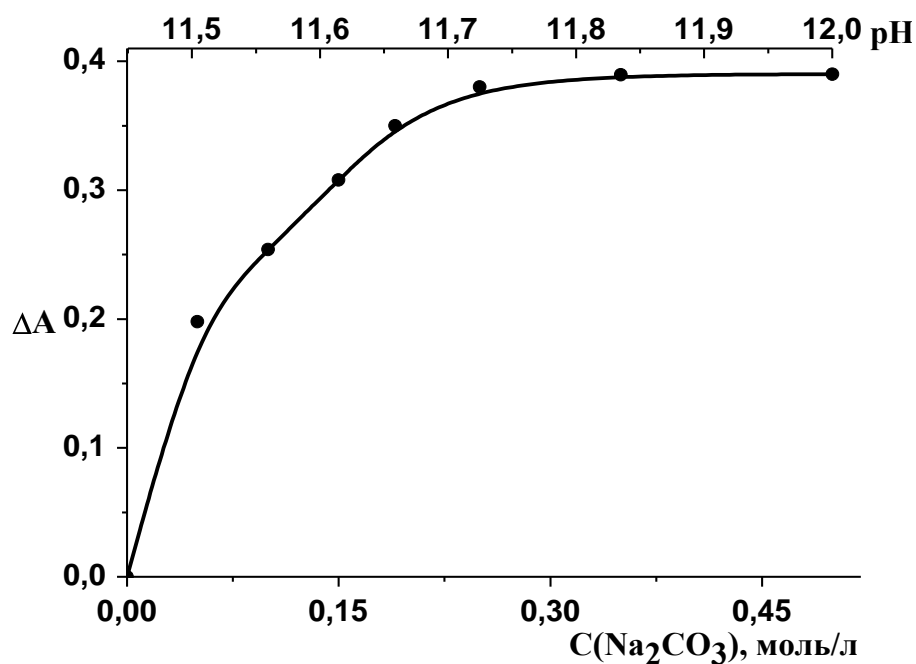


Рис.4.15. Аналітичний сигнал залежно від рН і концентрації розчину карбонату натрію.  $C_{\text{кверцетину}}=10$  ммоль/л;  $V/m=67$  мл/г;  $l=0,10$  см.

Як видно з рис. 4.15, поглинання ТР практично не змінюється при концентрації карбонату натрію  $\geq 0,35$  моль/л. Тому подальші експериментальні дослідження проводились саме при концентрації  $\text{Na}_2\text{CO}_3$

0,35 М. Стабільність сигналу навіть при концентрації карбонату 0,5 моль/л, що відповідає рН = 12, свідчить про мінімальну розчинність силікагелю у лужному середовищі, вірогідно, завдяки гідрофобізації поверхні адсорбованим ТДАН.

За оптимального значення рН розчину рівновага у гетерофазній реакції «розчин кверцетину – іммобілізована ГПК2» встановлюється впродовж 8–10 хв, тоді як танін реагує практично миттєво (рис. 4.16). Проте, взаємодія з таніном супроводжується швидкою зміною кольору сорбенту від жовтого до синього, а потім від синього до бурого. Окисно-відновна взаємодія супроводжується помітною десорбцією ГПК2 з поверхні. Цей факт можна пояснити дією таніну аналогічною до дії кисневмісних органічних екстрагентів. Для запобігання вимивання реагенту з поверхні сорбенту гетерофазну взаємодію таніну з іммобілізованою ГПК2 досліджували крапельним способом, який полягає у обробці наважки ТР 0,1 мл розчину таніну, висушуванні ТР при кімнатній температурі та наступному вимірюванні величини дифузного відбиття сорбенту.

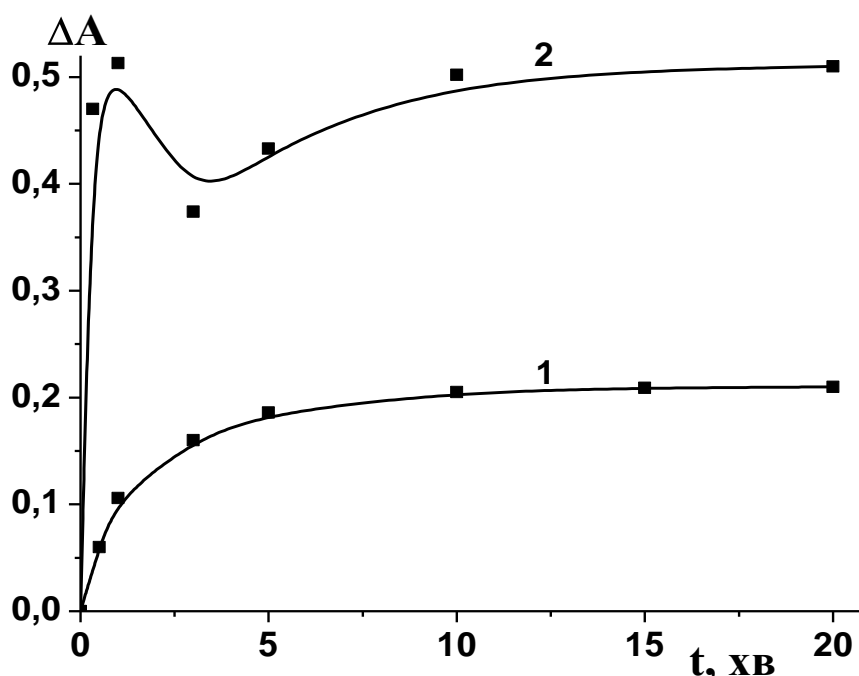


Рис.4.16. Аналітичний сигнал залежно від часу контакту фаз іммобілізованої ГПК2 з розчином: кверцетину (1), таніну (2).  $C_{\text{поліфенолу}}=0,1$  ммоль/л;  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3}=0,35$  моль/л;  $V/m = 67$  мл/г;  $l=0,10$  см

Дослідження оптимального співвідношення об'єму проби кверцетину до маси ТР показало, що максимальне значення аналітичного сигналу досягається при  $V/m \leq 50$  мл/г (рис. 4.17).

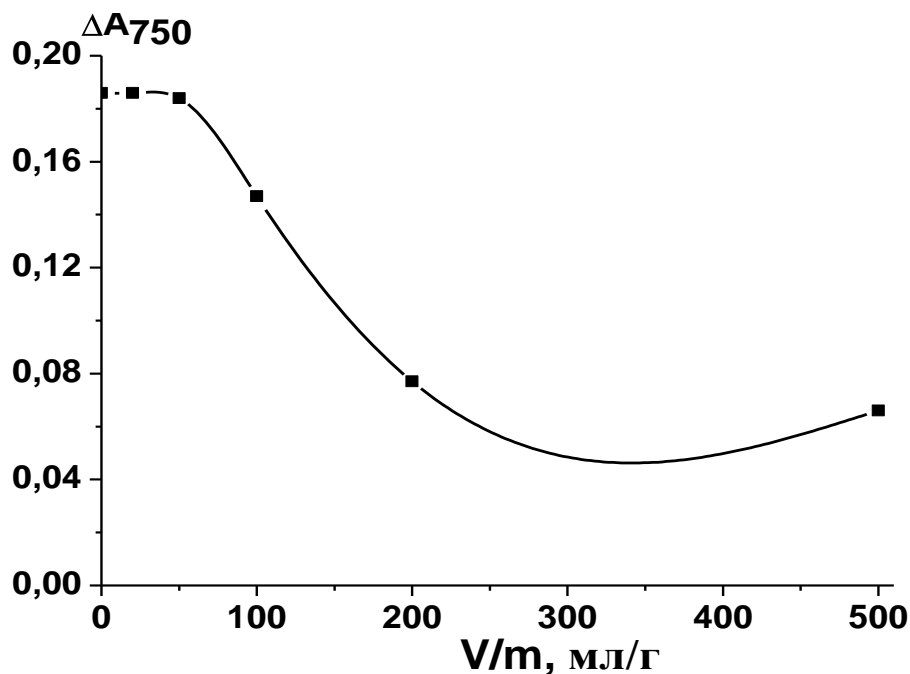


Рис.4.17. Аналітичний сигнал залежно від співвідношення об'єму проби до маси сорбенту. рН = 10,6;  $C_{\text{кверцетину}} = 0,04$  ммоль/л

Співпадіння спектрів поглинання окисненої ГПК2 у розчині та на поверхні сорбенту свідчить, що ГПК існує на поверхні в тій самій формі, що і в розчині (рис. 4.18, криві 1 і 2). Імобілізація ГПК2 у полімолекулярній формі не впливає на її спектральні характеристики. Свідченням утворення на поверхні ІА може бути незначний гіпсохромний зсув максимуму поглинання ГПК на сорбенті ( $\Delta\lambda=15$  нм). Перерозподіл інтенсивності смуг в спектрах поглинання окисненої ГПК в розчині та на поверхні можна пояснити як утворенням іонного асоціату, так і значною участю груп поверхні СГ у закріпленні ГПК2 на ТДАН–СГ за рахунок утворення водневих зв'язків між донорними атомами гетерополіаніону і ОН–групами поверхні [1А–3А].

Продукт відновлення ГПК2, після обробки розчином кверцетину чи таніну, також однаковий як на поверхні, так і у розчині (рис. 4.18, криві 3 і 4). Природа відновника дещо впливає на продукт реакції, про що свідчить

незначний зсув максимумів поглинання у спектрах іммобілізованої ГПК2 обробленої розчином кверцетину і таніну.

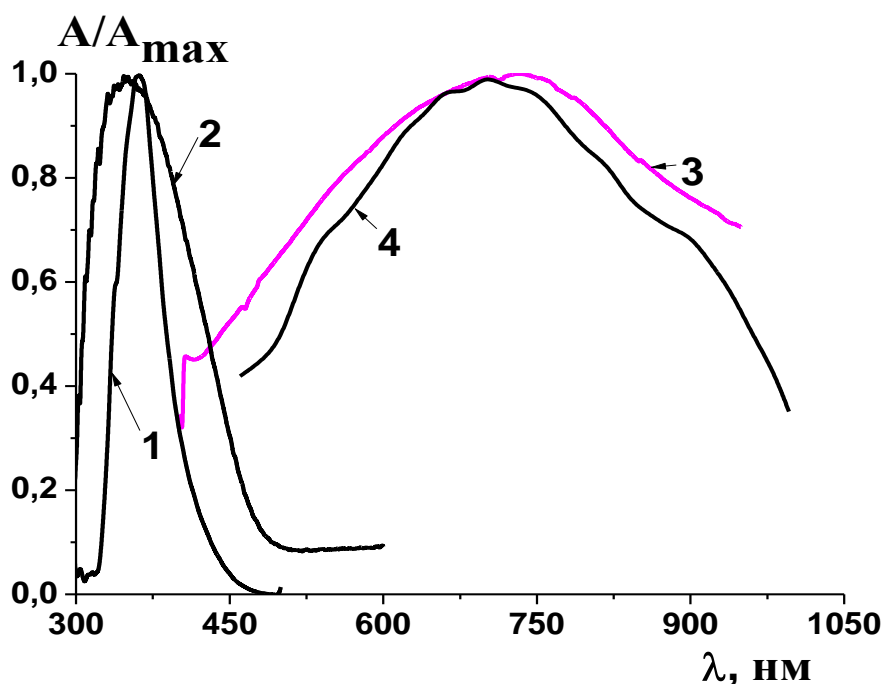
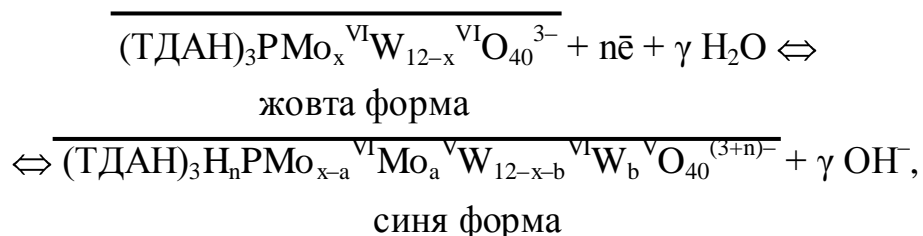


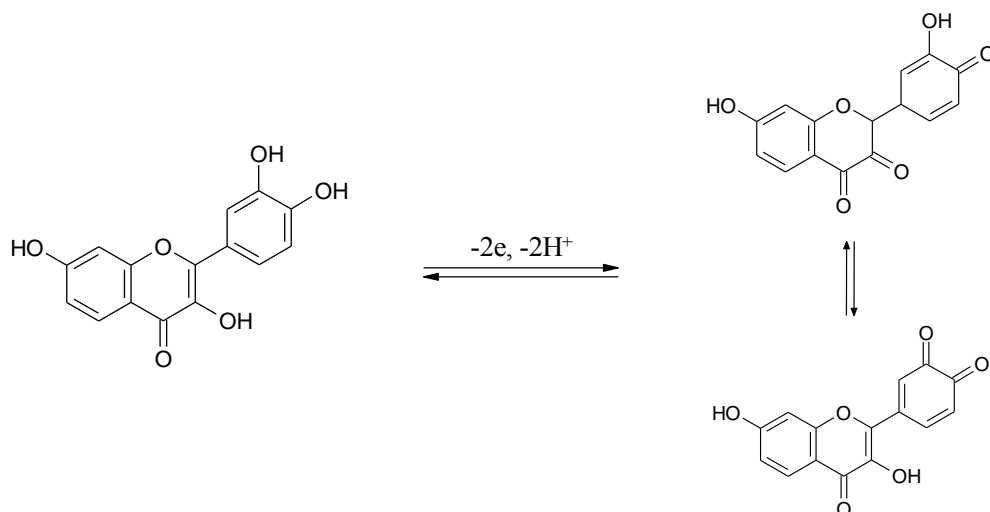
Рис.4.18. Нормовані спектри поглинання окисненої та відновленої ГПК2 у розчині (1, 3) та на поверхні сорбенту (2, 4);  $C_{Red} = 0,1$  ммоль/л,  $V/m = 50$  мл/г,  $pH = 11,5$

Отже, на основі отриманих результатів реакцію відновлення іммобілізованої ГПК2 розчином поліфенолу можна представити наступною схемою:

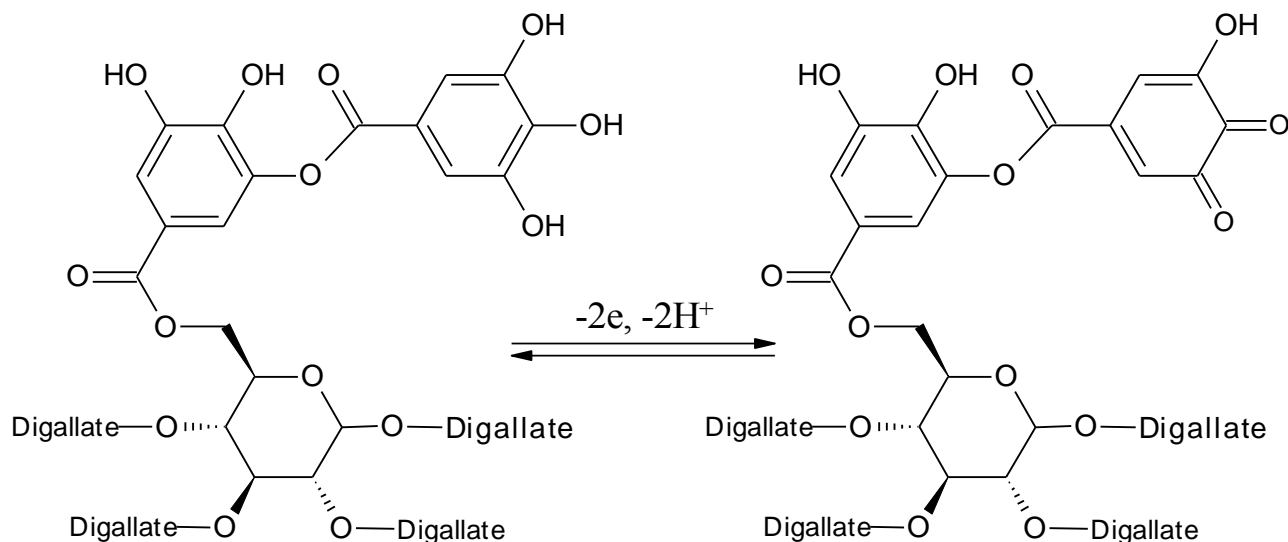


де  $n = 2-4$ ;  $x = 1-11$ ,  $a, b = 2-4$ .

ГПК2 відновлюється як закріплена у полімолекулярній формі, при цьому кверцетин окиснюється за схемою:



Окиснення таніну відбувається за більш складним, порівняно із кверцетином, механізмом, оскільки танінова кислота містить у своєму складі більшу кількість  $OH$ -груп, які можуть брати участь у окисно-відновній реакції. Схематично окиснення однієї ділянки молекули таніну може бути представлено наступним чином:



Світлопоглинання іммобілізованої ГПК2 зростає пропорційно збільшенню концентрації кверцетину (рис. 4.19) та таніну (рис. 4.20) у розчині, що покладено в основу розробки методики ТСФ визначення поліфенолів за відповідною речовиною-стандартом. Колір ТР при цьому

змінюється від жовтого до синього, що може бути використано для побудови кольорової тест-шкали для напівкількісного визначення вмісту поліфенолів.

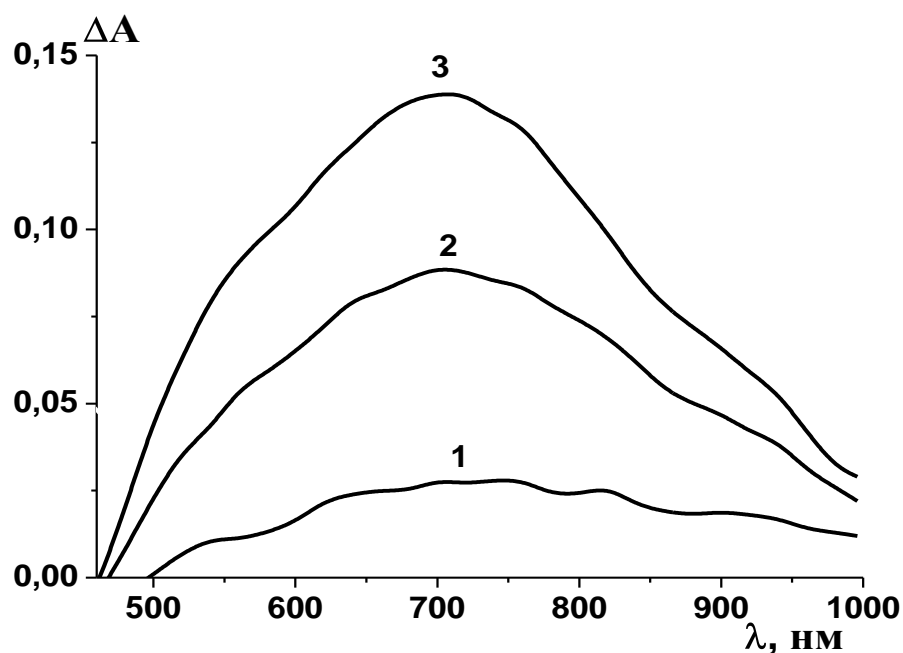


Рис.4.19. Спектри поглинання іммобілізованої ГПК2 після обробки розчином кверцетину різної концентрації.  $C_{\text{кверцетину}}$ , мг/л: 4,1 (1); 15,2 (2); 24,4 (3),  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0,35$  моль/л;  $V/m = 67$  мл/г;  $l=0,10$  см,  $\Delta A = A - A_{\text{хол}}$

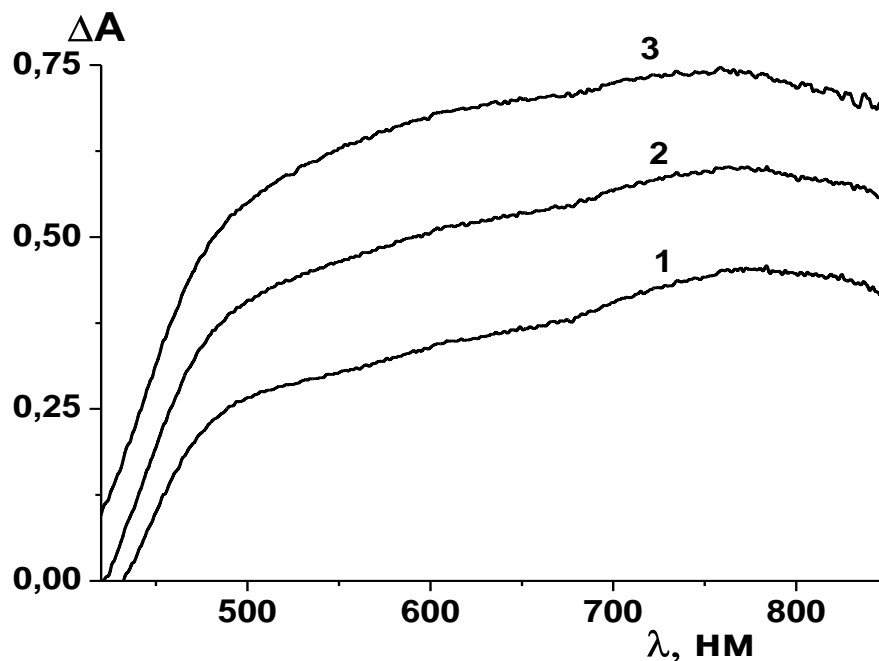


Рис.4.20. Спектри поглинання іммобілізованої ГПК2 після обробки розчином таніну різної концентрації.  $C_{\text{таніну}}$ , мг/л: 36,8 (1); 95,1 (2); 127,3 (3);  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0,35$  моль/л;  $m = 0,100$  г;  $l=0,1$  см

В табл. 4.5 наведено параметри градуювальних графіків для ТСФ визначення поліфенолів за відповідною речовиною-стандартом – кверцетин і танін.

Таблиця 4.5

Параметри ГГ для ТСФ визначення поліфенолів за стандартом кверцетином та таніном.  $\Delta A = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C_{\text{стандарту}}$ , мг/л

Речовина-стандарт	$a \pm \Delta a$	$(b \pm \Delta b) \cdot 10^3$	$R^2$	МВ, мг/л	Діапазон лінійності, мг/л
Кверцетин	$0,048 \pm 0,002$	$5,4 \pm 0,1$	0,999	1	3–30
Танін	$0,047 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,2$	0,992	14	25–230

Широкий діапазон лінійності та низька межа виявлення свідчить про перспективність застосування розробленого ТР на основі іммобілізованої ГПК2 для ТСФ визначення поліфенолів у природних об'єктах. А контрастний перехід кольору сорбенту від жовтого до синього може бути використаний для візуальної тест-оцінки вмісту поліфенольних сполук у різноманітних об'єктах.

#### 4.3.1. Дослідження впливу сторонніх іонів на результати визначення поліфенолів

Для розробки методик визначення поліфенолів у фітопрепаратах та в об'єктах природного походження необхідно було дослідити вплив сторонніх іонів, які наявні у цих об'єктах. У фітопрепаратах, соках та винах, крім поліфенолів можуть міститися такі відновники, як аскорбінова кислота, глюкоза, тартрат- та цитрат-іони. Визначенню поліфенолів також можуть заважати іони металів, які присутні у фруктових соках, а також неорганічні окисники, зокрема нітрати, що використовуються в процесі вирощування та зберігання фруктів.

Вплив сторонніх речовин на визначення поліфенолів вивчали на прикладі визначення таніну. Для цього у 8 хімічних стаканів ємністю 25,0 мл вводили по 1,0 мл розчину таніну (0,38 ммоль/л), 2,50 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,

розчин сторонньої речовини із концентрацією в межах 0,075–2,5 ммоль/л (табл. 4.6) та дистильовану воду до загального об'єму 5,0 мл. Сорбент масою 0,10 г обробляли 0,1 мл отриманого розчину, висушували на повітрі при кімнатній температурі та вимірювали світлопоглинання у тонкому шарі  $l=0,10$  см при 750 нм. Концентрацію поліфенолу у розчині визначали за градувальним графіком (табл. 4.5). Допустимим вважали такий вміст стороннього іону, при якому відносна похибка не перевищувала 5%. Коефіцієнти селективності сторонніх речовин відносно таніну наведено у табл. 4.6.

Лужні метали не заважають визначенню поліфенолів. Катіони Cu (II) при значних концентраціях зв'язують танін утворюючи осад, що значно зменшує аналітичний сигнал. Втім, п'ятикратні кількості Cu (II) змінюють оптичну густину лише на 5%, що дає можливість визначати поліфеноли у природніх об'єктах, зокрема соках, без попереднього маскування купруму. Те ж саме стосується і Fe(III), що при високій концентрації у лужному розчині утворює осад, внаслідок гідролізу, підвищуючи «фоновий» сигнал матриці. Катіони кальцію також утворюють осад, зв'язуючись з карбонат-іонами, що присутні у реакційній суміші в значному надлишку, але на відміну від Cu (II) та Fe (III) не впливають на окисно-відновні властивості поліфенолів.

Таблиця 4.6

Допустимі концентрації ( $C_{\max}$ ) сторонніх речовин при визначенні 0,075 ммоль/л таніну

№ п/п	Стороння речовина	$C_{\max}$ , ммоль/л	Коефіцієнт селективності $C_{\text{стор.реч.}}/C_{\text{таніну}}$
1	$K^+, Na^+, CO_3^{2-}$	350	$5 \cdot 10^3$
2	$Ca^{2+}$	7,5	100
3	$Fe^{3+}$	0,06	0,8
4	$Cu^{2+}$	0,38	5
6	Cl <sup>-</sup>	7,2	96
7	$NO_3^-$	7,7	106
8	Цитрат, Тартрат	0,76	10
9	Аскорбінова кислота	0,17	2
11	Глюкоза	7,3	97
12	Кофеїн	–	Не заважає

Отже, розроблений ТР на основі іммобілізованої ГПК2 є вибіркоким щодо органічних відновників поліфенольної природи.

#### **4.4. Розробка кольорових шкали для візуального тест-визначення катехоламінів та поліфенолів.**

Вже було показано, що взаємодія органічних відновників з розробленим ТР супроводжується контрастним переходом кольору сорбенту від жовтого до синього, що покладено в основу розробки кольорової шкали для візуальної тест-оцінки вмісту аналіту.

Для обґрунтування діапазонів лінійності шкал і врахування суб'єктивного фактора при атестації тест-методик у лабораторних умовах застосували метод кольориметрії [171]. Координати кольору розраховували методом вибраних ординат. Координати світла розраховували відносно стандартного джерела А за спектрами поглинання ТР. Як аналітичні відгуки використовували кольориметричні функції: кольорову відмінність за світлотою  $\Delta L$ , насиченістю  $\Delta S$ , тону  $\Delta T$  та загальну кольорову відмінність  $\Delta E$ . З рисунків 4.21 та 4.22 видно, що серед перерахованих кольориметричних функцій найбільша чутливість спостерігається при використанні  $\Delta E$ . Тому для кольориметричного тест-визначення органічних відновників використовували залежність „Загальна кольорова відмінність  $\Delta E$  – концентрація відновника”.

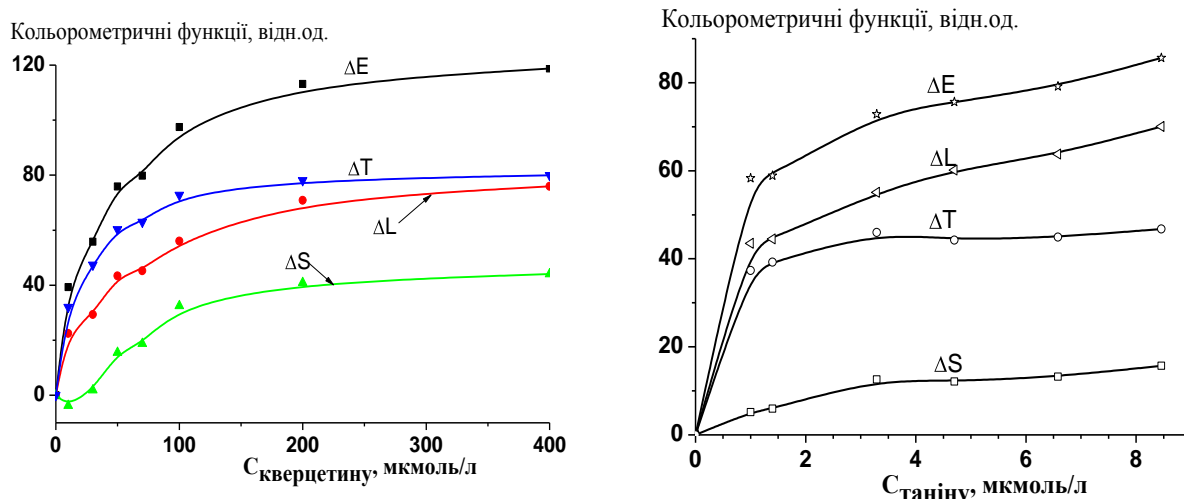
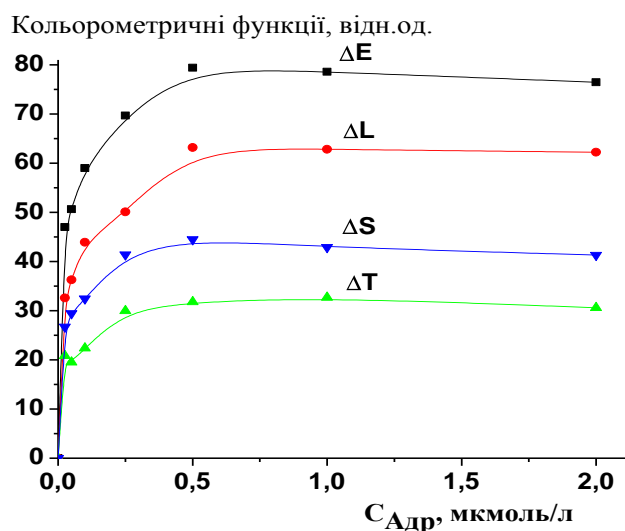


Рис. 4.21. Залежність кольориметричних функцій від концентрації кверцетину (а) та таніну (б) у розчині.  $C_{\text{Na}_2\text{CO}_3} = 0,35$  моль/л;  $V/m = 67$  мл/г (а);  $m = 0,100$  г (б)



4.22. Залежність кольориметричних функцій від концентрації адреналіну у розчині.  $\text{pH} = 10,6$ ;  $V/m = 67$  мл/г

На основі отриманих результатів розроблені стандартні кольорові шкали для візуального тест-визначення вмісту катехоламінів та поліфенолів (додаток Г). При цьому крок шкали обирали таким чином, щоб ΔE сусідніх точок відрізнялись на 10 відносних одиниць. За таких умов око найліпше фіксує відмінність кольорів.

Для визначення катехоламінів як речовину стандарт використовували адреналін. Для визначення поліфенолів шкалу готували за двома стандартами – таніном та кверцетином.

***Побудова кольорової тест-шкали для визначення поліфенолів (речовина стандарт – кверцетин).***

У хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять таку аліквотну частину стандартного розчину кверцетину з концентрацією 60,40 мг/л, щоб його концентрація в кінцевому об'ємі становила (мг/л): 0; 1; 3; 5; 7; 10; 13; 22; 27; 36; додають 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл; перемішують магнітною мішалкою з 0,075 г ТР протягом 10 хв. Сорбент відокремлюють декантацією та послідовно промивають трьома порціями дистильованої води. Отриману кольорову тест-шкалу фотографують та будують комп'ютерну модель отриманої кольорової шкали.

***Побудова кольорової тест-шкали для визначення поліфенолів (речовина стандарт – танін).***

У хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять таку аліквотну частину стандартного розчину таніну з концентрацією 0,64 мг/л, щоб його концентрація в кінцевому об'ємі становила (мг/л): 0; 5; 14; 19; 26; 39; 80; 130; 179; додають 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. Реакційну суміш 0,1 мл наносять на 0,100 г ТР та висушують на повітрі при кімнатній температурі. Будують комп'ютерну модель отриманої кольорової шкали.

***Побудова кольорової тест-шкали для визначення катехоламінів (речовина стандарт – адреналін).***

У хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять таку аліквотну частину стандартного розчину адреналіну гідротартрату з концентрацією 1,82 мг/мл, щоб його концентрація у кінцевому об'ємі становила (мг/л): 0; 3; 6; 8; 9; 10; 18; 34; боратний буферний розчин з  $\text{pH} = 10,6$  до загального об'єму 10,0 мл, вносять наважку 0,150 г ТР та перемішують магнітною мішалкою впродовж 10 хв. Сорбент відокремлюють декантацією і послідовно промивають трьома порціями дистильованої води. Отриману кольорову тест-шкалу фотографують та будують комп'ютерну модель отриманої кольорової шкали..

#### 4.5. Висновки до розділу 4

Імобілізація ГПК сприяє зміні окисно-відновних властивостей. У розчині окисно-відновний потенціал ГПК1 вищий порівняно із ГПК2. Після іммобілізації через стабілізацію поверхнею ГПК1 втрачає частково окиснювальні властивості і навіть у лужному середовищі взаємодіє лише із відновниками середньої сили, зокрема аскорбіною кислотою і катехоламінами, і не реагує з поліфенолами. Дофамін та адреналін реагують із іммобілізованою ГПК1 практично однаково. Аналітичний сигнал змінюється пропорційно вмісту адреналіну (дофаміну) у розчині, що було використано для розробки методики твердофазно-спектрофотометричного і кольориметричного визначення катехоламінів з МВ 1,7 та 10 мг/л, відповідно. Колір сорбенту при цьому змінюється від жовтого до синього, що дозволило розробити кольорову шкалу та методику візуального тест-визначення катехоламінів з  $C_{\max} = 34$  мг/л адреналіну. Імобілізована ГПК 1 не взаємодіє з неорганічними відновниками, отже, може бути застосована для визначення органічних відновників середньої сили.

Імобілізована за полімолекулярним механізмом ГПК2 зберігає окисні властивості і взаємодіє з відновниками, такими як поліфеноли. Розроблено методики ТСФ і кольориметричного визначення вмісту поліфенолів за двома стандартами – кверцетином і таніном. Межі виявлення, розраховані за  $3s$ -критерієм, становлять  $1,0$  мг<sub>кверцетину</sub>/л та  $14$  мг<sub>таніну</sub>/л. Контрастну зміну кольору сорбенту було використано для розробки кольорових тест-шкал для виявлення і напівкількісного визначення поліфенолів. Кольоровий перехід тест-шкали за кверцетином відбувається від жовтого через зелений до синього, тоді як кольоровий перехід тест-шкали за таніном відбувається від жовтого до відтінків синього.

## **РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ РОЗРОБЛЕНОГО ТР НА ОСНОВІ ІММОБІЛІЗОВАНОЇ НА КРЕМНЕЗЕМІ ОКИСНЕНОЇ МОЛБДОСТИБІЄВОФОСФАТНОЇ ГПК ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ КАТЕХОЛАМІНІВ**

Катехоламіни – гормони мозкового шару наднирників, що забезпечують мобілізуючу дію на енергетичні резерви нервових клітин, активізують окисно-відновні процеси в організмі, беруть участь у процесах розщеплення вуглеводів, жирів та амінокислот.

Ці гормони підвищують активність ендокринних залоз, чутливість клітинних мембран до статевих гормонів і соматотропіну, підсилюють білковий синтез зарахунок підвищення чутливості клітин до анаболічних факторів. Вони стимулюють гіпоталамус і гіпофіз, збільшують нервово-м'язову провідність, швидкість реакції і мислення. Виробляє катехоламіни (дофамін, норадреналін, адреналін) мозковий шар наднирників. У наднирниках і плазмі крові вміст адреналіну у 3–10 разів більший, ніж норадреналіну. Адреналін підвищує артеріальний тиск, звужує периферичні судини, прискорює ритм серцевих скорочень, уповільнює моторику кишківника, підвищує концентрацію глюкози у крові, підсилює надходження в кровотік жирних кислот, підвищує рівень холестерину, впливає на клітини імунної системи. У здорових людей підвищення рівня адреналіну в крові відбувається при емоційному стресі, фізичних навантаженнях. Значне збільшення концентрації адреналіну в крові та сечі відзначається при феохромоцитомі – гормонально активній пухлині мозкового шару надниркових залоз, а зниження концентрації – при ураженні гіпоталамусу, міастенії, синдромі Іценко–Кушинга. Із діагностичною метою визначають як концентрацію самого адреналіну, так і продуктів його перетворення. Стійке підвищення рівня цих речовин спостерігається при феохромоцитомі, нейробластомі (злоякісній пухлині симпатичної частини нервової системи). Норадреналін діє на обмін речовин аналогічно адреналіну, але менш виражено, не впливаючи на частоту серцевих скорочень, рівень глюкози і

споживання кисню. Нормальний діапазон концентрацій катехоламінів у крові та сечі людини, згідно [204, 205], наведено у таблиці 5.1. Збільшення екскреції одного або двох катехоламінів більш ніж на 30% у порівнянні з верхньою межею норми свідчить про наявність феохромоцитом. При цьому захворюванні концентрація катехоламінів може підвищуватися у 10 і більше разів. Отже, визначення концентрації катехоламінів має діагностичне значення.

Таблиця 5.1

Добовий вміст катехоламінів у біологічних рідинах здорової людини

Катехоламін	Вміст у сечі		Вміст у сироватці крові, мкг/л
	нмоль/добу	мкг/добу	
Адреналін	30–80	5,5–14,6	≤ 88,0
Норадреналін	20–240	3,4–40,6	104,0–548,0
Дофамін	121,4–2425	18,6–371,0	≤ 136,0
L–Дофа	497,0±36,9	97,9±7,3	–
Загальний вміст	631,5–3278,9	117,4–531,4	104,0–772,0

Завдяки своїй судино звужуючій дії, катехоламіни застосовуються у препаратах для місцевих анестезій. Додавання до розчинів місцевих анестетиків судинозвужуючих засобів (адреналіну, норадреналіну, вазопресину тощо) призводить до уповільнення всмоктування анестетику із місця введення, дія його підсилюється, а системна токсичність при цьому знижується. Для місцевої анестезії використовують новокаїн, тримекаїн, лідокаїн, мепівакаїн, прилокаїн, бупівакаїн, етідокаїн, артикаїн. Протипоказанням до використання цих анестетиків вважається підвищена чутливість до основної діючої речовини, адреналіну, сульфатів і інших компонентів препарату. При цьому можуть проявлятися побічні ефекти, такі як: тахіаритмія, пароксизмальна тахікардія, вузькокутова форма глаукоми, бронхіальна астма з підвищеною чутливістю до сульфатів, а також алергічні реакції, набряк і запалення у місці введення, помірно виражені порушення гемодинаміки і серцевого ритму. При передозуванні фаза стимуляції ЦНС змінюється фазою пригнічення, спостерігається порушення свідомості,

пригнічення дихання (навіть до його зупинки), тремтіння м'язів, судоми, нудота, помутніння в очах. При випадковому внутрішньосудинному введенні, особливо препаратів, що містять адреналін, можлива ішемія зони введення, прогресуюча іноді до некрозу тканини.

Застосування місцевих анестезій у поєднанні з катехоламінами дозволяє звести до мінімуму токсикологічну дію анестетику, однак катехоламіни також впливають на загальний стан організму, тому їхнє застосування у препаратах для місцевих анестезій обмежується. Не рекомендується їх застосування в наступних випадках: людям з серцево-судинною та ендокринною патологіями; людям, які застосовують трициклічні антидепресанти, гормони щитовидної залози, засоби, що блокують  $\beta$ -адренорецептори. У осіб із супутньою патологією (серцево-судинною, ендокринною тощо) катехоламіни використовують після премедикації з дотриманням всіх запобіжних заходів проти внутрішньосудинного введення і в мінімальних концентраціях (1:200000). Побічні ефекти катехоламінів посилюються у тих випадках, коли препарат швидко потрапляє у кров'яне русло. Внутрішньосудинна ін'єкція 15–20 мкг адреналіну збільшує частоту серцевих скорочень до 90–120 ударів за хвилину. У зв'язку з цим при лікуванні хворих з відносними протипоказаннями до застосування катехоламінів необхідно обов'язкове проведення аспіраційної проби, але і вона, на жаль, не є стовідсотково надійним тестом, тому розчини місцевих анестетиків рекомендується вводити повільно. Майже всі побічні ефекти пов'язані з дозуванням катехоламінів. Підвищення їх дози або внутрішньосудинне введення препарату може спричинити прояв таких токсичних ефектів, як тахікардія, гіпертензії, серцебиття, судоми, головний біль, тремор та ін. Робота з місцевоанестезуючими розчинами, виготовленими в аптеках, може супроводжуватися помилками в дозуваннях катехоламінів, який додається в анестетик безпосередньо перед введенням у тканини. При використанні офіційних розчинів анестетиків (у капсулах, ампулах), виготовлених у заводських умовах без порушення технології, виникнення побічних ефектів та

ускладнень зустрічається значно рідше, однак контроль катехоламінів в таких препаратах залишається актуальною задачею аналізу.

### **5.1. Визначення вмісту катехоламінів у фармацевтичних препаратах ТСФ і візуальним тест-методом [5А, 9А, 14А, 16А]**

*Пробопідготовка препаратів.* Серед різноманіття препаратів місцевих анестезій останнім часом широко застосовуються препарати, які містять у своєму складі артикаїн, який проявляє високу анестезуючу дію та практично не викликає алергічних реакцій, у поєднанні з адреналіном. За хімічною структурою більшість анестетиків, що застосовуються на сьогодні, є амідами і слабкими основами, які погано розчиняються у воді, тому для введення в тканини використовують їх солі. У лужному середовищі артикаїн переходить у молекулярну форму та утворює у розчині емульсію. Нерозчинна сполука після контакту з сорбентом підвищує «фоновий» сигнал при вимірюванні оптичної густини, та впливає на правильність ТСФ визначення адреналіну у препараті.

Для усунення заважаючого впливу основного компоненту препарату використали два підходи. Перший з них базується на використанні гідрофобного сорбенту Inerton AW, який вилучає молекулярну форму артикаїну з розчину препарату. З метою вибору оптимальних умов вилучення основного компоненту було досліджено залежність аналітичного сигналу від співвідношення об'єму проби адреналіну до маси сорбенту Inerton AW. Для цього у стакани ємністю 25,0 мл вносили розчин препарату (1,7–2,0 мл), 2,0 мл боратного буферного розчину з рН = 10,6, додавали 0,050–0,150 г сорбенту Inerton AW та перемішували впродовж 5 хв. Після перемішування розчин декантували, центрифугували впродовж 2–3 хв, додавали 0,150 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Потім сорбент промивали дистильованою водою, додавали буферний розчин та вимірювали оптичну густину суспензії у тонкому шарі при 730 та 996 нм. Розраховували  $\Delta A = A_{730} - A_{996}$  і визначали

концентрацію адреналіну за ГГ, наведеним в табл. 4.3. Результати наведено в табл. 5.2 та на рис.5.1.

Таблиця 5.2.

Результати визначення оптимальної наважки Inerton AW для повного вилучення артикаїну з препарату, що містить 6,2 мг/л адреналіну.

№ п/п	$m_{\text{сорбенту}}, \text{Г}$	$V/m, \text{мл/г}$	Знайдено $C_{\text{Адр}}, \text{мг/л}$
1	0,05	100	2,2
2	0,075	67	3,2
3	0,100	50	6,0
4	0,115	43,5	5,8
5	0,125	40	4,9
6	0,150	33	2,1

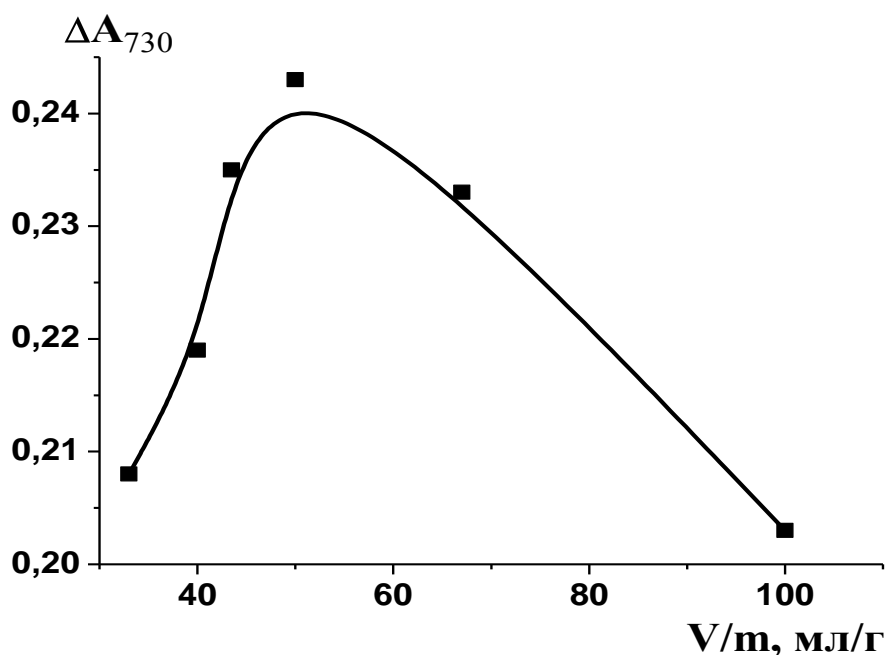


Рис. 5.1. Залежність аналітичного сигналу ТР після обробки розчином адреналіну від співвідношення об'єму розчину до маси гідрофобного сорбенту. рН = 10,6;  $C_{\text{Адр}} = 6,2 \text{ мг/л}$ ;  $t = 5 \text{ хв}$

З рис. 5.1 видно, що при співвідношенні  $V/m = 50 \text{ мл/г}$  (що відповідає 0,100 г сорбенту) відокремлення артикаїну є практично кількісним, а відносна похибка визначення адреналіну за умов такої пробопідготовки не перевищує

3%. При збільшенні маси сорбенту Inerton AW вірогідно разом із артикаїном частково співосаджується і адреналін. Цим пояснюється спадаюча ділянка на рис. 5.1.

Другий спосіб усунення заважаючого впливу базувався на вилученні самого адреналіну. З літератури відомо [206], що катехоламіни у слабколужному середовищі (рН 8,0–8,5) мають здатність адсорбуватися на оксиді алюмінію. Тому для відокремлення адреналіну із розчину препарату для місцевої анестезії використовували  $Al_2O_3$  (для хроматографії) з наступним елююванням оцтовою кислотою.

*Методика ТСФ визначення адреналіну у фармпрепараті з відокремленням основного компоненту препарату.* Вилучення основного компоненту препарату проводили у статичному режимі. У стакан ємністю 25,0 мл вносили розчин препарату (1,7–2,0 мл) та 3,0 мл боратного буферного розчину з рН=10,6. Додавали 0,100 г сорбенту Inerton для вилучення артикаїну, бупівакаїн тощо. Розчин декантували, додавали 0,150 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Потім сорбент промивали дистильованою водою, додавали боратний буферний розчин та вимірювали оптичну густину суспензії у тонкому шарі при 730 та 996 нм. Розраховували  $\Delta A = A_{730} - A_{996}$  і визначали концентрацію адреналіну за ГГ, наведеним в табл. 4.3.

*Методика ТСФ визначення адреналіну у фармпрепараті з попереднім його вилученням.* Вилучення адреналіну проводили у динамічному режимі. Препарат для місцевої анестезії, що містить адреналін (1,7–5,0 мл) пропускали крізь колонку заповнену 0,400 г  $Al_2O_3$  зі швидкістю 0,5 мл/хв. Після пропускання препарату, колонку тричі промивали дистильованою водою та елюювали катехоламіни 4,0 мл 0,25 М розчину оцтової кислоти. В стакан ємністю 25,0 мл вносили аліквоту 1 мл отриманого елюату, 2,0 мл боратного буферного розчину з рН = 10,6, 0,150 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Сорбент промивали дистильованою водою, додавали відповідний буферний розчин та вимірювали оптичну густину в тонкому шарі при 730 та 996 нм.

Розраховували  $\Delta A = A_{730} - A_{996}$  і визначали концентрацію адреналіну за ГГ, наведеним в табл. 4.3.

*Методика візуального тест-визначення катехоламінів.* У стакан ємністю 25,0 мл вносили розчин препарату (1,7–2,0 мл) та 2,0 мл боратного буферного розчину з рН = 10,6, додавали 0,150 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Сорбент промивали дистильованою водою, та за кольоровою шкалою визначали вміст аналіту у пробі. Визначення тест-методом проводили з попередньою пробопідготовкою та без неї.

Результати визначення вмісту адреналіну у фармацевтичних препаратах для місцевих анестезій наведено у табл. 5.3.

Таблиця 5.3.

Результати визначення адреналіну у фармацевтичних препаратах за розробленими ТСФ (І) та ВТ (ІІ) методиками з попередньою пробопідготовкою із застосуванням  $Al_2O_3$  (а), Inerton AW (б) та без пробопідготовки (в) ( $P = 0,95$ ,  $n = 3-5$ )

Препарат	Вміст адреналіну, мг/л					
	Заявлено	Знайдено (Sr)				
		І			ІІ	
		а	б	в	а	в
Ультракаїн Д–С (ампули 2,0 мл)	6,0	5,8±0,8 (0,05)	6,1±0,9 (0,06)	6±3 (0,20)	8±2 (0,17)	9±1 (0,12)
Ультракаїн– Форте	12,0	12±1 (0,03)	Не визначали	6±3 (0,20)	15±2 (0,11)	16±2 (0,10)
Бупівакаїн	5,0	4,8±0,8 (0,07)	5±1 (0,08)	Не визначали	6±3 (0,40)	7±1 (0,12)
Артіфрін	6,0	6,7±0,7 (0,04)	6±1 (0,07)	7±2 (0,1)	7±1 (0,12)	6,8±0,8 (0,09)

Видно, що в обох випадках, як при відділенні основного компоненту, так і при вилученні адреналіну, отримані результати характеризуються задовільними правильністю та повторюваністю. Візуальне тест-визначення не вимагає попередньої пробопідготовки, очевидно, завдяки тому, що гідрофобний розчин основної речовини не впливає на забарвлення сорбенту.

Отже ВТ метод може бути запропонований для експрес оцінки вмісту катехоламінів у фармацевтичних препаратах вказаного типу. Час аналізу становить 15 хв.

## **5.2 Визначення вмісту катехоламінів у біологічних рідинах ТСФ і візуальним тест-методом**

*Пробопідготовка сечі та сироватки крові.* В клінічному аналізі для визначення катехоламінів їх попередньо вилучають з біологічних рідин адсорбцією на  $Al_2O_3$ , з метою усунення впливу інших компонентів сечі та крові, які також можуть проявляти окисно-відновні властивості. Після сорбції на  $Al_2O_3$  або  $Al(OH)_3$  катехоламіни елюють кислотою (сульфатною, хлороводневою або оцтовою).

Адсорбційне вилучення катехоламінів із біологічних рідин здійснювали згідно методики [206] із застосуванням оксиду алюмінію, який було попередньо активовано хлороводневою кислотою (по Брокману). Для цього 5,0 г  $Al_2O_3$  кип'ятили при перемішуванні з 25,0 мл 2 М НСІ впродовж 30–40 хв. Після кип'ятіння та седиментації осаду розчин НСІ декантували, осад промивали 25,0 мл 2,0 М НСІ, а потім у воронці Бюхнера – дистильованою водою до рН 6,0. Отриманий таким чином  $Al_2O_3$  висушували у сушильній шафі впродовж 3–4 год при температурі 100–200 °С.

Пробопідготовку біологічних рідин здійснювали у такий спосіб: у стакан ємністю 50,0 мл вводили 10,0 або 25,0 мл сечі, додавали 0,2–0,5 мг ЕДТА, перемішували до повного розчинення та фільтрували. До отриманого фільтрату додавали декілька краплин 1М NaOH до рН = 8,0–8,5. За таких умов катехоламіни адсорбуються  $Al_2O_3$  практично повністю [48]. Через колонку заповнену 1,0 г активованого  $Al_2O_3$  пропускали отриманий фільтрат впродовж 15–20 хв. Після цього колонку тричі промивали дистильованою водою та проводили елювання аналітів 4,0 мл або 10,0 мл 0,25 М оцтової кислоти, відповідно до об'єму сечі, зі швидкістю 0,5 мл/хв.

Зразок сироватки крові об'ємом 2,5 мл пропускали крізь колонку із 0,40 г  $Al_2O_3$  впродовж 5 хв. Колонку промивали дистильованою водою та проводили елюювання 2,5 мл 0,25 М оцтової кислоти зі швидкістю 0,5 мл/хв. Отримані елюювати містили адреналін, норадреналін, дофамін та частково L-Дофа. Їх використовували для твердофазно-спектрофотометричного та візуального тест–визначення катехоламінів.

**Методика ТСФ та ВТ визначення катехоламінів у біологічних рідинах (сеча, сироватка крові).** В стакан ємністю 25,0 мл вносили аліквоту елюату (0,24–2,0 мл), 2,0–3,0 мл боратного буферного розчину з рН = 10,6, 0,15 г ТР та перемішували впродовж 10 хв. Сорбент промивали дистильованою водою, додавали буферний розчин та вимірювали оптичну густину суспензії у тонкому шарі при 730 та 996 нм. Розраховували  $\Delta A = A_{730} - A_{996}$  і визначали концентрацію адреналіну за ГГ, наведеним в табл. 4.3. Колір сорбенту після обробки розчином проби порівнювали із кольоровою тест–шкалою.

Для врахування впливу матриці визначення катехоламінів проводили методом добавок. Аналітичний сигнал зростає пропорційно збільшенню концентрації добавки адреналіну у зразках. Рівняння отриманих ГГ наведено в табл. 5.4.

Таблиця 5.4

Параметри ГГ для визначення катехоламінів у біологічних рідинах за методом добавок

№ п/п	Зразок	Рівняння	R <sup>2</sup>
1	Сеча	$\Delta A = (0,24 \pm 0,02) + (0,021 \pm 0,002) \cdot C_{\text{Адр}}, \text{ мг/л}$	0,98
2	Сеча	$\Delta A = (0,20 \pm 0,04) + (0,034 \pm 0,009) \cdot C_{\text{Адр}}, \text{ мг/л}$	0,90
3	Сироватка крові	$\Delta A = (0,02 \pm 0,02) + (0,012 \pm 0,002) \cdot C_{\text{Адр}}, \text{ мг/л}$	0,99

Отримані результати було перераховано на вміст катехоламінів у зразку біологічної рідини. Результати наведені в табл. 5.5.

Результати визначення катехоламінів у сечі (1, 2) та сироватці крові гемодіалізного пацієнта (3) відділу еферентних технологій «Інституту нефрології АМН України» ТСФ (I) та візуальним тест-методом (II)

Зразок	$V_{\text{проби}}/V_{\text{ельюату}}$	Вміст адреналіну, мкг/добу (*мг/л)	
		I	II
1	2,5	$132 \pm 18$	$103 \pm 17$
2	2,5	$150 \pm 20$	$145 \pm 23$
3	1,0	$17,7 \pm 0,7^*$	$25 \pm 11^*$

Видно, що отримані результати добре корелюють із загальним вмістом катехоламінів у сечі здорової людини. Вміст катехоламінів, знайдений у сироватці крові гемодіалізного хворого, у 20 разів перевищує норму, що узгоджується із даними літератури щодо підвищення у 10–100 разів вмісту гормонів у людей з порушеннями роботи нирок.

### 5.3. Висновки до розділу 5

Апробація розроблених ТСФ та ВТ методик із застосуванням ТР на основі іммобілізованої ГПК1 для аналізу фармацевтичних препаратів місцевих анестезій показала, що методики характеризуються задовільною правильністю і відтворюваністю та можуть бути використані для цілей фармацевтичного аналізу. Розроблена ВТ методика не вимагає проведення попередньої пробопідготовки і може бути застосована для експрес контролю вмісту катехоламінів.

Іммобілізована ГПК1 дає змогу визначати вміст катехоламінів у біологічних рідинах розробленими методами та за їх рівнем діагностувати ряд важких захворювань. Методика визначення адреналіну у біологічних рідинах також характеризується задовільною правильністю та повторюваністю. Отримані дані корелюють з відомими медичними нормами по вмісту катехоламінів у сечі здорової людини. Тому розроблені ТСФ та тест-методики можна застосовувати як для цілей фармацевтичного аналізу, так і у клінічних лабораторія, вони прості у виконанні, експресні (час аналізу одного зразку не

перевищує 15 хв) та не поступаються за чутливістю більшості інструментальним методам визначення. Основними перевагами розробленого ТР є можливість застосування його як готової аналітичної форми – індикаторного порошку, стабільного при зберіганні у формі суспензії понад 6 місяців.

## **РОЗДІЛ 6. ЗАСТОСУВАННЯ ТР НА ОСНОВІ ЗАКРІПЛЕНОГО НА КРЕМНЕЗЕМІ РЕАКТИВУ ФОЛІНА ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛІФЕНОЛІВ ТА ОЦІНКИ ЇХ АНТИОКСИДАНТНОЇ АКТИВНОСТІ**

Антиоксиданти – це поживні речовини-нутриєнти: вітаміни, мінерали, а також ензими (протеїни, що беруть участь у хімічних реакціях), які блокують процес окиснення шляхом нейтралізації вільних радикалів. Проявляючи таку дію, антиоксиданти самі піддаються процесам окиснення. Саме тому існує постійна необхідність вживати речовини-антиоксиданти та поповнювати окисно–відновні ресурси організму.

Антиоксиданти в першу чергу містяться в різних свіжих фруктах, а також продуктах, виготовлених з них (свіжих соках, морсах та ін.) До багатих антиоксидантами фруктів відносяться чорниця, виноград, журавлина, горобина, чорноплідна горобина, смородина, гранат, асаї. Всі вони мають кислий або кисло-солодкий смак і червоний (червонувато-синій, синій) колір. Серед інших продуктів, що містять антиоксиданти, виділяють какао, червоне вино, зелений чай і меншою мірою чорний чай.

У сучасних умовах отримати всі необхідні антиоксиданти в достатній кількості із продуктів харчування досить важко, тому широкого вжитку набули біологічно-активні добавки (БАДи) і полівітаміни, в яких присутні антиоксиданти. Однак, неконтрольоване вживання таких препаратів може негативно впливати на здоров'я, оскільки, ефективність антиоксидантів залежить від дози препарату не лінійно. У великих концентраціях антиоксиданти починають діяти в зворотному напрямку і не гальмують, а, навпаки прискорюють вільно-радикальні реакції. Взаємодіючи з вільним радикалом, антиоксидант перетворюється на менш активний радикал. Поки таких радикалів мало, вони не шкідливі для організму. Але якщо їх накопичується занадто багато, вклад в окисні процеси організму стає вагомим. Невірний підхід до антиоксидантної терапії може призвести до негативних

наслідків. Добова потреба людини в антиоксидантах вітамінного походження становить – до 100 мг.

Основним джерелом антиоксидантів залишаються багаті на речовини-відновники овочі та фрукти. Основний внесок у загальну антиоксидантну активність продуктів вносять природні поліфеноли, що включають велику групу (кілька сотень) хімічних сполук, які мають відновні властивості та проявляють антиоксидантну дію. Ці сполуки включають фенольні кислоти, флавоноли (флавоноїди), дигідрофлавоноли, антоціани, катехіни, проантоціанідіни, таніни тощо. Відомо кілька тисяч поліфенолів, від яких переважно залежать запах і колір фруктів, овочів, ягід і квітів. Поліфеноли є фундаментальними сполуками, що підтримують тканини шкіри, збільшують опірність кровоносних судин, покращують кровообіг. Поліфеноли винограду мають протипроменевий ефект – виводять радіонукліди з організму, наприклад, стронцій. Відомий в кардіології «французький парадокс» – статистично достовірний факт низької захворюваності стенокардією та інфарктом міокарду у французів на відміну від населення інших розвинених країн, безпосередньо пов'язаний з культурою щоденного споживання ними червоного виноградного вина і маслинової олії. Дослідження цього феномену показало, що поліфеноли виноградного вина, маючи антиоксидантні властивості, ефективно зв'язують вільні радикали, активізують процеси етерифікації жирних кислот і холестерину, знижуючи рівень останнього у крові і перешкоджаючи тим самим розвитку атеросклерозу та ішемічної хвороби серця.

Серед розмаїття поліфенолів можна виділити флавоноїди – природні поліфеноли, які об'єднуються в одну групу за здатністю зміцнювати стінки капілярів, тобто проявляти Р-вітамінну активність. Флавоноїди, разом з іншими поліфенолами, потенційно корисні для здоров'я людини завдяки не тільки антиоксидантним, а й антибактеріальним, антивірусним, протизапальним і антиалергічним властивостям. Флавоноїди не токсичні для людини при будь-якому способі введення. Багато флавоноїдів завдяки Р-

вітамінній активності, зменшують крихкість кровоносних капілярів, підсилюють дію аскорбінової кислоти та проявляють седативну дію. Найчастіше ці сполуки знаходяться в рослинах у комплексі з іншими біологічно активними речовинами, проявляючи синергетичний ефект. Лікарськими формами, що містять флавоноїди, можуть бути висушені рослини, екстракти з рослинної сировини або флавоноїдні комплекси, виділені у чистому вигляді. Великі дози поліфенолів (зазвичай така ситуація виникає при інтенсивному вживанні чаю) можуть викликати хвороби печінки і нирок. Добова потреба людини у поліфенолах природного походження становить – до 500 мг. Тому контроль вмісту антиоксидантів у БАДах, вітамінних препаратах та оцінка АОА продуктів харчування є актуальною задачею сучасної аналітичної хімії.

### **6.1. Визначення загального вмісту поліфенолів у препаратах**

#### **«Кверцетин. Гранули» та «Вин-Віта» ТСФ і візуальним тест-методом**

Для перевірки метрологічних характеристик розроблених ТСФ та ВТ методик було проаналізовано стандартні розчини кверцетину, препарати «Кверцетин. Гранули» та біологічно-активна добавка «Вин-Віта».

*Методика ТСФ визначення поліфенолів у препараті «Кверцетин. Гранули» [4А, 6А].* У фарфоровій ступці розтирають у порошок вміст упаковки (~2 г) препарату «Кверцетин. Гранули», зважують точну наважку 0,0312 г та розчиняють у 25,0 мл водно-етанольної суміші (2:1).

У хімічний стакан ємністю 25,0 мл вводять 0,9 мл водно-етанольного розчину препарату, додають 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та водно-етанольну (2:1) суміш до загального об'єму 5,0 мл. Перемішують впродовж 10 хв з 0,075 г ТР, розчин декантують, промивають сорбент 0,7 моль/л розчином  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , вимірюють світлопоглинання суспензії у тонкому шарі ( $l=0,10$  см) при 750 та 996 нм і розраховують  $\Delta A = A_{750} - A_{996}$ . Концентрацію поліфенолів визначають за ГГ (табл. 6.1) та перераховують на вміст кверцетину у пробі.

**Методика ТСФ визначення поліфенолів у препараті «Вин-Віта».**

Відбирають  $\approx 20$  мл фітопрепарату «Вин–Віта» і центрифугують впродовж 5 хв для седиментації осаду виноградної сировини. Аліквоту (1,0 мл) прозорого розчину розбавляють дистильованою водою до загального об'єму 25,0 мл.

У хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводять 1,3 мл отриманого розчину препарату, додають 2,50 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  та дистильовану воду до загального об'єму 5 мл. Перемішують 10 хв з 0,075 г ТР, декантують, промивають сорбент 0,7 моль/л розчином  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі ( $l=0,10$  см) при 730 та 996 нм та розраховують  $\Delta A = A_{730} - A_{996}$ . Концентрацію поліфенолів визначають за ГГ (табл. 6.1) та перераховують на вміст кверцетину у пробі.

Таблиця 6.1

Параметри градувальних графіків для визначення поліфенолів розробленою ТСФ методикою (I) і СФ методиками з  $\text{Al}^{3+}$  (II) та РФ у розчині (III).  $Y = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C_{\text{кверцетину}}$ , мг/л ( $P=0,95$ ,  $n=3$ )

Методика	Y	$a \pm \Delta a$	$b \pm \Delta b$	R	МВ, мг/л
I	$A_{730}$	$0,048 \pm 0,002$	$0,0054 \pm 0,0001$	0,999	1,1
II	$A_{426}$	0	$0,065 \pm 0,002$	0,999	0,7
III	$A_{750}$	$0,06 \pm 0,01$	$0,084 \pm 0,004$	0,998	0,4

Для перевірки правильності отриманих результатів було застосовано дві методики. Методика, що ґрунтується на комплексоутворенні поліфенолу з  $\text{Al(III)}$  дає можливість вибірково визначити у зразку окремо вміст кверцетину і таніну шляхом фотометрування розчинів при різних довжинах хвиль [208]. Інша методика базується на відновленні РФ у розчині і дає можливість визначати загальний вміст поліфенолів [140]. Результати визначення кверцетину у препараті «Кверцетин. Гранули» та загального вмісту поліфенолів у препараті «Вин-Віта» наведено у таблиці 6.2.

Результати визначення вмісту поліфенолів у препаратах рослинного походження розробленою ТСФ методикою (I) і відомими СФ методиками із застосуванням  $Al^{3+}$ (II) та РФ(III)  
(стандартна речовина – кверцетин,  $P=0,95$ ,  $n=3$ )

Об'єкт	Вміст кверцетину (мг./г) та поліфенолів* (мг/л) (Sr)			
	Заявлено	I	II	III
«Кверцетин. Гранули»	40	$36 \pm 2$ (0,022)	$38,9 \pm 0,7$ (0,007)	$37 \pm 1$ (0,011)
«Вин-Віта»	–	$1225 \pm 41^*$ (0,013)	$42 \pm 5^*$ (0,048)	$1219 \pm 14^*$ (0,005)

З табл. 6.2 видно, що результати визначення вмісту кверцетину у препараті «Кверцетин. Гранули», отримані розробленими і відомими методиками добре корелюють між собою. Оскільки у препараті «Вин-Віта» основними компонентами є олігомерні і мономерні біофлавоноїди, переважно антоціани, а також таніни та катехіни, результати, отримані при аналізі препарату «Вин-Віта» за розробленою узгоджуються із загальним вмістом поліфенолів, що був знайдений за методикою з реактивом Фоліна у розчині, і відрізняються від результатів, отриманих за методикою з  $Al(III)$ . Остання є вибірковою на кверцетин та його похідні. Отримані дані добре корелюють із вмістом флавонолів у вказаному препараті ( $\leq 4-6\%$ ). Таким чином, розроблений ТР може бути застосований для визначення кверцетину і таніну та контролю вмісту поліфенольних сполук, а отже для оцінки інтегральних показників якості, зокрема антиоксидантної активності рослинних продуктів у харчовій та фармацевтичній промисловості.

***Оцінка загального вмісту поліфенолів ВТ методом (стандартна речовина – кверцетин)***

Для перевірки правильності розробленої методики візуального тест-визначення поліфенолів було використано метод «введено-знайдено».

У хімічний стакан ємністю 25,0 мл вводили 0,5 мл, 1,0 мл або 2,0 мл робочого розчину кверцетину з концентрацією 60 мг/л, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл, додавали 0,075 г ТР та перемішували магнітною мішалкою впродовж 10 хв. Сорбент відокремлювали декантацією, послідовно промивали трьома порціями дистильованої води та визначали вміст аналіту за кольоровою тест-шкалою.

Результати оцінки загального вмісту поліфенолів у робочих розчинах у перерахунку на вміст кверцетину наведено у таблиці 6.3

Таблиця 6.3

Результати оцінки вмісту поліфенолів у робочих розчинах ВТ методом

( $P= 0,95$ ;  $n=5$ )

№ п/п	Вміст кверцетину, мг/л		$S_r$
	Введено	Знайдено	
1	6,0	$6 \pm 1$	0,12
2	12,0	$12 \pm 3$	0,25
3	24,0	$25 \pm 3$	0,10

Видно, що відносне стандартне відхилення не перевищує 30%, що є прийнятним для візуальних тест-методів аналізу.

#### **Оцінка АОА у соках ВТ методом(стандартна речовина – кверцетин)**

Розроблену ВТ методику було застосовано для оцінки АОА фруктових соків та фруктів. Пробопідготовка зразків обмежувалася попереднім фільтруванням (для відокремлення осаду фруктової сировини) та розбавленням соків фруктів червоних сортів у 50, а зелених сортів – у 5 разів.

Для оцінки АОА у хімічні стакани ємністю 25,0 мл вводили аліквотну частину (0,1–2,0 мл) розбавленої, як вказано вище, проби, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. Перемішували магнітною мішалкою з 0,075 г ТР впродовж 10 хв. Сорбент

відокремлювали декантацією, послідовно промивали трьома порціями дистильованої води та визначали АОА за кольоровою тест-шкалою.

Результати оцінки АОА соків у перерахунку на кверцетин наведено у табл. 6.4. Отримані результати співставлено з вмістом кверцетину, знайденого за СФ методикою з  $Al(III)$  та загальною концентрацією поліфенолів за даними методики з РФ.

Таблиця 6.4

Вмісту кверцетину за СФ методикою з  $Al^{3+}$  (I), поліфенолів за СФ методикою з РФ у розчині (II) і значення АОА соків (III) за розробленою ВТ методикою (стандартна речовина – кверцетин)

Сік	Вміст, $\Gamma_{\text{кверцетину}}/\text{Л}$		
	I	II	III
Плоду свіжого граната	$0,079 \pm 0,008$	$0,950 \pm 0,005$	$6,6 \pm 0,2$
Гранатовий ТМ «Sandora»	$0,0120 \pm 0,0007$	$0,440 \pm 0,001$	$1,6 \pm 0,2$
Виноградний ТМ «Sandora»	$0,0130 \pm 0,0007$	$0,420 \pm 0,001$	$1,2 \pm 0,1$
Яблучно-виноградний «Садочок»	$0,006 \pm 0,004$	$0,093 \pm 0,006$	$0,5 \pm 0,1$
Виноградно-яблучний «ОКЗДХ»	$0,006 \pm 0,0004$	$0,0711 \pm 0,0005$	$0,4 \pm 0,1$

На рис. 6.1 наведено кореляційну залежність між АОА та вмістом кверцетину. Видно, що отримані дані добре корелюють між собою, коефіцієнт кореляції становить 0,997.

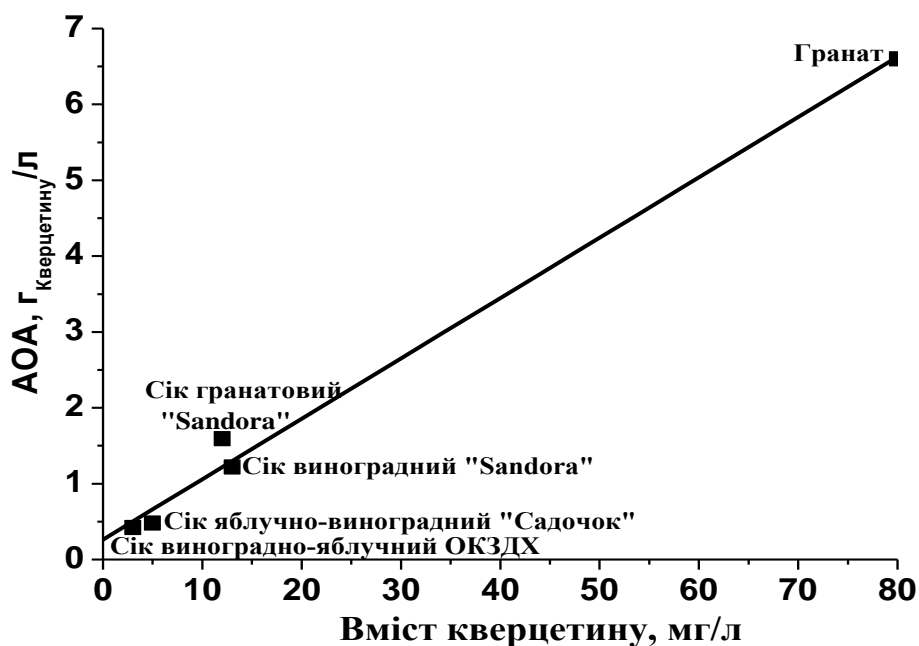


Рис. 6.1. Кореляція між антиоксидантною активністю та загальним вмістом флавоноїдів у фруктових соках

Отримані результати свідчать про придатність розробленого способу як для оцінки загального вмісту поліфенолів, так і АОА у соках.

## 6.2. Визначення загального вмісту поліфенолів у соках, винах та фруктах ТСФ методом і оцінка їх антиоксидантної активності візуальним тест-методом

*Методика ТСФ визначення загального вмісту поліфенолів у соках та винах (стандартна речовина – танін) [10А–15А].*

Для визначення вмісту поліфенолів ТСФ методом соки та вино попередньо фільтрують крізь фільтрувальний папір „синя стрічка” для відокремлення осаду фруктової сировини.

Визначення загального вмісту поліфенолів у соках та винах проводять наступним чином: у хімічний стакан ємністю 25,0 мл вводять 0,1 мл соку (вина), 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. ТР масою 0,100 г обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та вимірюють світлопоглинання у тонкому шарі. Концентрацію поліфенолу у розчині

визначають за градувальним графіком у перерахунку на стандартну речовину – танін.

***Методика ТСФ визначення загального вмісту поліфенолів у фруктах.***

Для визначення вмісту поліфенолів ТСФ методом фрукти перетирають на дрібну терку та віджимають. Отриману фруктову сировину центрифугують впродовж 5 хв, сік відфільтровують крізь фільтрувальний папір „синя стрічка”, отриманий фільтрат використовують для аналізу.

Для визначення вмісту поліфенолів у фруктах у хімічний стакан ємністю 25,0 мл вводять 0,1–2,0 мл отриманого фруктового соку, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. ТР масою 0,100 г обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та вимірюють світлопоглинання в тонкому шарі. Концентрацію поліфенолу у розчині визначають за градувальним графіком у перерахунку на стандартну речовину – танін.

***Оцінка АОА соків, вин та фруктів ВТ методом (стандартна речовина – танін).*** Оцінку АОА напоїв та фруктів проводять наступним чином: у хімічний стакан ємністю 25,0 мл вводять 0,1–2 мл проби, 2,5 мл 0,7 моль/л розчину  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  і дистильовану воду до загального об'єму розчину 5,0 мл. ТР масою 0,100 г обробляють 0,1 мл отриманого розчину, висушують на повітрі при кімнатній температурі та за кольоровою тест-шкалою визначають АОА у перерахунку на стандартну речовину – танін.

Параметри ГГ для визначення вмісту поліфенолів, танінів, флавоноїдів та оцінки АОА наведено у табл. 6.5. Отримані результати співставлено із вмістом танінів та флавоноїдів, які було визначено спектрофотометрично, як вказано вище. Результати визначення АОА наведено у табл. 6.6.

Таблиця 6.5

Параметри ГГ для оцінки АОО розробленою ТСФ методикою (I), для визначення вмісту танінів (II), флавоноїдів (III) за методикою з  $Al^{3+}$ , для визначення загального вмісту поліфенолів (стандартна речовина: танін – IV, кверцетин – V) за методикою РФ у розчині.

$$Y = (a \pm \Delta a) + (b \pm \Delta b) \cdot C, \text{ мг/л (R= 0,95, n=3)}$$

Методика	Y	$a \pm \Delta a$	$(b \pm \Delta b) \cdot 10^3$	R	MB, мг <sub>таніну(кверцетину*)</sub> /л
I	$A_{750}$	$0,47 \pm 0,01$	$2,1 \pm 0,2$	0,992	14
II	$A_{286}$	$0,04 \pm 0,01$	$17,9 \pm 0,2$	0,999	1,7
III	$A_{420}$	$0,008 \pm 0,007$	$73,4 \pm 0,9$	0,999	0,3*
IV	$A_{750}$	$0,08 \pm 0,01$	$15 \pm 2$	0,980	2
V	$A_{750}$	$0,06 \pm 0,01$	$84 \pm 4$	0,998	0,4*

Таблиця 6.6

Результати визначення АОА соків, фруктів та вин розробленими ТСФ(I) та ВТ методиками (II), вмісту таніну та флавоноїдів за методикою з АІ(III), загального вмісту поліфенолів за методикою з РФ у розчині

№ зразку	Сік	Вміст, Г таніну(кверцетину*)/Л					
		Танінів	Флавоноїдів*	Поліфенолів	Поліфенолів*	АОА (I)	АОА (II)
		1	2	3	4	5	6
<b>Соки свіжих фруктів</b>							
1	Сік граната	3,3 ± 0,4	0,079 ± 0,008	4,8 ± 0,4	0,95 ± 0,03	4,1 ± 0,4	5,2 ± 0,9
2	Сік винограду (консервований)	1,9 ± 0,1	0,061 ± 0,004	2,32 ± 0,09	0,44 ± 0,01	5,8 ± 0,5	6,5 ± 0,6
3	Сік зеленого яблука	0,42 ± 0,1	0,0140 ± 0,0004	0,40 ± 0,02	0,088 ± 0,005	4,1 ± 0,1	5,3 ± 0,4
4	Сік ківі	0,8 ± 0,1	0,030 ± 0,006	0,95 ± 0,04	0,18 ± 0,01	6,3 ± 0,2	5,3 ± 0,4
	Сік червоного яблука	0,54 ± 0,05	0,028 ± 0,004	—	—	5,8 ± 0,4	6,5 ± 0,6
<b>Фруктові соки</b>							
5	Сік гранатовий ТМ «Jaffa»	1,2 ± 0,1	0,059 ± 0,001	2,5 ± 0,2	0,46 ± 0,03	5,0 ± 0,1	5,3 ± 0,4
6	Сік гранатовий ТМ «Sandora»	0,9 ± 0,1	0,0120 ± 0,0007	1,5 ± 0,1	0,440 ± 0,001	1,7 ± 0,4	1,6 ± 0,3

		1	2	3	4	5	6
7	Сік виноградний ТМ «Sandora»	0,8 ± 0,1	0,0130 ± 0,0007	1,4 ± 0,1	0,42 ± 0,001	1,9 ± 0,6	2,0 ± 0,4
8	Сік із іспанського винограду ТМ «Sandora»	2,9 ± 0,3	0,079 ± 0,008	5,2 ± 0,3	1,1 ± 0,1	4,6 ± 0,5	5 ± 1
9	Сік виноградний ТМ «Rich»	1,6 ± 0,1	0,066 ± 0,003	3,7 ± 0,2	0,69 ± 0,03	5,57 ± 0,02	5,3 ± 0,4
	Сік яблучно– виноградний ТМ «Садочок»	0,253 ± 0,009	0,006 ± 0,004	0,40 ± 0,03	0,093 ± 0,006	4,0 ± 0,1	—
	Сік виноградно– яблучний ТМ «ОКЗДХ»	0,21 ± 0,01	0,0063 ± 0,0004	0,247 ± 0,003	0,0711 ± 0,0005	5,6 ± 0,2	—
	Сік березовий	0,060 ± 0,006	0,007 ± 0,001	0,064 ± 0,052	—	3,6 ± 0,3	4,0 ± 0,8
<b>Вина</b>							
10	Біле вино	0,5 ± 0,1	0,010 ± 0,002	0,85 ± 0,06	0,16 ± 0,01	1,7 ± 0,2	0,8 ± 0,2
11	Червоне вино	3,2 ± 0,3	0,103 ± 0,002	6,6 ± 0,3	1,20 ± 0,05	3,6 ± 0,2	4,0 ± 0,8

За отриманими даними побудували кореляційну залежність між АОА та вмістом танінів у проаналізованих об'єктах (рис. 6.2).

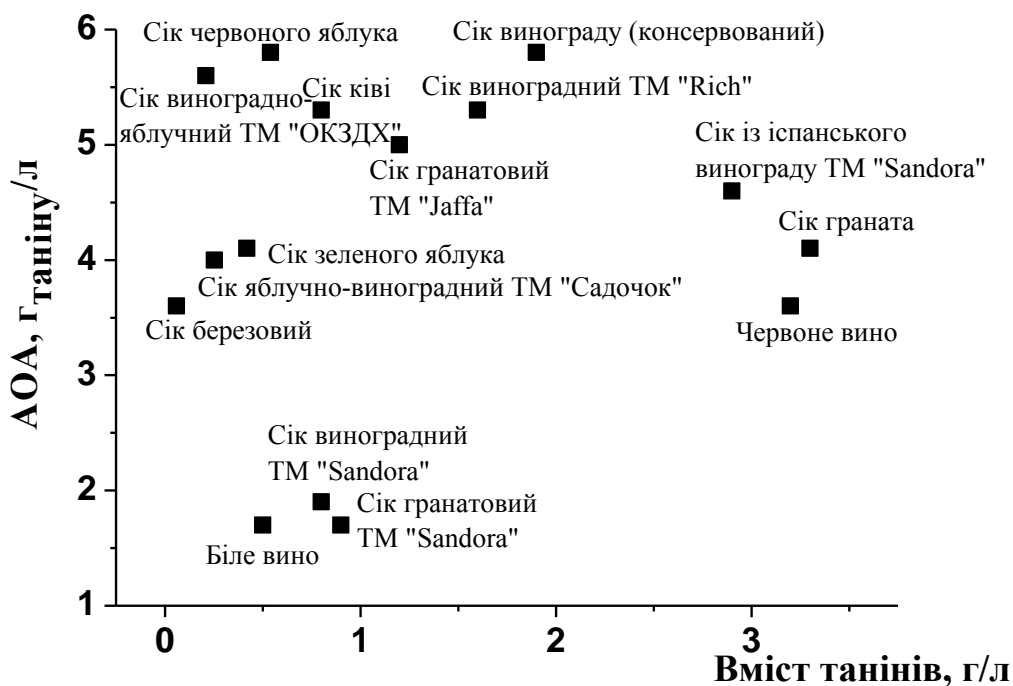


Рис. 6.2. Кореляція між антиоксидантною активністю та загальним вмістом танінів у проаналізованих об'єктах.

Кореляція між вмістом танінів та АОА у проаналізованих об'єктах є більш складною, оскільки у фруктових соках і винах міститься поліфеноли різних класів, для яких важко підібрати єдиний стандарт. Тому отримані результати було оброблено методом кластерного аналізу, який дає можливість розділити масив даних за ознакою подібності. На дендрограмі (рис. 6.3) виділено два кластери. До першого кластеру потрапляють соки фруктів червоних сортів та сік ківі, які за даними літератури, містять найбільшу кількість антиоксидантів. Другий кластер включає соки фруктів зелених сортів, основний внесок у АОА яких дають інші класи поліфенольних сполук.

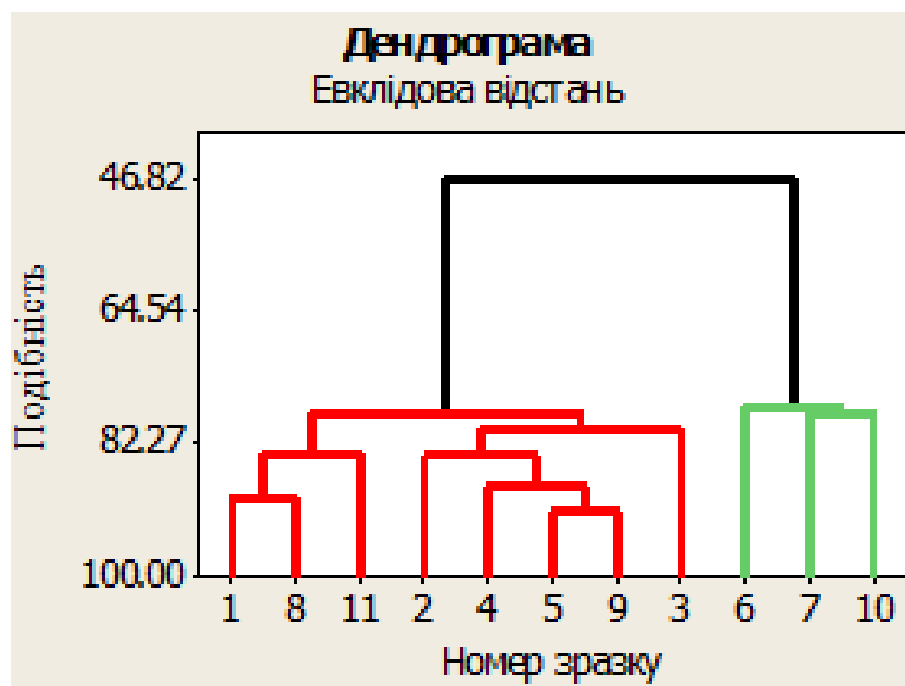


Рис. 6.3. Дендрограма кластерного аналізу даних табл. 6.6. На осі абсцис зазначено номер зразку

Отже, розроблені методики можуть бути використані для оцінки АОА напоїв і БАДів з метою призначення адекватної антиоксидантної терапії для покращення загального стану організму людини.

### 6.3 Висновки до розділу 6.

Оскільки, природні поліфеноли, які містяться у плодах винограду, гранату тощо та у фруктових соках є основним джерелом антиоксидантів, розроблений ТР на основі ГПК2 було апробовано при аналізі фруктових соків, а також біологічно-активних добавок, які в наш час є широко популярними серед населення. Показано, що значення АОА корелює із вмістом флавоноїдів (стандарт – кверцетин) у пробах. Кореляція між вмістом танінів та АОА у проаналізованих об'єктах є більш складною, оскільки у фруктових соках і винах міститься поліфеноли різних класів, для яких важко підібрати єдиний стандарт.

Отже, розроблені методики дають можливість швидко оцінювати АОА напоїв, БАДів та фруктових соків з метою правильного використання антиоксидантної терапії і покращення загального стану організму.

Порівняно із вільнорадикальними методиками, запропоновані методики ТСФ визначення поліфенолів та тест-оцінки АОА не потребують малодоступних і дорогих реагентів, зручні, прості у виконанні та експресні, час аналізу одного зразку не перевищує 15 хв.

Порівняно з аналогом, що базується на відновленні адсорбційно закріпленого на кремнеземі тетрабензотетраазоциклогексадецин-купруму (II) підвищено чутливість визначення поліфенолів у перерахунку на речовину-стандарт кверцетин. Використання комерційно доступного реактиву Фоліна, як модифікатору, дозволяє уникнути процедур синтезу реагенту, завдяки чому спростити процес створення готової аналітичної форми.

## ВИСНОВКИ

1. Шляхом послідовного модифікування кремнезему четвертинною амонієвою сіллю та ГПК1 і ГПК2 отримано нові твердофазні реагенти, що характеризуються високою ємністю за ГПК на ділянці моношару (4,2 та 9,1 мкмоль/г відповідно). Методами адсорбції, молекулярної спектроскопії та термодесорбції з'ясовано, що міцному утримуванню ГПК на поверхні кремнезему за умов утворення моношару сприяє іоно-асоціативна взаємодія ГПК з іммобілізованим ТДАН та утворення водневих зв'язків ГПК з ОН-групами поверхні. Таке закріплення модифікатора на сорбенті сприяє стабілізації окиснених ГПК до дії відновників, що зумовлює збільшення вибірковості твердофазних ГПК у порівнянні із нативною їх формою у розчині і розширенню робочого діапазону у напрямку збільшення рН розчину.
2. На основі проведених досліджень обґрунтовано вибір аналітичних форм для визначення катехоламінів та поліфенолів. Ліпшою аналітичною формою для визначення поліфенолів та оцінки антиоксидантної активності виявилася іммобілізована у полімолекулярній формі ГПК2, яка за окисними властивостями перевершує хемосорбовану її форму. Адсорбована ГПК1 через стабілізацію поверхнею кремнезему взаємодіє лише із більш сильними, ніж поліфеноли, відновниками, що сприяє збільшенню вибірковості ТР на її основі.
3. Іммобілізована ГПК2 відновлюється поліфенолами у середовищі 0,35 М карбонату натрію впродовж 8 хв, що супроводжується зміною забарвлення сорбенту. Це було покладено в основу ТСФ визначення поліфенолів з межею виявлення 1,0 мг/л за кверцетином і 14 мг/л за таніном. Лінійність градууювального графіку зберігається до 30 і 230 мг/л, відповідно. Іммобілізована ГПК1 відновлюється катехоламінами у середовищі боратного буферного розчину з рН = 10,6 впродовж 10 хв, що супроводжується контрастною зміною забарвлення сорбенту від жовтого

до синього. Це було покладено в основу ТСФ визначення катехоламінів з межею виявлення 1,7 мг/л адреналіну та 10 мг/л дофаміну. Лінійність градувальних графіків зберігається в межах (мг/л): 4,6–92 та 15–92 адреналіну і дофаміну, відповідно.

4. Для оцінки візуальним тест-методом антиоксидантної активності за стандартом кверцетин та танін розроблено кольорові тест-шкали з використанням ТР на основі іммобілізованої ГПК2 у межах 1,0–36 та 5,0–180 мг/л відповідно. На основі іммобілізованої ГПК1 розроблено кольорову тест-шкалу для визначення адреналіну у межах 3,0–34 мг/л.
5. Дослідження впливу сторонніх іонів показало, що відновники, які використовують для консервування фармацевтичних препаратів не заважають визначенню катехоламінів іммобілізованою ГПК1. Відновники та окисники, що містяться у біологічних рідинах також не заважають визначенню катехоламінів у 10–100-кратних кількостях. Визначенню поліфенолів та оцінці антиоксидантної активності у фітопрепаратах та фруктових соках іммобілізованою ГПК2 не заважає аскорбінова кислота у двократній кількості.
6. Апробація розроблених методик визначення катехоламінів іммобілізованою ГПК1 для аналізу препаратів місцевих анестезій та біологічних рідин (сечі та сироватки крові) свідчить про їх придатність для цілей фармацевтичного та клінічного аналізу. Методики є простими у виконанні та не поступаються за чутливістю відомим інструментальним методикам. Узгодження отриманих результатів оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів, фруктових соків та вин розробленими методиками із вмістом поліфенолів та танінів вказує на придатність іммобілізованої ГПК2 для оцінки інтегральних показників якості рослинної сировини.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Поп М. С. Гетерополи- и изополикислоты / Пер. с. англ. Я. А. Мороз, Г. М. Рязанцева. – Новосибирск: Наука, 1990. – 312 с., 24
2. Максимов Г. М. Достижения в области синтеза полиоксометаллатов и изучения гетерополикислот / Г. М. Максимов // Успехи химии. – 1995. – Т. 64, № 5. – С. 480–493.
3. Кожевников И. В. Успехи в области катализа гетерополикислотами / И. В. Кожевников // Успехи химии. – 1987. – Т. 56, № 9. – С. 1417–1443.
4. Pope M. T. Polyoxo anions: synthesis and structure / M. T. Pope // Comprehensive Coord. Chem. II. – 2003. – Vol. 4. – P. 635–678.
5. Pope M. T. Introduction to polyoxometalates chemistry / M. T. Pope // NATO Sci. Ser. II Math. Phys. Chem. – 2003. – Vol. 98. – P. 3–31.
6. Uchida S. States and dynamic behavior of protons and water molecules in  $H_3PW_{12}O_{40}$  pseudo liquid phase analyzed by solid–State MAS NMR / S. Uchida, K. Inumaru, M. Misono // J. Phys. Chem. B. – 2000. – Vol. 104, Iss. 34. – P. 8108–8115.
7. Misono M. Unique acid catalysis of heteropoly compounds (heteropolyoxometalates) in the solid state / M. Misono // Chem. Commun. – 2001. – Iss. 13. – P. 1141–1152.
8. Кожевников И. В. Гетерополикислоты в катализе / И. В. Кожевников, К. И. Матвеев // Успехи химии. – 1982. – Т. 51. – С. 1875–1896.
9. Використання гетерополіаніонів структури Кеггіна в аналізі органічних та неорганічних сполук / [Ткач В. І., Карандеєва Н. І., Циганок Л. П., Вишнікін А. Б.] – Дніпропетровськ: УДХТУ, 2002. – 184 с.
10. Brown G. M. Dodecatungstophosphoric acid hexahydrate,  $(H_5O_2^+)_3(PW_{12}O_{40}^{3-})$ . The true structure of Keggin's “pentahydrate” from single–crystal X–ray and neutron diffraction data / G. M. Brown, M. R. Noe Spirlet, W.R. Busing, H. A. Levy // Acta Crystallogr., Sect. B – 1977. – Vol. 33. – P. 1038–1046.
11. Tsigdinos G. A. Heteropoly compounds of molybdenum and tungsten / G. A. Tsigdinos // Top. Curr. Chem. – 1978. – Vol. 76. – P. 1–64.

12. Cavani F. Heteropolycompound – based catalysts: a blend of acid and oxidizing properties / F. Cavani // *Catal. Today*. – 1998. – Vol. 41, № 1. – P. 73–86.
13. Бабко А. К. Пилипенко А. Т. Фотометрический анализ. Методы определения неметаллов. – М.: Химия, 1974. – 360 с.
14. Varga G. V. Heteropoly blues. IV. Spectroscopic and magnetic properties of some reduced polytungstates / G. V. Varga, E. Papaconstantinou, M. T. Pope // *Inorg. Chem.* – 1970. – Vol. 9, № 3. – P. 662–667.
15. Клитина В. И. Экстракция восстановленной фосфорномолибденовой кислоты кислородсодержащими растворителями / В. И. Клитина, Ф. П. Судаков, И. П. Алимарин // *Журн. неорг. химии*. – 1962. – Т. 7 – С. 1565–1569.
16. Алимарин И. П. Электрохимические методы в аналитической химии гетерополисоединений / И. П. Алимарин, Е. Н. Дорохова, Л. П. Казанский, Г. В. Прохорова // *Журн. аналит. химии*. – 1980. – Т. 35, № 10. – С. 2000–2025.
17. Song I. K. Redox properties of Keggin–type heteropolyacid (HPA) catalysts: effect of counter–cation, heteroatom, and polyatom substitution / I. K. Song, M. A. Barteau // *J. Mol. Catal. A: Chem.* – 2004. – Vol. 212, Iss 1–2. – P. 229–236.
18. Motomizu S. Trace and ultratrace analysis methods for the determination of phosphorus by flow–injection techniques / S. Motomizu, Z.–H. Li // *Talanta*. – 2005. – Vol. 66, Iss. 2. – P. 332–340.
19. Yang C.–X. Determination of total phosphorus in water sample by digital imaging colorimetry / C.–X. Yang, X.–Y. Sun, B. Liu, H.–T. Lian // *Chin. J. Anal. Chem.* – 2007 – Vol. 35, Iss. 6. – P. 850–853.
20. Булатов А. И. Циклическое инъекционное фотометрическое определение микроконцентраций фосфат–ионов в природных водах в виде ионного ассоциата молибдофосфата с астрафлксином / А. И. Булатов, К. А.

Субботина, А. Б. Вишникин, Л. Н. Москвин // Журн. аналит. химии. – 2010. – Т. 65, № 3. – С. 240–244.

21. Vishnikin A. B. Rapid, sensitive and selective spectrophotometric determination of phosphate as an ion associate of 12–molybdophosphate with Astra Phloxine / A. B. Vishnikin, M. E. A. Al-Shwaiyat, Ya. R. Bazel, V. Andruch // *Microchim. Acta.* – 2007. – Vol. 159, № 3–4. – С. 371–378.
22. Вишникина Е. В. Определение фосфора реакцией умножения с использованием восстановленной формы 12–молибдофосфата в сталях и сплавах / Е. В. Вишникина, А. Б. Вишникин, Ф. А. Чмиленко // *Вопросы химии и хим. технологии.* – 2003. – № 1. – С. 14–18.
23. Proost J. Spectrophotometric determination of silicon in ultrapure, dilute hydrofluoric acid solutions / J. Proost, R. Santoro, S. Abu Jeriban, I. Guiot // *Microchem. J.* – 2008. – Vol. 89, Iss. 1. – P. 48–51.
24. Li Y. Simultaneous determination of silicate and phosphate in boiler water at power plants based on series flow cells by using flow injection spectrophotometry / Y. Li, Y. Muo, H. Xie // *Anal. Chim. Acta.* – 2002. – Vol. 455, № 2. – P. 315–325.
25. Stopped–flow injection simultaneous determinatoin of phosphate and silicate using molybdenum blue / K. Grudpan, P. Ampana, Y. Udnana, S. Jayasvatib [et al.] // *Talanta.* – 2002. – Vol. 58, № 6. – P. 1319–1326.
26. Селиванова Т. В. Сорбционно–спектрофотометрическое и визуально–тестовое определение микроколичеств кремния в виде ионного ассоциата 12–молибдосиликата с кристаллическим фиолетовым / Т. В. Селиванова, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // *Журн. аналит. химии.* – 2010. – Т. 65, № 2. – С. 147–152.
27. Добрынина Н. А. Изополи– и гетерополисоединения / Н. А. Добрынина // *Журн. неорг. химии.* – 2002. – Т. 47, № 4. – С. 577–587.
28. Вода питьевая. Метод определения массовой концентрации мышьяка : ГОСТ 4152–89. – [Действующий от 1991–01–01]. – М. : Изд–во стандартов, 1990. – 8 с.

29. Metelka R. Determination of arsenate and organic arsenic via potentiometric titration of its heteropoly anions / R. Metelka, S. Slavikova, K. Vytras // *Talanta*. – 2002. – Vol. 58, Iss. 1. – P. 147–151.
30. Vishnikin A. B. Novel indirect spectrophotometric methods for determination of phosphate and arsenate using polyoxometalates and micellar medium / A. B. Vishnikin // *J. Mol. Liq.* – 2005. – Vol. 118, № 1–3. – P. 51–55.
31. Вишникін А. Б. Визначення мышьяка в формі молибдованадієвого гетерополикомплексу, модифікованого неіоногенними ПАВ / А. Б. Вишникін, М. І. А. Аль-Швейят, С. В. Хлынцева, Ф. А. Чмиленко // *Укр. хім. журн.* – 2004. – Т. 70, № 6. – С. 109–113.
32. Симаненко Т. В. Визначення мышьяка (V) в формі іонного асоціату 10-молибдо-2-вольфрамоарсенату з кристалічним фіолетовим в мицелярній середі / Т. В. Симаненко, А. Б. Вишникін, Л. П. Цыганок // *Укр. хім. журн.* – 2006. – № 10. – С. 145–149.
33. Determination of Silicon, Phosphorous, Arsenic, and Germanium as heteropoly acids / D. B. Dubovik, T. I. Tikhomirova, A. V. Ivanov, P. N. Nesterenko [et al.] // *J. Anal. Chem.* – 2003. – Vol. 58, № 9. – P. 802–820.
34. Селіванова Т. В. Іонний асоціат 12-молибдогерманату з астрафлосином – нова аналітична форма визначення германію / Т. В. Селіванова, А. Б. Вишникін, Л. П. Цыганок // *Вісник ДНУ*. – 2009. – № 11. – С. 20–27.
35. Murata K. Spectrophotometric determination of trace amounts of titanium(IV), zirconium(IV) and thorium(IV) with molybdophosphoric acid solution / K. Murata, Y. Yokoyama, S. Ikeda // *Anal. Chim. Acta*. – 1969. – Vol. 48, Iss. 2. – P. 349–356.
36. Вишникін А. Б. Використання реакцій хімічного і електрохімічного відновлення 12-молибдогаллата для визначення галію / А. Б. Вишникін, В. В. Кириллов, Л. П. Цыганок // *Журн. аналит. хімії*. – 1995. – Т. 50, № 2. – С. 167–172.

37. Кольцова Е. Г. Косвенное спектрофотометрическое определение галлия в виде молибдофольфраматовых ГПК / Е. Г. Кольцова, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // Завод. лабор. – 1998. – Т. 64, № 10. – С. 8–9.
38. Кольцова Е. Г. Спектрофотометрическое определение галлия в виде восстановленного гидразином  $\text{GaMo}_5\text{W}_8\text{O}_{40}^{5-}$  / Е. Г. Кольцова, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // Укр. хим. журн. – 1998. – Т. 64, № 5. – С. 44–46.
39. Гайдук О. В. Молибдофосфорная кислота как реагент для определения кобальта (II) / О. В. Гайдук, Р. П. Панталер // Аналитика и контроль. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 40–42.
40. Tsiganok L. P. Spectrophotometric determination of tungsten based on molybdotungsten isopolyanions in presence of non-ionic surfactant / L. P. Tsiganok, A. N. Vaculich, A. B. Vishnikin, E. G. Koltsova // Talanta. – 2005. – Vol. 65, Iss. 1. – P. 267–270.
41. Петрушина Г. А. Восстановленный 18-молибдофосфат – новый реагент для определения нитрит-иона / Г. А. Петрушина, Л. П. Цыганок, А. Б. Вишникин // Вопросы химии и хим. технологии. – 2010. – № 1. – С. 79–83.
42. Barzegar M. Kinetic spectrophotometric determination of trace amounts of nitrite by its reaction with molybdosilicic acid blue / M. Barzegar, M. F. Mousavi, A. Nemati // Microchem. J. – 2000. – Vol. 65, Iss. 2. – P. 159–163.
43. Niazi A. PARAFAC decomposition of three-way kinetic-spectrophotometric spectral matrices based on phosphomolybdenum blue complex chemistry for nitrite determination in water and meat samples / A. Niazi, J. Ghasemi, A. Yazdanipour // Anal. Lett. – 2005. – Vol. 38, Iss. 14. – P. 2377–2392.
44. Zatar N. A. Spectrophotometric determination of nitrite and nitrate using phosphomolybdenum blue complex / N. A. Zatar, M. A. Abu-Eid, A. F. Eid // Talanta. – 1999. – Vol. 50. – P. 819–826.
45. Цыганок Л. П. Определение некоторых окислителей и восстановителей при помощи кеггиновских гетерополикислот / Л. П. Цыганок, Г. В.

- Мальцева, А. Б. Вишникин, С. А. Хмеловская // Вопросы химии и хим. технологии. – 1999. – № 3. – С. 15–18.
- 46.** Khasawneh I. M. Determination of distribution ratios of molybdophosphoric acid in some organic solvents by atomic absorption spectrophotometry and the subsequent determination of trace amounts of tin(II) by absorption spectrophotometry / I. M. Khasawneh // *Microchem. J.* – 1989. – Vol. 39, Iss. 3. – P. 336–343.
- 47.** Качан И. А. Твердофазноспектрофотометрическое определение восстановителей в растворе по реакции образования "синей" гетерополикислоты / И. А. Качан, О. А. Запорожец, Л. С. Зинько, А. А. Коваль // *Методы и объекты химического анализа.* – 2006. – Т. 1, № 2. – С. 127–131.
- 48.** Манухин Б. Н. Колориметрический метод дифференциального определения адреналина и норадреналина / Б. Н. Манухин // *Биохимия* – 1961. – Т. 26, № 4. – С. 715–721.
- 49.** Манухин Б.Н. В кн.: Адреналин и норадреналин, Москва: Наука, 1964, с. 297–300.
- 50.** 11-Molybdobismuthophosphate – A new reagent for the determination of ascorbic acid in batch and sequential injection systems / A. B. Vishnikin, T. Ye. Svinarenko, H. Sklenarova, P. Solich [et al.] // *Talanta.* – 2010. – Vol. 80, Iss. 5. – P. 1838–1845.
- 51.** D. T. Burns. Flow-injection spectrophotometric determination of ascorbic acid by reduction of vanadotungstophosphoric acid / D. T. Burns, N. Chimpalee, D. Chimpalee, S. Rattariderom. // *Anal. Chim. Acta.* – 1991. – Vol. 243. – P. 187–190.
- 52.** Циклическое инъекционное фотометрическое определение аскорбиновой кислоты в лекарственных препаратах / А. В. Булатов, У. М. Страшнова, А. Б. Вишникин, Г. М. Алексеева [и др.] // *Журн. аналит. химии.* – 2011. – Т. 66, № 3. – С. 282–286.

53. Determination of ascorbic acid with wells–dawson type molybdophosphate in sequential injection system / A. B. Vishnikin, H. Sklenarova, P. Solich, G. A. Petrushina [et al.] / *Anal. Lett.* – 2011. – Vol. 44, Iss. 1–3. – P. 514–527.
54. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических веществ. М.: Химия, 1975. – 360 с., 72)
55. Петрушена Г. А. Определение аскорбиновой кислоты с использованием молибдофосфата структуры Доусона / Г. А. Петрушена, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // Тези доп. VIII українська конференція з аналітичної хімії. – Одеса, 2008. – С. 127.
56. Петрушина Г. А. Спектрофотометрическое определение аскорбиновой кислоты с помощью  $P_2Mo_{18}O_{62}^{6-}$  / Г. А. Петрушина, А. Б. Вишникин, Л. П. Цыганок // *Укр. хим. журн.* – 2010. – Т. 76, № 4. – С. 3–9.
57. Persky H. Chemical determination of adrenaline and noradrenaline in body fluids and tissues / H. Persky // *Methods Biochem. Anal.* – 1955. – Vol. 2. – P. 57–82.
58. Матлина Э.Ш. Обмен катехоламинов в гормональном и медиаторных звеньях симпато–адреналовой системы при стрессе / Э.Ш. Матлина // *Успехи физиол. наук.* – 1972. – Т. 3, № 4. – С. 92–130.
59. Расак К. et al. Феохромоцитома: клинические рекомендации 1–го международного симпозиума (ISP) / Пер. с англ. Д. Г. Бельцевич // *Эндокринная хирургия.* – 2007. – № 1. – С. 3–11
60. Международная фармакопея. – Женева, 1990. – Т. 3. – с. 117
61. Державна Фармакопея України. – 1–е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – с. 368.
62. Державна Фармакопея України/ – 1–е вид. – Харків: РІРЕГ, 2001. – Доповнення 1. – 2004. – с. 284.
63. Шпак Л. В. Перспективность полярографического метода определения катехоламинов в крови / Л. В. Шпак // *Лаб. дело (Клин. лаб. диагностика).* – 1979. – № 5. – С. 292–297.

64. Осинская В. О. Данные об окислении адреналина, норадреналина, адреналона и норадреналона в флюоресцирующее соединение / В. О. Осинская // Биохимия. – 1953. – Т. 18, № 1. – С. 56–62.
65. Зиятдинова Г. К. Определение некоторых катехоламинов методами кулонометрического титрования и циклической вольтамперометрии / Г. К. Зиятдинова, Г. К. Будников // Журн. Аналит. Химии. – 2005. – Т. 60, № 7. – С. 753–758.
66. Матлина Э.Ш., Меньшиков В.В., Клиническая биохимия катехоламинов, Медицина, М., 1967, с. 110–122
67. Zhang X. H. Differential pulse adsorptive stripping voltammetry determination of epinephrine with  $\beta$ -mercaptoethanol self-assembled monolayers modified electrode / X. H. Zhang, S. F. Wang // Anal. Lett. – 2002. – Vol. 35, № 6. – P. 995–1006.
68. Raj C. R. Gold nanoparticle arrays for the voltammetric sensing of dopamine / C. R. Raj, T. Okajima, T. Ohsaka // J. Electroanal. Chem. – 2003. – V. 543, № 2. – P. 127–133.
69. Leite O. D. Determination of catecholamines in pharmaceutical formulations using a biosensor modified with a crude extract of fungi laccase (*Pleurotus ostreatus*) / O. D. Leite, O. Fatibello-Filho, A. M. Barbosa // Journal of the Brazilian Chemical Society. – 2003. – Vol. 14, № 2. – P. 297–303.
70. Leite O. D. Synergic effect studies of the bi-enzymatic system laccase–peroxidase in a voltammetric biosensor for catecholamines / O. D. Leite, K. O. Lupetti, O. Fatibello-Filho, I. C. Vieira, A. M. Barbosa. // Talanta. – 2003. – Vol. 59, Iss. 5. – P. 889–896.
71. Hernández P. Cyclic voltammetry determination of epinephrine with a carbon fiber ultramicroelectrode / P. Hernández, I. Sánchez, F. Patón, L. Hernández // Talanta – 1998. – Vol. 46, Iss. 5. – P. 985–991.
72. Шведене Н. В. Экстракционно–вольтамперометрическое определение катехоламинов с использованием растворителей нового класса – ионных жидкостей / Н. В. Шведене, М Ю. Немилова, К. С. Хачатрян, Н. А.

- Мамонов, А. В. Шухаев // Вестник Московского университета, серия 2, химия. – 2004. – Т. 45, № 5. – С. 324–332.
73. Dai S. Solvent extraction of strontium nitrate by a crown ether using room–temperature ionic liquids / S. Dai, Y. H. Ju, C. E. Barnes // *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* – 1999. – Iss. 8. – P. 1201–1202.
74. Dietz M. L. Ion–exchange as a mode of cation transfer into room–temperature ionic liquids containing crown ethers: implications for the ‘greenness’ of ionic liquids as diluents in liquid–liquid extraction / M. L. Dietz, J. A. Dzielawa // *Chem. Commun.* – 2001. – Iss. 20. – P. 2124–2125.
75. Smirnova S. V. Solvent extraction of amino acids into a room temperature ionic liquid with dicyclohexano–18–crown–6 / S. V. Smirnova, I. I. Torocheshnikova, A. A. Formanovsky, I. V. Pletnev. // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. – Vol. 378, № 5. – P. 1369–1375.
76. Назарова И. А. Использование гидрофобных производных борной кислоты для ионометрического определения полигидроксосоединений / И. А. Назарова, Н. В. Старушко, К. Н. Откидач, Н. В. Шведене, А. А. Формановский, И. В. Плетнев // Вестник Московского университета, серия 2, химия. – 2001. – Т. 42, № 1. – С. 33–39.
77. Matos R.C. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone / R. C. Matos, L. Angnes, M. C. U. Araujo, T. C. B. Saldanha // *Analyst.* – 2000. – Vol. 125. – P. 2011–2015.
78. Kang J. Electrochemiluminescence quenching as an indirect method for detection of dopamine and epinephrine with capillary electrophoresis / J. Kang, X.–B. Yin, X. Yang, E. Wang // *Electrophoresis.* – 2005. – Vol. 26, Iss. 9. – P. 1732–1736.
79. Карцова Л. А. Определение катехоламинов методами капиллярного электрофореза и обращено–фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л. А. Карцова, А. А. Сидорова, В. А. Казаков, Е. А. Бессонова // *Журн. Аналит. Химии.* – 2004. – Т. 59, № 8. – С. 826–831.

- 80.** Peterson Z. D. Determination of catecholamines and metanephrines in urine by capillary electrophoresis–electrospray ionization–time–of–flight mass spectrometry / Z. D. Peterson, D. C. Collins, C. R. Bowerbank, M. L. Lee, S. W. Graves // *J. Chromatogr. B.* – 2002. – Vol. 776, Iss. 2. – P. 221–229.
- 81.** Chen D.–C. Determination of urine catecholamines by capillary electrophoresis with dual–electrode amperometric detection / D.–C. Chen, D.–Z. Zhan, C.–W. Cheng, A.–C. Liu, C.–H. Chen // *J. Chromatogr. B.* – 2001. – Vol. 750, Iss. 1. – P. 33–39.
- 82.** Сидорова А. А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4– дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови / А. А. Сидорова, Л. А. Карцова // *Сорбционные и хроматографические процессы.* – 2009. – Т. 9, № 6. – С. 774–782.
- 83.** Volin P. Determination of free urinary catecholamines by high–performance liquid chromatography with electrochemical detection / P. Volin // *J. Chromatogr. B.* – 1994. – Vol. 655. – P. 121–126.
- 84.** Todoriki H. Sensitive high–performance liquid chromatographic determination of catecholamines in rat brain using a laser fluorimetric detection system / H. Todoriki, T. Hayashi, H. Naruse, A.Y. Hirakawa // *J. Chromatogr. B.* – 1983. – Vol. 276, № 1. – P. 45–54.
- 85.** Chen J. Determination of noradrenaline and dopamine in Chinese herbal extracts from *Portulaca oleracea* L. by high–performance liquid chromatography / J. Chen, Y.–P. Shi, J.–Y. Liu // *J. Chromatogr. A.* – 2003. – Vol. 1003, № 1–2. – P. 127–132.
- 86.** Nohta H. Spectrofluorimetric determination of catecholamines with 1,2–diphenylethylenediamine / H. Nohta, A. Mitsui, Y. Ohkura // *Anal. Chim. Acta.* – 1984. – Vol. 165. – P. 171–176.
- 87.** Yang J. Fluorimetric determination of epinephrine with o–phenylenediamine / J. Yang, G. Zhang, X. Wu, F. Huang, C. Lin, X. Cao, L. Sun, Y. Ding // *Anal. Chim. Acta.* – 1998. – Vol. 363, Iss. 1. – P. 105–110.

88. Осинская В. О. Исследование обмена адреналина и норадреналина в тканях животного организма / В. О. Осинская // Биохимия. – 1957. – Т. 22, № 3. – С. 536–545.
89. Бару А. М. Исследование катехоламинов в моче человека / А. М. Бару // Биохимия. – 1962. – Т. 27, № 2. – С. 260–265.
90. Горячковский А.М., Клиническая биохимия в лабораторной практике, 2005, с. 533–537.
91. Yao H. Flow–injection chemiluminescence determination of catecholamines based on their enhancing effects on the luminol–potassium periodate system / H. Yao, Y. Y. Sun, X. Lin, J. Cheng, L. Huang // Luminescence. – 2006. – Vol. 21, Iss. 2. – P. 112–117.
92. Du J. Flow injection chemiluminescence determination of epinephrine using epinephrine–imprinted polymer as recognition material / J. Du, L. Shen, J. Lu // Anal. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 489, Iss. 2. – P. 183–189.
93. Nicolajsen R. P. H. Quantifying catecholamines using multi–way kinetic modelling / R. P. H. Nicolajsen, K. S. Booksh, A. M. Hansen, R. Bro // Anal. Chim. Acta. – 2003. – Vol. 475, № 1–2. – P. 137–150.
94. Государственная Фармакопея СССР. – М.: Медицина, 1968. – с. 65.
95. Афхами А. Определение некоторых катехоламинов по реакции с перйодатом / А. Афхами, Х. А. Хатами // Журн. Аналит. Химии – 2003. – Т. 58, №2. – С.157–160.
96. Мелентьева Г.А., Антонова Л.А. Фармацевтическая химия. М.:Медицина, 1985. – 480 с.(271)
97. Palop S. G. Oxidation of adrenaline and noradrenaline by solvated molecular oxygen in a FIA assembly / S. G. Palop, A. M. Romero, J. M. Calatayud // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2002. – Vol. 27, Iss. 6. – P. 1017–1025.
98. Kirby D. P. A CE/ESI–MS interface for stable, low–flow operation / D. P. Kirby, J. M. Thorne, W. K. Götzinger, B. L. Karger. // Anal. Chem. – 1996. – Vol. 68. – P. 4451–4457.

- 99.** Determination of Catecholamines by Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry / L. A. Kartsova, E. A. Bessonova, A. A. Sidorova, V. A. Kazakov, et. All // *Russ. J. Applied Chem.* – Vol. 77, № 7. – P. 1150–1155.
- 100.** Gerard C. Stabilité de complexes métalliques avec des ligands d'intérêt biologique: la dopamine et l'adrénaline / C. Gerard, H. Chehhal // *Bull. Soc. Chim. Fr.* – 1997. – Vol. 134, № 10–11. – P. 1069–1074.
- 101.** Jameson R. F. The oxovanadyl(IV) catalysed oxidation of adrenaline by molecular oxygen / R. F. Jameson, T. Kiss. // *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* – 1986. – Iss. 9. – P. 1833–1838.
- 102.** Corona–Avenidaño S. Study on the stability of adrenaline and on the determination of its acidity constants / S. Corona–Avenidaño, G. Alarcón–Angeles, A. Rojas–Hernández, M. A. Romero–Romob, M. T. Ramírez–Silva // *Spectrochim. Acta. A.* – 2005. – Vol. 61, Iss 1–2. – P. 305–311.
- 103.** Lugasi A. The role of antioxidant phytonutrients in the prevention of diseases / A. Lugasi, J. Hovari, K. V. Sagi, L. Biro // *Acta Biologica Szegediensis.* – 2003. – Vol. 47. – P. 119–125.
- 104.** Ruder E. H. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility/ E. H. Ruder, T. J. Hartman, J. Blumberg, M. B. Goldman // *Human reprod. Update.* – 2008. – Vol.14, № 4. – P. 345–357.
- 105.** Fang Y. Z. Free radicals, antioxidants, and nutrition / Y. Z Fang, S. Yang, G. Wu // *Nutrition.* – 2002. – Vol. 18, № 10. – P. 872–879.
- 106.** Stanner S. A. A review of the epidemiological evidence for the 'antioxidant hypothesis' / S. A. Stanner, J. Hughes, C.N. Kelly, J. Buttriss // *Public Health Nutr.* – 2004. – Vol. 7, Iss. 3. – P. 407–422.
- 107.** Shenkin A. The key role of micronutrients / A. Shenkin // *Clin Nutr.* – 2006. – Vol. 25, Iss. 1. – P. 1–13.
- 108.** Jacques P. F. Epidemiologic evidence of a role for the antioxidant vitamins and carotenoids in cataract prevention / P. F. Jacques, L. T. Chylack // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1991. – Vol. 53, № 1. – P. 352S–355S.

- 109.** Block G. Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence / G. Block, B. Patterson, A. Subar // *Nutr. Cancer.* – 1992. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 1–29.
- 110.** Huang D. The chemistry behind antioxidant capacity assays / D. Huang, B. Ou, R. L. Prior // *J. Agric. Food Chem.* – 2005. – Vol. 53, № 6. – P. 1841–1856.
- 111.** Choi S. W. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress / S. W. Choi, I. F. F. Benzie, A. R. Collins, B. M. Hannigan, J. J. Strain // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* – 2004. – Vol. 551, Iss. 1–2. – P. 109–117.
- 112.** [http://reposit.lib.kumamoto.ac.jp/bitstream/2298/2509/5/21\\_120\\_004.pdf](http://reposit.lib.kumamoto.ac.jp/bitstream/2298/2509/5/21_120_004.pdf).
- 113.** Курбанов А. И. Антиоксидантные ферменты микроорганизмов: патогенетическая значимость и перспективы использования в медицине / А. И. Курбанов // *Инфекционные болезни.* – 2008. – № 2. – С. 105–109.
- 114.** Fridovich I. Superoxide anion radical ( $O_2^{\cdot -}$ ), superoxide dismutases, and related matters / I. Fridovich // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol. 272, № 30. – P. 18515–18517.
- 115.** Shea T. B. Quantification of antioxidant activity in brain tissue homogenates using the “total equivalent antioxidant capacity” / T. B. Shea, E. Rogers, D. Ashline, D. Ortiz, M.–S. Sheu // *J. Neurosci. Methods.* – 2003. – Vol. 125, Iss. 1–2. – P. 55–58.
- 116.** Buijnsters M. Evaluation of antioxidative activity of some antioxidants by means of a combined optothermal window and a DPPH\* free radical colorimetry / M. Buijnsters, D. Bicanic, M. Chirtoc, M. C. Nicoli, Y. Min–Kuo // *Anal. Sci.* – 2001. – Vol. 17. – P. S544 – S546.
- 117.** Benzie I. F. F. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of «antioxidant power»: the FRAP assay / I. F. F. Benzie, J. J Strain // *Anal. Biochem.* – 1996. – Vol. 239. – P. 70–76.
- 118.** Krasovska A. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds / A. Krasovska, D.

Rosiak, K. Czkaпiak, M. Lukaszewicz // Current topics in Biophysics. – 2000. – Vol. 24. – P. 89–95.

- 119.** Фотохемилюминесценция как метод изучения антиоксидантной активности в биологических системах. Математическое моделирование / Д. В. Магин, Д. Ю. Измайлов, И. Н. Попов, Г. Левин, и др. // Вопросы мед. химии. – 2000. – Т. 4. – С. 65–68.
- 120.** Evaluation of the antioxidant activity of different flavonoids by the chemiluminescence method / S. R. Georgetti, R. Casagrande, V. M. Di Mambro, A. Azzolini, et all // AAPS Pharm Sci. – 2003. – Vol. 5, № 2. – P. 111–115.
- 121.** A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability / A. Ghiselli, M. Serafini, G. Maiani, E. Azzini, et all // Free Radical Biol. Med. – 1995. – Vol. 18, Iss. 1. – P. 29–36.
- 122.** Ehlenfeldt M. K. Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and phenolic and anthocyanin concentrations in fruit and leaf tissues of highbush blueberry / M. K. Ehlenfeldt, R. L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 2001. – Vol. 49, № 5. – P. 2222–2227.
- 123.** Yang X. F. Fe(II)–EDTA chelate–induced aromatic hydroxylation of terephthalate as a new method for the evaluation of hydroxyl radical–scavenging ability / X. F. Yang, X. Q. Guo // Analyst. – 2001. – Vol 126. – P. 928–932.
- 124.** Korotkova E. I. Study of antioxidant properties by voltammetry / E. I. Korotkova, Y. A. Karbainov, A. V. Shevchuk // J. Electroanal. Chem. – 2002. – Vol. 518, № 1. – P. 56–60.
- 125.** Yang B. Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials / B. Yang, A. Kotani, K. Arai, F. Kusu // Anal. Sci. – 2001. – Vol. 17, № 5. – P. 599–604.
- 126.** Determination of total antioxidant capacity in plasma by cyclic voltammetry. Two case reports / J. Psotová, J. Zahálková, J. Hrbáč, V. Šimánek, et. All // Biomed. Papers. – 2001. – Vol. 145, № 2. – P. 81–83.

127. Хасанов В. В. Методы исследования антиоксидантов / В. В. Хасанов, Г. Л. Рыжова, Е. В. Мальцева. // Химия растительного сырья. – 2004. – № 3. – С. 63–75.
128. Kalt W. Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits / W. Kalt, C. F. Forney, A. Martin, R. L. Prior // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 11. – P. 4638–4644.
129. HPLC method for the quantification of procyanidins in cocoa and chocolate samples and correlation to total antioxidant capacity / G. E. Adamson, S. A. Lazarus, A. E. Mitchell, R. L. Prior, et. all // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 10. – P. 4184–4188.
130. Wang S. Y. Antioxidant capacity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage / S. Y. Wang, H.–S. Lin // J. Agric. Food Chem. – 2000. – Vol. 48, № 2. – P. 140–146.
131. Leong L. P. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets / L. P. Leong, G. Shui // Food Chem. – 2002. – Vol. 76, № 1. – P. 69–75.
132. «In vitro» evaluation of the antioxidant activity and biomembrane interaction of the plant phenols oleuprotein and hydroxytyrosol / A. Saija, D. Trombetta, A. Tomaino, R. Lo Cascio, et. all // Int. J. Pharm. – 1998. – Vol. 166. – P. 123–133.
133. Larrauri J. A. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red Spanish wines / J. A. Larrauri, C. Sanchez–Moreno, P. Ruperez, F. Saura–Calixto // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 4. – P. 1603–1606.
134. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juices / P. Rapisarda, A. Tomaino, R. Lo Cascio, F. Bonina, et. all // J. Agric. Food Chem. – 1999. – Vol. 47, № 11. – P. 4718–4723.
135. Bandoniene D. On–line HPLC–DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.) / D. Bandoniene, M. Murkovic // J. Agric. Food Chem. – 2002. – Vol. 50, № 9. – P. 2482–2487.

- 136.** Benzie I. F. F. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay / I. F. F. Benzie, Y. T. Szeto // *J. Agric. Food Chem.* – 2001. – Vol. 47, № 2. – P. 633–636.
- 137.** Jamroz A. Antioxidant capacity of selected wines / A. Jamroz, J. Beltowski // *Med. Sci. Monit.* – 2001. – Vol. 7, № 6. – P. 1198–1202.
- 138.** Apak R. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine CUPRAC method / R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurec, S. E. Karademir // *J. Agric. Food Chem.* – 2004. – Vol. 52, № 26. – P. 7970–7981.
- 139.** The cupric ion reducing antioxidant capacity and polyphenolic content of some herbal teas / R. Apak, K. Guclu, M. Ozyurec, S. E. Karademir, et. all // *J. Food Sci. Nutr.* – 2006. – Vol. 57, № 5–6. – P. 292–304.
- 140.** Alonso A. Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content / A. Alonso, C. Dominguez, D. A. Guillen, C. Barroso // *J. Agric. Food Chem.* – 2002. – Vol. 50, № 11. – P. 3112–3115.
- 141.** Leamsomrong K. Flow injection analysis system for the determination of total phenolic compounds by using Folin-Ciocalteu assay / K. Leamsomrong, M. Suttajit, P. Chantiratikul // *Asian J. Applied Sci.* – 2009. – Vol. 2, № 2. – P. 184–190.
- 142.** Моросанова Е. И. Индикаторные порошки на основе модифицированных ксерогелей для твердофазно-спектрофотометрического и тест-определения аскорбиновой кислоты и гидразинов / Е. И. Моросанова, Е. А. Резникова, А. А. Великородный // *Журн. аналит. химии.* – 2001. – Т. 56, № 2. – С. 195–200.
- 143.** Моросанова Е. И. Ксерогели, модифицированные фосфорномолибденовыми гетерополисоединениями. Индикаторные трубки и порошки для определения гидразинов в растворах / Е. И. Моросанова, А. А. Великородный, Е. А. Резникова, Н. М. Кузьмин // *Журн. аналит. химии.* – 2000. – Т. 55, № 4. – С. 423–429.

- 144.** An antimony(V) substituted Keggin heteropolyacid, H<sub>4</sub>PSbMo<sub>11</sub>O<sub>40</sub>: Why is its catalytic activity in oxidation reactions so different from that of H<sub>4</sub>PVMo<sub>11</sub>O<sub>40</sub>? / H. Goldberga, D. Kumarb, G. N. Sastryb, G. Leitusc, [et al.] // *J. Mol. Catal. A: Chem.* – 2004. – Vol. 356. – P. 152–157.
- 145.** Запорожець О. А. Твердофазний реагент на основі молібдофосфорної гетерополікислоти для сорбційно-спектроскопічного визначення аскорбінової кислоти / О. А. Запорожець, Л. С. Іванько, І. А. Качан // *Вопросы химии и хим. технологии.* – 2005. – № 1. – С. 9–13.
- 146.** Качан І. А. Визначення органічних відновників іммобілізованою на силікагелі фосфорномолібденовою гетерополікислотою / І. А. Качан, Л. С. Іванько, О. А. Запорожець // *Магістеріум "Природничі науки".* – Київ: видавничий дім "Києво-Могилянська академія". – 2006. – Вип. 24. – С. 51–53.
- 147.** Дмитриенко С. Г. Сорбционно-фотометрическое определение аскорбиновой кислоты с помощью гетерополикислот, иммобилизованных на пенополиуретане / С. Г. Дмитриенко, Л. В. Гончарова // *Журн. аналит. химии* – 1998. – Т. 53. – № 9. – С. 914–918.
- 148.** Вода. Индикаторные системы / [В. М. Островская, О. А. Запорожец, Г. К. Будников, Н. М. Чернавская]; под ред. Ю. А. Арского. – М.: ВИНТИ РАН, ЭКОНИКС, 2002. – 256 с.
- 149.** Индикаторная бумага для определения аскорбиновой кислоты: А. с. 224488 ЧССР. МКИ G 01 N 31/22/ Svoboda V., Pulkrabkova J. – № 5325/81; Заявл. 10.07.81; Опубл. 15.02.86.
- 150.** Marchenko D., Velikodny A., Reznikova E. Et al. // *Abstracts of Intern. Congr. on Anal. Chem.* – Vol. 2. – Moscow (Russia). – 1997. – P. K–15
- 151.** Марченко Д. Ю. Индикаторные трубки для определения восстановителей в растворе / Д. Ю. Марченко, Е. И. Моросанова, Н. М. Кузьмин, Ю. А. Золотов // *Журн. аналит. химии.* – 1997. – Т. 52, № 12. – С. 1287–1291.
- 152.** Zaporozhets O. A. A new test method for the evaluation of total antioxidant activity of herbal products / O. A. Zaporozhets, O. A. Krushynska, N. A.

- Lipkovska, V. N. Barvinchenko // J. Agric. Food Chem. – 2004. – Vol. 52. – P. 21–25.
- 153.** Запорожець О. А. Комбіноване спектроскопічне і тест–визначення інтегральних показників якості препаратів з антиоксидантною активністю / О. А. Запорожець, О. А. Крушинська // Магістеріум "Природничі науки". – Київ: видавничий дім "Києво–Могилянська академія", 2005. – Вип.16. – С.63–66.
- 154.** Крушинська О. А. Тест–оцінка антиоксидантної активності червоних вин / О. А. Крушинська, О. А. Запорожець // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Сер. "Хімія". – 2005. – Т.41. – С. 21–23.
- 155.** Запорожець О. А. Застосування твердофазного редокс–реагенту для тест–оцінки загальної антиоксидантної активності рослинних об'єктів / О. А. Запорожець, О. А. Крушинська, Н. О. Ліпковська, В. М. Барвінченко // Фармаком. – 2006. – №1/2. – С. 51–58.
- 156.** Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических веществ. М.: Химия, 1975. – 360 с., С. 246
- 157.** Лурье Ю. Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод / Лурье Ю. Ю. – М.: Химия, 1984. – 448 с.
- 158.** Методы анализа чистых химических реактивов / [Чупахин Н. С., Сухановская А. И., Красильщик В. З. и др.]. – М.: Химия, 1984. – 280 с.
- 159.** Запорожец О. А. Имобилизованные аналитические реагенты. Обзор / О. А. Запорожец, О. М. Гавер, В. В. Сухан // Успехи химии. – 1997. – Т. 66, № 7. – С. 702–712.
- 160.** Модифицированные кремнеземы в сорбции, катализе и хроматографии / [Лисичкин Г. В., Кудрявцев Г. В., Сердан А. А. и др.] ; под ред. Г. В. Лисичкина. – М.: Химия, 1986. – 248 с.
- 161.** Тертых В. В. Химические реакции с участием поверхности кремнезема / В. В. Тертых, Л. А. Бел якова. – К. : Наукова думка, 1991. – 264 с.

- 162.** Дмитриенко С. Г. Пенополиуретаны в химическом анализе: сорбция различных веществ и ее аналитическое применение (Обзор) / С. Г. Дмитриенко, Ю. А. Золотов // Успехи химии. – 2002. – Т. 71, № 2. – С. 180–197.
- 163.** Писарева В. П. Фильтры для концентрирования элементов из растворов / В. П. Писарева, Г. И. Цизин, Ю. А. Золотов // Журн. аналит. химии. – 2004. – Т. 59, № 10. – С. 1014–1032.
- 164.** Запорожець О. А. Адсорбовані на кремнеземах органічні реагенти у комбінованих спектроскопічних і тест-методах аналізу / О. А. Запорожець // Наукові записки Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2004. – Т. XIV. Хімічний факультет. – С. 118–128.
- 165.** Айлер Р. Химия кремнезема: в 2 т. / Р. Айлер ; пер. с англ. – М: Мир, 1982. – 1982. – Т. 2. – 1127 с.
- 166.** Іщенко О.В. Мас-спектрометрія: Навчальний посібник для магістрів хімічного факультету. – К.: ВЦ «Київський університет», 1999. – 46 с.
- 167.** Svetanovic R. J. Temperature programmed desorption technique for investigation of practical catalysts / R. J. Svetanovic, Y. A. Amenomiya // Catal. Rev. – 1972. – Vol. 6. – P. 21 – 49.
- 168.** Рунов В. К. Оптические сорбционно–молекулярно–спектроскопические методы анализа. Методические вопросы количественных измерений в спектроскопии диффузного отражения / В. К. Рунов, В. В. Тропина // Журн. аналит. химии. – 1996. – Т. 51, № 1. – С. 71–77.
- 169.** Золотов Основы аналитической химии. М.: Высшая школа, 2002 Т. 2 С. 495
- 170.** Брыкина Т. Д. Твердофазная спектрофотометрия / Т. Д. Брыкина, Л. С. Крысина, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 1988. – Т. 43, № 9. – С. 1547–1560.
- 171.** Кириллов Е. А. Цветоведение / Е. А. Кирилов. – М.: Легпромбытиздат, 1987. – 128 с.

172. CIE Colorimetry Committee – Working Program on Color Differences // Journ. Opt. Soc. of America. – 1974. – Vol. 64, № 6. – P. 896–897.
173. Морозко С. А. Тест–методы в аналитической химии. Раздельное определение меди и цинка / С. А. Морозко, В. М. Иванов // Журн. аналит. химии. – 1997. – Т. 52, № 8. – С. 858–865.
174. Khan A. S. Phosphate determination by use of molybdoantimonylphosphoric acid and polyurethane foam / A. S. Khan, A. Chow // Talanta. – 1985. – Vol. 32, № 3. – P. 241–243.
175. Цыганок Л. П. Гетерополианионы структуры Кеггина – аналитические формы с регулируемыми свойствами в физико–химических методах анализа / Л. П. Цыганок // Журн. аналит. химии. – 1992. – Т. 47. – № 7. – С. 1184–1199.
176. Поп М. Т. Гетерополи- и изополиметаллаты. – Новосибирск: Наука, 1990. – 232 с.
177. Вишнікіна О. В. Непряме визначення Фосфору у вигляді гетерополікомплексів з використанням екстракційного та сорбційного розділення: Автореф. дис ... канд. хім Наук: 00.00.00 / УДХТУ. – Дніпропетровськ, 2006. – 20 с.
178. Твердофазні аналітичні реагенти на основі іммобілізованих на кремнеземах гетерополікислот та їх іонних асоціатів / О. А Запорожець, І. А. Качан, Л. С. Зінько, Ю. П. Євлаш (Бас), та ін. // Вісник Харківського національного університету. Хімія. вип. 15(38). – 2007. – № 770 – С. 155–162
179. R. I. Maksimovskaya, G. M. Maksimov.  $^{95}\text{Mo}$  and  $^{17}\text{O}$  NMR Studies of Aqueous Molybdate Solutions // Inorg. Chem., Vol. 46, No. 9, 2007 – 3688–3695.
180. I.V. Kozhevnikov, A. Sinnema and H. van Bekkum. Proton sites in Keggin heteropoly acids from  $^{17}\text{O}$  NMR // Catalysis Letters 34 (1995) 213–221.

- 181.** S. M. Kulikov, O. M. Kulikova, R. I. Maksimovskaya and I. V. Kozhevnikov. Methods of preparing the heteropolyacid  $H_3PW_{12}O_{40}$  // Russian Chemical Bulletin. Inorganic chemistry. Volume 39, Number 9 (1990), P. 1763–1766
- 182.** Pope M. T. Heteropoly and Isopoly Oxometalates. Berlin: Springer, 1983.
- 183.** M. A. Fedotov and R. I. Maksimovskaya. NMR structural aspects of the chemistry of V, Mo, W polyoxometalates // Journal of Structural Chemistry Volume 47, Number 5 (2006), 952–978
- 184.** Wadelin C., Mellon M.G. Extraction of heteropoly acids. Application to determination of phosphorus. *Analyt. Chem.*, 1953, v. 25, N II, p. 1668–1673.
- 185.** Алимарин И. П., Судаков Ф. П., Клитина В. И. Экстракция гетерополисоединений и ее применение в неорганическом анализе. *Успехи химии*. Т. 34, № 8, 1965, С. 1368–1387
- 186.** O. A. Kholdeeva and I. V. Kozhevnikov. Kinetics and mechanism of replacement of W(VI) in the heteropolyanion  $PW_{12}O_{40}^{3-}$  // Russian Chemical Bulletin. Physical Chemistry. Volume 35, Number 1 (1986), 22–28
- 187.** Запорожець О.А. Адсорбовані на кремнеземах органічні реагенти у комбінованих спектроскопічних і тест-методах аналізу: Дис. ... доктора хім. наук. 02.00.02; захищена 09.06.2003, – К., 2003. – 284 с.
- 188.** Чуйко А. А., Горлач Ю. И. Химия поверхности кремнезема. Строение поверхности, активные центры, механизмы сорбции. – К.: Наукова думка, 1992. – 247 с.
- 189.** Качан І.А. Дис. ... кандидата хім. Наук. 02.00.02; захищена 23.06.2008, – К., 2008. – 160 с.]
- 190.** Адсорбция из растворов на поверхности твердых тел / [под ред. Г. Парфит, К. Рочестер ; пер с англ . Б. Н. Тарасевича] – М.: Мир, 1986. – 488 с. – 13 с
- 191.** Llaveró M. P. Improved trihydroxyindole method for the simultaneous stopped-flow spectrofluorimetric determination of epinephrine and norepinephrine in urine / M. P. Llaveró, S. Rubio, A. Gomez-Hens, D. Perez-Bendito // *Anal. Chim. Acta.* – 1990. – Vol. 229. – P. 27–33.

- 192.** Nikolajsen R. P. H. Analytical methods for determining urinary catecholamines in healthy subjects / R. P. H. Nikolajsen, A. M. Hansen // *Anal. Chim. Acta.* – 2001. – Vol. 449, Iss. 1–2, – P. 1–15.
- 193.** Fully automated high–performance liquid chromatographic assay for the analysis of free catecholamines in urine / R. Said, D. Robinet, C. Barbier, J. Sartre, et. al // *J. Chromatogr.* – 1990. – Vol. 530. – P. 11–18.
- 194.** Cañizares P. On–line coupling of isolation/in situ concentration integrated with derivative synchronous spectrofluorimetry for the simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in urine / P. Cañizares, M. D. Luque de Castro. // *Anal. Chim. Acta.* – 1995. – Vol. 317, Iss. 1–3. – P. 335–341.
- 195.** Kubo H. In–line derivatization method for fluorometric determination of catecholamines by high performance liquid chromatography / H. Kubo, Y. Umiguchi, T. Kinoshita // *Chromat.* – 1994. – Vol. 38, № 9–10. – P. 591–594.
- 196.** <http://www.piluli.kharkov.ua/drugs/drug/219/>
- 197.** Lee Z. S. K. Simultaneous measurement of catecholamines and kallikrein in urine using boric acid preservative / Z. S. K. Lee, J. A. J. H. Critchley // *Clin. Chim. Acta.* – 1998. – Vol. 276, Iss. 1. – P. 89–102.
- 198.** Г. Л. Шлефер. Комплексообразование в растворах. Методы определения состава и констант устойчивости комплексных соединений в растворах. Перевод с немецкого М. И. Гельфмана, под. Ред. А. А. Гринберга – М: Химия, 1964 379 с.
- 199.** Berg D. Redox imbalance / D. Berg, M. B. H. Youdim, P. Riederer // *Cell Tissue Res.* – 2004. – Vol. 318. – P. 201–213.
- 200.** Wen X.-L. Micellar effects on the electrochemistry of dopamine and its selective detection in the presence of ascorbic acid / X.-L. Wen, Y.-H. Jia, Z.-L. Liu // *Talanta.* – 1999. – Vol. 50, Iss 5. – P. 1027–1033.
- 201.** Sun Y.-X. Simultaneous determination of epinephrine and ascorbic acid at the electrochemical sensor of triazole SAM modified gold electrode / S.-F. Wang, X.-H. Zhang, Y.-F. Huang // *Sensors and Actuators B.* – 2006. – Vol. 113, Iss. 1. – P. 156-161.

- 202.** Ма В. Электрохимические свойства допамина и эpineфрина и их определение при совместном присутствии с помощью электрода, модифицированного поли(-метионином) / В. Ма, Д. М. Сун // Электрохимия. – 2007. – Т. 43, № 12. – С. 1463-1470.
- 203.** Георгиевский В. П., Гризодуб А. И. Стандартизация и контроль качества лекарств. //Вкн.: Технология и стандартизация лекарств. Сб. научн. трудов. – Харьков: ООО «РИРЕГ», 1996. – 784 с.
- 204.** Норма в медицинской практике. Справочное пособие / под ред. А. В. Литвинова, – М.: МЕДпресс-информ. – 2004. – 145 с.
- 205.** Детская гинекология. Справочник / Сост.: Л. Б. Маркин, Э. Б. Яковлева. – К.: Знание, 2004. – 476 с
- 206.** Сидорова А.А., Карцова Л.А. Хроматографическое и электрофоретическое определение катехоламинов, метанефринов и 3,4-дигидроксифенилаланина в моче и плазме крови / Сидорова А.А., Карцова Л.А. // Сорб.и хромат. процессы. 2009. Т. 9. Вып. 6 с. 774–782.
- 207.** Brondani D. Biosensor based on platinum nanoparticles dispersed in ionic liquid and laccase for determination of adrenaline / D. Brondani, C. W. Scheeren, J. Dupont, I. C. Vieira // Sensors and Actuators B: Chem. – 2009. – Vol. 140. – P. 252–259
- 208.** Беліков В. .В. Кількісне спектрофотометричне визначення кверцетину в лікарських препаратах / В. .В. Беліков, Т. В. Точкова // Фарм. журн. – 1973. – №5. – С.40–44.
- 209.** Беда О. Використання мас-спектрометричних досліджень для з'ясування стану поверхневого шару гетерогенних каталізаторів / О. Беда, О. Іщенко, С. Гайдай // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Хімія. – 2008. – Т. 75, № 5. – С. 48–52.
- 210.** Туров В. В. Взаимодействие нерастворимых в воде солей четвертичных аммониевых оснований с поверхностью гидратированного кремнезема / В. В. Туров, О. А. Запорожец, О. Ю. Наджафова, В. В. Сухан // Теорет. и эксперим. химия. – 1998. – Т. 32, № 6. – С. 376–379.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

- 1А. Запорожець О.А. Immobilization of molybdo-phosphoric, molybdo-antimono-phosphoric and molybdo-silicic heteropoly acids onto silica via adsorption / Запорожець О.А., Качан І.А., Зінько Л.С., **Бас Ю. П.** // Вісник Харків. нац. ун-ту. Сер. Хімія. – 2008. – Вип. 16(39), № 820 – С. 183–187.
- 2А. Interaction of molybdo-phosphoric and molybdo-antimono-phosphoric heteropoly acids with silica gels modified with aliphatic and heterocyclic quaternary ammonium salts / O. A. Zaporozhets, I. A. Kachan, L. S. Zinko, **J. P. Bas** [et. al] // Adsorption Scie. Technol. – 2011. – Vol. 29, № 3. – P. 319–330.
- 3А. Solid-phase spectrophotometric and test determination of silicate in natural water / O. A. Zaporozhets, **J. P. Bas**, I. A. Kachan, [et. al] // Talanta. – 2012, Vol 90. – P. 85–90.
- 4А. Запорожець О. А. Імобілізований реактив Фоліна для оцінки вмісту поліфенолів у фітопрепаратах / О. А. Запорожець, **Ю. П. Бас**, М. В. Петрух // Вопросы химии и хим. технологии. – 2012. – № 5. – С. 105–109.
- 5А. **Бас Ю. П.** Змішана молібдофосфорностибієва ГПК як твердофазний аналітичний реагент для визначення катехоламінів / Ю. П. Бас, О. А. Запорожець // Вісник Черкаського ун-ту. – 2013. – Т. 267, № 14. – С. 19–25.
- 6А. Спосіб визначення залального вмісту поліфенолів. Патент України на винахід № 101250. МПК G01N 21/63, C07C 39/00, C07C 39/12 / О. А. Запорожець, **Ю. П. Бас**, М.В. Петрух. № а2011 10127; заявлено 16.08.2011; надруковано 11.03.2013, Бюл. № 5. 6 с.
- 7А. Спосіб оцінки залального вмісту поліфенолів тест-методом. Патент України на винахід № 101251. МПК G01N 21/63, C07C 39/00, C07C 39/12 / О. А. Запорожець, **Ю. П. Бас**, М.В. Петрух. № а2011 10128; заявлено 16.08.2011; надруковано 11.03.2013, Бюл. № 5. 5 с.
- 8А. Петрух М. В. Імобілізований на силікагелі реактив Фоліна для оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів та харчових біодобавок / М.

- В. Петрух, **Ю. П. Бас**, О. А. Крушинська // Зб. текстів виступів на X Всеукр. наук. конф. студ. і асп. [“Сучасні проблеми хімії”] (Київ, 18–19 травня 2009 р.) / Київський нац. ун–т ім. Тараса Шевченка. – К., 2009. – С. 166.
- 9А.** Манчук В. В. Імобілізована на силікагелі молібдостибієвофосфорна гетерополікислота для оцінки антиоксидантної активності / В. В. Манчук, **Ю. П. Бас**, О. А. Запорожець // Зб. текстів виступів на XI Всеукр. наук. конф. студ. і асп. [“Сучасні проблеми хімії”] (Київ, 18–19 травня 2010 р.) / Київський нац. ун–т ім. Тараса Шевченка. – К., 2010. – С. 176.
- 10А.** Крушинська О. А. Оцінка антиоксидантної активності фітопрепаратів та харчових біодобавок імобілізованими гетерополікислотами / Крушинська О.А., **Бас Ю.П.**, Петрух М.В., [та ін.] // Зб. текстів виступів на 76-ій наук. конф. молодих учених, асп. і студ. [«Наукові здобутки молоді – вирішенню проблем харчування людства у ХХІ столітті» ] (Київ, 12–13 квітня 2010 р.) / Київський нац. ун–т харч. тех. – К.: НУХТ, 2010. – с. 141
- 11А.** Запорожець О. А. Твердофазні реагенти на основі імобілізованих гетерополікислот для визначення поліфенолів і аскорбінової кислоти / Запорожець О.А., **Бас Ю.П.**, Петрух М.В., Манчук В.В. // Зб. текстів виступів на VIII Всеукраїнській конференції молодих вчених студентів та аспірантів з актуальних питань хімії (Конференція присвячується 55-річчю НТК «Інститут монокристалів» НАН України), (Харків, 11–14 травня 2010р.) / НТК «Інститут монокристалів», Харківський нац. ун-т ім. В.Н. Каразіна. – Харків, 2010. – с. 7
- 12А.** **Бас Ю.П.** Імобілізований на силікагелі реактив Фоліна для визначення загального вмісту органічних відновників у фітопрепаратах та напоях / Бас Ю.П., Петрух М.В., Запорожець О.А. // Зб. текстів виступів на Третій всеукраїнській науково-практичній конференції [«Вода: проблеми та шляхи вирішення»] (Житомир, 21–22 грудня 2010 р.) / Житомирський нац. агроекономічний ун-т. Житомир, 2010. – с. 75

- 13А.Бас Ю. П.** Імобілізований на силікагелі реактив Фоліна для оцінки антиоксидантної активності фітопрепаратів та харчових біодобавок / Ю. П. Бас, М. В. Петрух, О. А. Запорожець // Зб. текстів виступів на XII Всеукр. наук. конф. студ. і асп. [“Сучасні проблеми хімії”] (Київ, 18–20 травня 2011 р.) / Київський нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2011. – С. 174.
- 14А.Бас Ю. П.** Імобілізований на силікагелі гетерополікислоти як аналітичні реагенти для визначення органічних відновників / Ю. П. Бас, М. В. Петрух, В. В. Манчук, О. А. Запорожець // Зб. текстів виступів 13-й науковій конференції [“Львівські хімічні читання-2011”] (Конференція приурочена 350-річчю Львівського нац. ун-ту ім. І. Франка), (Львів, 28 травня – 1 червня 2011 р.) / Львівський нац. ун-т ім. І. Франка. – Львів, 2011. – с. А3.
- 15А.Zaporozhets O.A.** Determination of organic reductants in phytomedication and beverages using Folin reagent immobilized on silica gel / O. A. Zaporozhets, **J. P. Bas**, M. V. Petrukh // Book of abstr. of 6-th International Chemistry Conference Toulouse-Kiev. – Toulouse, France, 2011. – P34.
- 16А.Манчук В. В.** Визначення катехоламінів іммобілізованою на силікагелі фосфорною гетерополікислотою / В. В. Манчук, **Ю. П. Бас**, О. А. Запорожець // Зб. текстів виступів на XIII Всеукр. наук. конф. студ. і асп. [“Сучасні проблеми хімії”] (Київ, 24–26 квітня 2012 р.) / Київський нац. ун-т ім. Тараса Шевченка. – К., 2012. – С. 163.

## Додаток А

Таблиця А. 1

Енергії термодесорбції для частинок адсорбованого (імпрегнованого)  
ТДАН та його його іонних асоціатів з ГПК

Зразок	Часточка	Mr, часточки	T <sub>max</sub> , °C	ε	E <sub>активації</sub> , кДж/моль	
ТДАН–СГ (адсорб.)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> •	69	204	24	96	
			462	22	136	
	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	204	25	100	
			462	23	141	
	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> •	83	205	20	80	
			464	22	132	
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84	206	23	93	
			464	23	142	
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> •	97	207	24	94	
			466	24	146	
	ТДАН–СГ (імпрег.)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> •	69	177	18	66
				378	15	80
C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>		70	168	22	81	
			378	16	85	
C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> •		83	168	20	73	
			387	16	86	
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>		84	168	19	69	
			370	11	57	
C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> •		97	169	19	71	
			371	10	55	
ІА–СГ (імпрег.)		C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> •	69	284	24	111
		C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	284	22	104
	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> •	83	283	24	109	
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84	286	23	108	
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> •	97	288	24	111	
ІА–СГ (адсорб.)	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> •	69	264	21	92	
	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	264	20	91	
	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> •	83	266	21	92	
	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub>	84	266	21	93	
	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> •	97	268	20	90	

Додаток Б  
Результати розрахунків складу комплексу адреналіну з татраборатом  
натрію методом Бенга і Френча

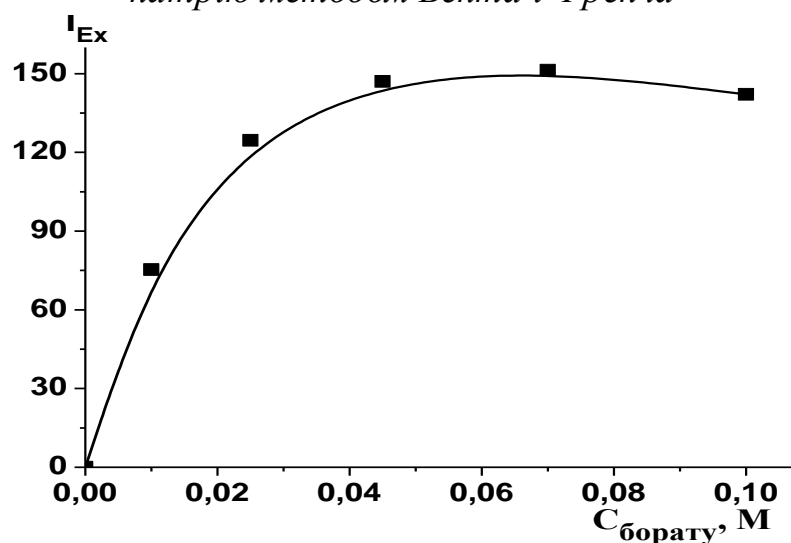


Рис. Б.1. Крива зсуву рівноваги для визначення складу комплексу адреналіну з татраборатом натрію.

Таблиця Б.1

Вихідні дані для розрахунку складу комплексу.

$C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7),$ моль/л	$I_{500}^{\text{Em}}$	$\lg$ $C(\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7)$	$\frac{I_i}{I_n - I_i}$	$\lg \frac{I_i}{I_n - I_i}$
0,0013	11,594	-2,886	0,083	-1,081
0,0021	18,397	-2,678	0,138	-0,859
0,0030	25,030	-2,523	0,198	-0,703
0,0046	37,756	-2,337	0,333	-0,478
0,0061	50,232	-2,215	0,497	-0,304

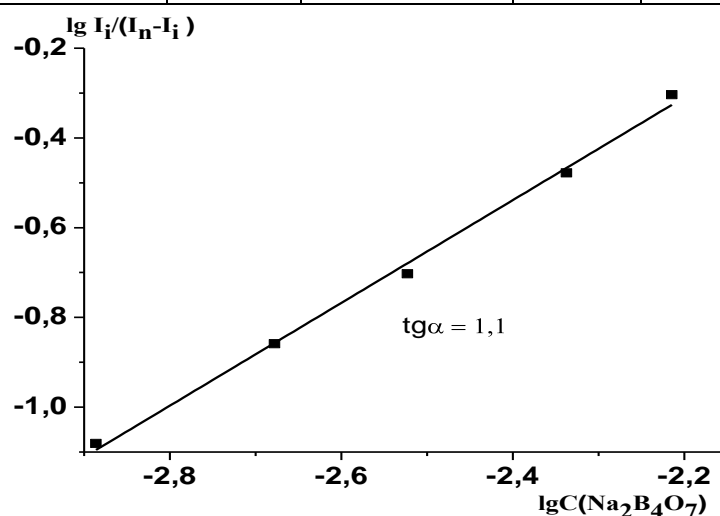


Рис. Б.2. Логарифмічна залежність для визначення складу ГПК2 методом Бенга і Френча.

## Додаток В

Таблиця В.1

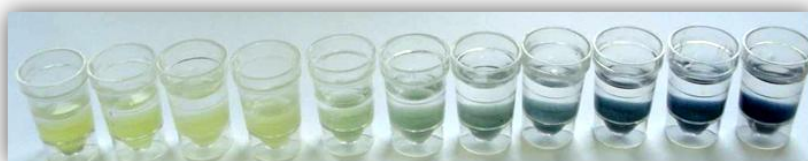
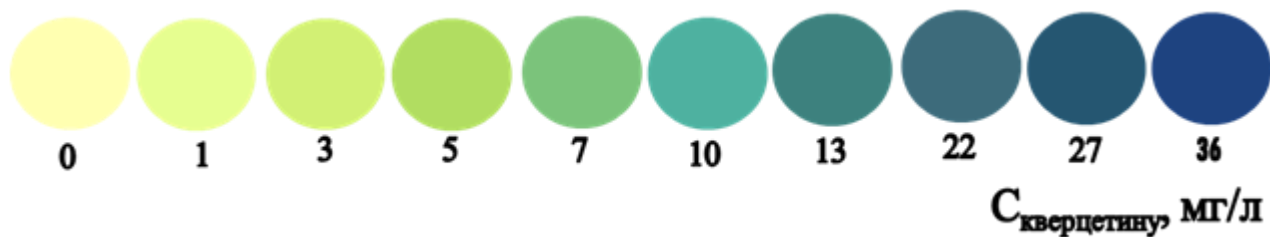
**Характеристика сечі здорової людини**

Добова норма	Чоловіки: 800-1800 мл Жінки: 600-1600 мл
Відносна густина	1008-1026
pH	Нейтральне, слабкокисле, слабко лужне: 6,25±0,36 (4,5-8,0)

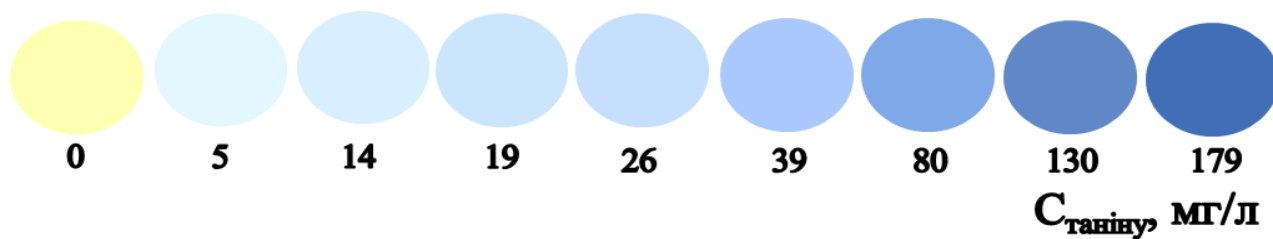
<b>Основний склад сечі здорової людини</b>	
Білок	Відсутній або сліди (25-75 мг/добу)
Цукор	Не більше 0,02 %
Кетонові тіла	Не більше 50 мг/добу
Уробілінові тіла	Не більше 6 мг/добу
Аміак	0–1,6 г/добу
Порфобіліноген	До 2 мг/л
Креатинін	4,42–17,6 ммоль/добу
Сечовина	330–580 ммоль/л
Сечова кислота	2,4–6,0 ммоль/добу
Na <sup>+</sup>	До 340 ммоль/добу
K <sup>+</sup>	39–91 ммоль/добу
Ca <sup>2+</sup>	0,25–4,99 ммоль/добу
Mg <sup>2+</sup>	До 0,41 ммоль/добу
Ртуть	До 50 нмоль/л
Fe(II, III)	0–2 мг/добу
Cl <sup>-</sup>	99,1–297,3 ммоль/добу
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	19,37–31,29 ммоль/добу
Оксалати	25–50 мг/добу
Свинець	0,19 мкмоль/л
Верилій	0,044 мкмоль/л
F <sup>-</sup>	До 10 <sup>-5</sup> моль/л
Копропорфірин	3,9–122 нмоль/г креатиніну
17-кетостероїди	Чол. 232–80 мкмоль/добу Жін. 22–60 мкмоль/добу
17-оксикортикостероїди	4–20 мкмоль/добу
<b>Адреналін</b>	<b>30–80 нмоль/добу</b>
<b>Норадреналін</b>	<b>20–240 нмоль/добу</b>
Вініліл-мигдальна кислота	2,5–38 мкмоль/добу
5-оксіндоліл-оцтова кислота	10–20 мкмоль/добу
<b>ДОФА</b>	<b>497,0±36,9 нмоль/добу</b>
<b>ДОФАмін</b>	<b>121,4–2425 нмоль/добу</b>

## Додаток Г

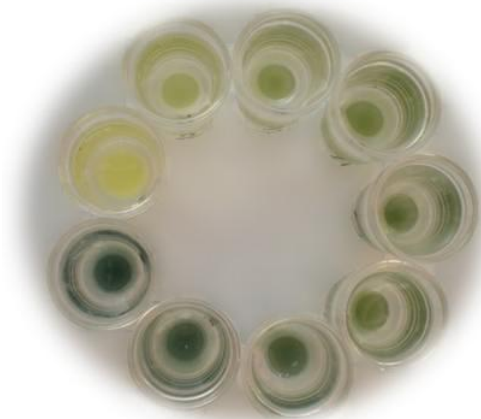
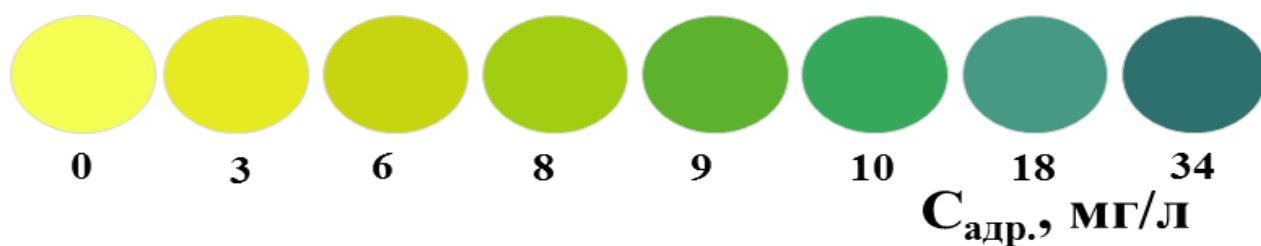
## Кольорова шкала для візуально-тестової оцінки АОА за вмістом кверцетину



## Кольорова шкала для візуально-тестової оцінки АОА за вмістом таніну



## Кольорова шкала для візуально-тестового визначення катехоламінів



Таблиця Д.1

## Порівняльна характеристика методів визначення катехоламінів.

Метод	Реагент або індикаторна система	Середовище	МВ	МЛ	Об'єкт аналізу	Література
1	2	3	4	5	6	7
Титриметричний	Титрант: 0,1М НСІО <sub>4</sub> . Індикатор: метиловий фіолетовий, кристалічний фіолетовий	безводна СН <sub>3</sub> СООН або безводний СН <sub>3</sub> СНО та (СН <sub>3</sub> СО) <sub>2</sub> О	300 мг/л	Не вказано	Фармпрепарати	60–62
Кулонометричне титрування	Електрогенеровані Вг <sub>2</sub> , СІ <sub>2</sub> , І <sub>2</sub> (т. е. визначалася із двома поляризованими Рt електродами)	тарtratний буферний розчин рН = 3,56 або 0,1 М Н <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 мг/л	Не вказано	Модельні розчини та фармпрепарати	65
Вольтамперометричний	Графітовий електрод	0,1 М Н <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3 (5) мг/л Адр(Доф)	4–329 (10–245) мг/л	Модельні розчини та фармпрепарати	65
	Скловугільний електрод		2(5) мг/л Адр(Доф)	3– 201 (10–826) мг/л		
	Золотий електрод, модифікований β-меркаптоетанолом	рН 4	0,006 мг/л (Адр)	0,018– 1,8 мг/л	Стандартні розчини	67
	Полікристалічний електрод з наночастинками золота іммобілізованими на самоорганізованому моношарі аміносполук	0,1 М фосфатний буферний розчин (рН = 7,2)	0,024 мг/л	0,4-4,0 мг/л	Стандартні розчини	68
	вугільно пастовий електрод, модифікований екстрактом гриба <i>Pleurotus ostreatus</i>	Фосфатний буферний розчин рН = 7,0	1,4 (1,5) мг/л Адр (Доф)	11–128 (11-61) мг/л Адр (Доф)	Стандартні розчини	69-70

	2	3	4	5	6	7
	Електрохімічно активований мікроелектрод з вуглеволокна	0,04 М фосфатний буферного розчину (рН = 3)	0,028 мг/л Адр	Не вказано	Модельні розчини	71
Екстаркційн о-ВА	Екстрагент: Іонна рідина ВМІmTf <sub>2</sub> N, Електрод: скло вуглець–платина	рН = 1-9	1,2 мкмоль/л добутаміну	2,0 мкмоль/л–0,1 ммоль/л добутаміну	Модельні розчини	72
Потенціометричний	Пластифікований мембранний електрод на основі 3-(4-толїлазо) фенїлборної кислоти	рН = 7,5	51 (9) мг/л Адр (Доф)	91–1043 (15–1530) мг/л Адр (Доф)	Стандартні розчини	76
Капілярний електрофорез	Мас-детектор	Амоній ацетатний буферний розчин з додаванням 5мМ діетиламіну гідрохлориду (рН 4.0)	16.9 мг/л (Доф) 16.5 мг/л (Адр) 17 мг/л (Норадр)	Не вказано	Біологічні рідини	79
	УФ-детектор (λ= 254 нм)	Амоній ацетатний буферний розчин з додаванням 5мМ діетиламіну гідрохлориду (рН 4.45).	100 мг/л (Доф) 99.3 мг/л (Адр) 100.3 мг/л (Норадр)	Не вказано	Біологічні рідини	79
	Капілярний зонний електрофорез з УФ-детектором	0,175 М оцтова кислота, 30 мМ триетаноламін (рН 3.2),	0,025 мг/л	Не вказано	Сеча	82

	2	3	4	5	6	7
Хроматографічний	Високо-ефективна рідинна хроматографія з флуориметричним детектором	Попереднє очищення та дериватизація	0,40 нг/г (Доф) 0,87 нг/г (Норадр)	Не вказано	Тканини мозку щурів	84
	Високо-ефективна рідинна хроматографія з амперметричним детектором Колонка: Phenomenex Luna C18 column (4.6*150 mm)	Елюент: 30мМ КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> , 1,44мМ натрій остілсульфону, 40мМ монохлороцтової кислоти, 25% СН <sub>3</sub> СN; швидкість елюювання 1 мл/хв.	0.29 мг/л (Доф) 0.03 мг/л (Адр) 0.05 мг/л (Норадр)	Не вказано	Біологічні рідини	79
	Високо-ефективна рідинна хроматографія фотодіодним детектором	Рухома фаза: 70% метанолу і 0,02 М КН <sub>2</sub> РО <sub>4</sub> з 30 мМ додецилсульфату натрію. рН доводили до 3,0 Н <sub>3</sub> РО <sub>4</sub>	0,40 нг (Норадр) 0,55 нг (Доф)	0,004–6,00мг (Норадр) 0,011–8,25мг (Доф)	Рослинні екстракти	85
	Обернено-фозова ВЕРХ з амперметричним детектуванням	Рухома фаза: 70мМ NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1,5мМ октилсульфонат натрію, 40мМ хлороцтова кислота, ацетонітрил.	0,4 мкг/л	Не вказано	Сеча та плазма крові	82
хемілюмінесцентні та флуоресцентні	продукт конденсації адреналіну з <i>o</i> -фенілдіаміном	Суміш 0.02% NaOH, 0.2% ацетону; 0.75% <i>o</i> -фенілдіамін;	1,7 мкг/л	0,004–1 мг/л	Сеча	87

	2	3	4	5	6	7
	Вплив на перебіг ХЛ реакції люмінолу з періодатом калію	0,1 ммоль / л люмінолу, 0,01 ммоль / л періодату калію в 0,2 М NaOH	0,01 мкг/л (Адр) 0,1 мкг/л (Норадр), 0,02 мг/л (Доф)	0,1–100 мкг/л (Адр), 5–50 мкг/л (Норадр), 0,1–10 мкг/л (Доф)	Фармпрепарати	91
	полімер, отриманий шляхом молекулярного імпринтингу	Обробка люмінолом у лужному розчині у присутності гексаціаноферату та гексаціанофериту	0,7 мкг/л	1–22 мкг/л	Сироватка крові	92
	Інгібування електрохемілюмінесценції системи $Ru(bpy)_3^{2+}$ /трипропіламін	Фосфатний буферний розчин рН = 8,5	0,05 (0,001) мг/л Адр (Доф)	0,018–1,83 мг/л Адр	Стандартні розчини	78
Спектрофотометричний	Молибдоарсенатна ГПК	Попередпє окиснення лугом $\lambda=680$ нм	Не вказано	0,04 – 0,12 мг/л (Адр)	Фармпрепарати, біологічні рідини	48–49
	$Fe^{3+}$ –цитрат	Амінооцтова буферна суміш рН=3,0–4,0 $\lambda=530$ нм	2 г/л	–	Фармпрепарати	95
	Знебарвлення метиленового синього I <sub>2</sub> утвореного в реакції періодату із калій йодидом	присутності гідротартратного буферного розчину з рН = 3,56. $\lambda=655$ нм	0,1 мг/л	0,2–3,1 мг/л	Фармпрепарати	95–96