

Sabina Anikiel

**ZASTOSOWANIE SPEKTROFOTOMETRII UV – VIS
ORAZ CHROMATOGRAFII CIENKOWARSTWOWEJ
W ANALIZIE WYBRANYCH ZWIĄZKÓW
FENOLOWYCH I ALKALOIDÓW PURYNOWYCH
O WŁAŚCIWOŚCIACH REDUKUJĄCYCH**

Praca doktorska
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Franciszka Buhla
w Zakładzie Chemii Analitycznej
Uniwersytetu Śląskiego

Katowice 2006

Wolny dostęp

*Za szereg cennych wskazówek
i wszechstronną pomoc udzielaną mi
podczas wykonywania niniejszej pracy
serdeczne podziękowania składam*

Panu prof. zw. dr hab. Franciszkowi Buhlowi

Pani dr Urszuli Hachuła

*oraz wszystkim, którzy swoją obecnością i życzliwością
przyczynili się do powstania tej pracy*

Sabina Anikiel

SPIS TREŚCI

I. WSTĘP	6
1. Wprowadzenie	7
2. Cele pracy	9
 II. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	 11
1. Związki fenolowe – właściwości, metody oznaczania	12
1.1. Fenolokwasy.....	12
1.1.1. Kwas salicylowy	13
1.1.2. Kwas galusowy	19
1.2. Flawonoidy.....	25
1.2.1. Właściwości (+)-katechiny i jej pochodnych	30
1.3. Garbniki.....	36
1.3.1. Kwas taninowy	40
1.4. Wyodrębnianie związków fenolowych z materiałów roślinnych.....	43
2. Alkaloidy – właściwości, metody oznaczania.....	45
2.1. Alkaloidy purynowe.....	48
2.1.1. Kofeina.....	50
2.1.2. Teofilina	53
2.2. Surowce purynowe	56
2.3. Wyodrębnianie alkaloidów z materiałów roślinnych, ich rozdzielanie i oczyszczanie.....	59
3. Charakterystyka kompleksu ceru (III) z arsenazo III	61
4. Charakterystyka kompleksu żelaza (II) z 2,2'-bipirydylem	63
 III. CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	 65
1. Aparatura	66
2. Odczynniki.....	67
3. Roztwory	68
4. Badania spektrofotometryczne	70
4.1. Zastosowanie układu odczynników: Ce(IV) i arsenazo III do oznaczania kwasu salicylowego, kwasu galusowego, kwasu taninowego, (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny	70

4.1.1. Badania wstępne	70
4.1.2. Wpływ czasu i temperatury reakcji redoks na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.....	74
4.1.3. Wpływ zmiennych ilości Ce(IV) na wyniki oznaczeń badanych reduktorów ..	77
4.1.4. Wpływ zmiennych ilości arsenazo III na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.....	81
4.1.5. Wpływ pH na wyniki oznaczeń badanych reduktorów	84
4.1.6. Krzywe wzorcowe do oznaczania badanych reduktorów	88
4.2. Zastosowanie układu odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli do oznaczania kwasu galusowego, kwasu taninowego i (+)-katechiny	96
4.2.1. Badania wstępne	96
4.2.2. Wpływ czasu i temperatury reakcji redoks na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.....	99
4.2.3. Wpływ zmiennych ilości Fe(III) na wyniki oznaczeń badanych reduktorów	101
4.2.4. Wpływ zmiennych ilości 2,2'-bipirydyli na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.....	103
4.2.5. Wpływ pH na wyniki oznaczeń badanych reduktorów	105
4.2.6. Krzywe wzorcowe do oznaczania badanych reduktorów	107
5. Badania chromatograficzne	111
5.1. Warunki rozdzielania i oznaczania badanych substancji techniką chromatografii cienkowarstwowej	111
5.1.1. Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną.....	118
5.1.2. Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu taninowego metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną.....	119
5.1.3. Krzywa wzorcowa do planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny	121
5.1.4. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego	123
5.1.5. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kofeiny	124
5.1.6. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny	125
5.2. Warunki rozdzielania i oznaczania badanych substancji techniką chromatografii bibułowej	127
5.2.1. Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kwasu taninowego po izolacji na bibule Whatman	130

6. Spektrofotometryczne oznaczanie kofeiny po izolacji techniką ekstrakcji do fazy stałej(SPE).....	132
6.1. Technika SPE	132
6.2. Warunki izolacji kofeiny z zastosowaniem techniki SPE.....	133
6.3. Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny po izolacji techniką SPE	134
7. Aplikacje	136
7.1. Oznaczanie teofiliny w preparacie farmaceutycznym	136
7.2. Ocena zawartości garbników hydrolizujących w liściach jeżyny	137
7.3. Oznaczanie kwasu galusowego w preparacie farmaceutycznym „Acifungin forte”	138
7.4. Ilościowa ocena zawartości (+)-katechiny w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty	141
7.5. Zastosowanie densytometrii i spektrofotometrii do oznaczania kwasu galusowego w naparach herbacianych po rozdzieleniu chromatograficznym	144
7.5.1. Densytometryczne oznaczanie zawartości kwasu galusowego w herbacie pu – erh w zależności od czasu zaparzania	144
7.5.2. Densytometryczne oznaczanie zawartości kwasu galusowego w różnych rodzajach herbat.....	145
7.5.3. Spektrofotometryczne oznaczanie kwasu galusowego w herbacie pu – erh..	147
7.6. Densytometryczne oznaczanie kofeiny w materiałach roślinnych.....	149
7.6.1. Oznaczanie kofeiny w naparach herbacianych	149
7.6.2. Oznaczanie zawartości kofeiny w liściach Yerba Mate i preparatach zawierających Guaranę	153
7.6.3. Porównanie zawartości kofeiny w badanych surowcach purynowych.....	155
7.7. Spektrofotometryczne oznaczanie kofeiny w materiałach roślinnych po izolacji z zastosowaniem techniki SPE	156
7.7.1. Oznaczanie kofeiny w preparacie „Green tea”	156
7.7.2. Ocena zawartości kofeiny w preparatach zawierających Guaranę.....	157
IV. WNIOSKI.....	158
V. STRESZCZENIE.....	162
VI. LITERATURA	168

I WSTEP

WPROWADZENIE

W ostatnich latach obserwuje się ogromne zainteresowanie fizjologiczną rolą antyoksydantów (przeciwutleniaczy) oraz ich występowaniem, głównie w składnikach pokarmowych. Do najważniejszych zadań jakie tego typu związki spełniają w organizmach żywych należy zabezpieczanie przed wolnymi rodnikami, które są odpowiedzialne za zapoczątkowanie i rozwój wielu schorzeń, m.in. chorób sercowo – naczyniowych, schorzeń układu nerwowego a przede wszystkim chorób nowotworowych. Antyoksydanty łącząc się z wolnymi rodnikami dokonują ich neutralizacji, pozbawiając możliwości oddziaływania na organizm. Niektóre z nich wytwarzane są przez ustrój człowieka (np. glutation, kwas moczowy), podczas gdy inne dostarczane są wraz z pokarmem. Do naturalnych antyutleniaczy należą w szczególności karotenoidy, kwas askorbinowy i tokoferole. Najliczniejszą i najbardziej skuteczną grupę antyoksydantów stanowią związki fenolowe [1]. Są to substancje bardzo zróżnicowane zarówno pod względem właściwości jak i struktury. Wśród nich możemy wyróżnić trzy zasadnicze grupy:

- 1) proste związki fenolowe, w tym fenolokwasy (salicylowy [2,3], galusowy¹ [4])
- 2) flawonoidy, w tym katechiny [5]
- 3) inne związki polifenolowe (taniny) [6,7]

Silne właściwości przeciwutleniające dotyczą szczególnie polifenoli i wynikają z obecności w ich cząsteczkach wielu grup hydroksylowych, które łatwo ulegają utlenianiu z wytworzeniem odpowiednich O-chinonów [8].

Aktywność antyutleniającą wykazują także niektóre alkaloidy, np.: purynowe (kofeina, teofilina), choć związki te są znane głównie z działania stymulującego jaki wywierają na ośrodkowy układ nerwowy [5, 9].

Zarówno związki fenolowe jak i alkaloidy purynowe są szeroko rozpowszechnione w przyrodzie. Występują one dość powszechnie w naszej codziennej diecie, gdyż bogatym ich źródłem są: herbata, kakao, wino i soki owocowe [10].

Herbata jest najczęściej spożywanym napojem na świecie, zarówno ze względu na walory smakowe, jak również pozytywne efekty wywierane na organizm człowieka.

Do alkaloidów purynowych zawartych w liściach herbaty (*Camellia sinensis*) należy kofeina (1-4%) oraz występujące w znacznie mniejszych ilościach teobromina (0,02 – 0,04%) i teofilina (ok. 0,02 %) [11].

Polifenole, które są odpowiedzialne za większość profilaktycznych i leczniczych właściwości herbaty, stanowią 15 – 25% suchej masy liści. Wśród nich można wyróżnić: garbniki (kwas taninowy), flawonoidy (katechina) oraz fenolokwasy (kwas galusowy) [8].

Bogatym źródłem kofeiny są cieszące się obecnie coraz większą popularnością nasiona z rośliny *Paullinia Cupana* (guarana) [12,13] oraz liście *Yerba Mate* [14,15]. Produkty te ze względu na swoje właściwości orzeźwiające, pobudzające i wzmacniające organizm, znajdują duże zastosowanie w życiu codziennym, lecznictwie i kosmetyce.

Wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad występowaniem, izolacją, przemianami i działaniem leczniczym oraz profilaktycznym związków fenolowych oraz alkaloidów purynowych. Celowe wydaje się więc podejmowanie w tej tematyce badań analitycznych, zmierzających do opracowania prostych, szybkich i tanich, a jednocześnie czułych i precyzyjnych metod ich oznaczania. Takimi cechami charakteryzują się metody spektrofotometryczne.

W oznaczeniach spektrofotometrycznych problemem staje się nieraz mała ich selektywność. Można ją zwiększyć stosując wstępne rozdzielanie analizowanych składników, np. technikami chromatograficznymi. W 2003 roku upłynęło sto lat od kiedy M. S. Cwiet przedstawił po raz pierwszy chromatografię jako nową metodę rozdziału substancji [16]. W tym czasie dokonała się ogromna ewolucja chromatografii pod względem zdolności rozdzielczej, czułości detekcji, szybkości rozdzielania i stosowanych mechanizmów retencji. Nadal jednak bardzo dużym zainteresowaniem cieszy się najprostsza z technik – chromatografia cienkowarstwowa, którą cechuje ponadto szybkość wykonania i niskie koszty analizy.

Obecnie, w celu izolacji analitów z materiałów złożonych coraz większe zastosowanie znajduje ekstrakcja do fazy stałej (SPE). Jest to technika uniwersalna i wymagająca, odmiennie niż ekstrakcja rozpuszczalnikowa, tylko niewielkich objętości rozpuszczalników. Ponadto ekstrakcja do fazy stałej umożliwia szybkie, oszczędne i skuteczne przygotowanie próbek do analizy metodami spektrofotometrycznymi oraz technikami chromatograficznymi [17].

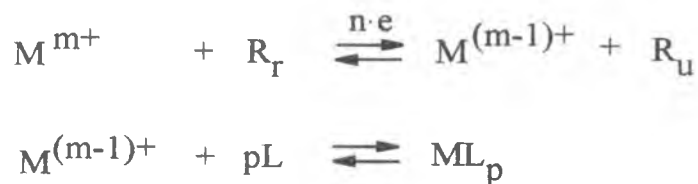
CELE PRACY

Niniejsza praca jest kontynuacją badań prowadzonych w Zakładzie Chemii Analitycznej w tematyce zastosowania złożonych układów redoksowo - kompleksowych w analizie reduktorów biologicznie czynnych [18 – 23].

W prezentowanej pracy wykorzystano sprzężone reakcje redoksowo – kompleksowe do opracowania spektrofotometrycznych metod oznaczania wybranych reduktorów z grupy związków fenolowych (kwas salicylowy, galusowy, taninowy, (+)-katechina) oraz alkaloidów purynowych (kofeina, teofilina).

W wyniku reakcji jonów metalu na wyższym stopniu utlenienia M^{m+} z organicznym analitem o właściwościach redukujących R_r powstaje bezbarwna, utleniona postać analitu R_u oraz stechiometryczna ilość jonów metalu na niższym stopniu utlenienia $M^{(m-1)+}$, które są wiązane w związek kompleksowy przez odczynnik chromogeny L.

Wykorzystano kompleksy: Ce^{3+} z arsenazo III oraz Fe^{2+} z 2,2'-dipirydylem, których powstawanie przedstawia poniższy schemat:



Obserwowany efekt analityczny dla badanych reduktorów pochodzi od powstających kompleksów, a liczba elektronów biorących udział w procesie redoks przyczynia się do zwielokrotnienia uzyskiwanych efektów barwnych.

Aby móc zastosować proponowane metody spektrofotometryczne do oznaczania badanych reduktorów w materiałach złożonych, konieczne jest ich wstępne wyizolowanie. W tym celu przeprowadzono badania zmierzające do optymalizacji warunków rozdzielania i oznaczania badanych substancji z zastosowaniem techniki chromatografii cienkowarstwowej i bibułowej.

Opracowano również densytometryczne metody oznaczania (+)-katechiny, kofeiny i kwasu galusowego po rozdzieleniu tych substancji na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego.

Podjęto także badania nad możliwością izolacji kofeiny z preparatów naturalnych na bazie nasion z rośliny *Paullinia cupana* z zastosowaniem techniki SPE, a następnie oznaczania tego analitu z wykorzystaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania, przebiegających w układzie odczynników Ce(IV), arsenazo III.

Opracowane procedury analityczne zastosowano do oznaczania wybranych związków fenolowych i alkaloidów purynowych w preparatach farmaceutycznych o deklarowanej zawartości analitów, jak również w materiałach naturalnych o zmiennym składzie.

II

CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Związki fenolowe – właściwości, metody oznaczania

Jest to obszerna grupa substancji stanowiąca hydroksylowe pochodne węglowodorów aromatycznych. W zależności od liczby grup hydroksylowych wyróżnia się: monofenole, difenole, trifenole i polifenole. Związki fenolowe znane są ze swoich właściwości bakteriobójczych i dezynfekujących a nade wszystko przeciwutleniających. Szczególnie wysokie zdolności antyutleniające wykazują polifenole, zwłaszcza te, które zawierają grupy hydroksylowe w pozycjach orto- i para-. Przykładem takiej reakcji jest utlenianie hydrochinonu do chinonu. Produktem pośrednim tej reakcji jest rodnik fenoksyłowy, który może ulegać dalszemu utlenianiu do chinonów albo uczestniczyć w innych reakcjach charakterystycznych dla rodników, jak dimeryzacja, podstawienie rodnikowe lub reakcje z innymi rodnikami. Produktem końcowym reakcji są chinony. W produktach żywnościowych chinony polimeryzują, tworząc związki wielkocząsteczkowe o brunatnym zabarwieniu [24].

Antyoksydanty fenolowe pochodzenia syntetycznego (np. galusan propyłu, E 310) są stosowane do ochrony produktów żywnościowych przed utlenianiem [25]

1. 1. Fenolokwasy

Fenolokwasy są związkami naturalnymi szeroko rozpowszechnionymi w przyrodzie. Stanowią ważny element procesu przemiany materii w roślinach, biorą udział w biosyntezie wielu związków organicznych, m.in. garbników, flawonoidów i alkaloidów. Obecne są w takich produktach żywnościowych jak herbata, kawa, kakao, czerwone wino i piwo. Największe znaczenie praktyczne mają dwa szeregi fenolokwasów – pochodne kwasu benzoowego i cynamonowego. Cechą charakterystyczną fenolokwasów jest ich wysoka aktywność biologiczna i szeroki zakres działania farmakologicznego. Wiele z tych substancji posiada właściwości przeciwzapalne, przeciwdrobnoustrojowe, immunostymulujące i antymutagenne. Związki te posiadają zdolność wychwytywania i wiązania wolnych rodników tlenowych, co zapobiega procesom starzenia, chorobom serca i układu krążenia oraz chorobom nowotworowym.

Definicja i podział klasyfikacyjny

Fenolokwasy to substancje charakteryzujące się obecnością w cząsteczce dwóch grup funkcyjnych: hydroksylowej i karboksylowej.

Z punktu widzenia struktury podstawowego szkieletu węglowego kwasy fenolowe można podzielić na dwie podgrupy [26]:

1. **Kwasy fenylokarboksylowe**, w których grupa karboksylowa połączona jest bezpośrednio z pierścieniem aromatycznym (**pochodne kwasu benzoowego**).
2. **Kwasy fenylopropenowe**, w których do pierścienia aromatycznego dołączony jest boczny łańcuch nienasyconego kwasu propenowego (**pochodne kwasu cynamonowego**).

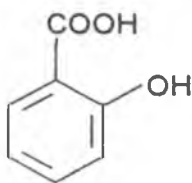
Związki te mogą się różnić ilością i rozmieszczeniem grup hydroksylowych w pierścieniu aromatycznym. Biorąc pod uwagę to kryterium wśród pochodnych kwasu benzoowego można wyróżnić: [11, 27]:

1. Kwasy monohydroksybenzoowe np.: kwas salicylowy (o-hydroksybenzoowy)
2. Kwasy dihydroksybenzoowe, np.: kwas gentyzynowy (2,5-dihydroksybenzoowy)
3. Kwasy trihydroksybenzoowe, np.: kwas galusowy (3,4,5-trihydroksybenzoowy)

1.1.1. Kwas salicylowy

Kwas salicylowy został wyodrębniony z kory wierzby (*Salix alba*) i oczyszczony przez Rafaelo Piria w 1838 roku. Natomiast Hermann Kolbe określił budowę tego związku i w 1859 roku ostatecznie ustalił syntetyczny sposób jego otrzymywania.

Budowa, występowanie i otrzymywanie



Kwas salicylowy jest monohydroksylowym kwasem fenolowym zbudowanym z pierścienia aromatycznego z grupą karboksylową przy węglu 1 i grupą hydroksylową przy węglu 2 [3].

Związek ten w stanie wolnym znajduje się m. in. w liściach brzozy i senesu ostrolistnego, kwiatach rumianku, a także w malinie, nagietku, fiołku i piwoni. W formie związanej, najczęściej w postaci estru metylowego, wchodzi w skład licznych olejków eterycznych, np. goździkowego. W roślinach salicylan metylu znajduje się w połączeniu z cukrami w postaci glikozydów (głównie salicyny), które łatwo hydrolizują pod wpływem enzymów roślinnych. Hydroliza salicyny prowadzi do otrzymania glukozy i alkoholu salicylowego, łatwo utleniającego się do kwasu [11,27].

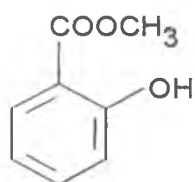
Na skalę przemysłową kwas salicylowy produkuje się metodą opracowaną przez Kolbego, a udoskonaloną przez Schmitta, polegającą na ogrzewaniu fenolanu sodowego z dwutlenkiem węgla w temperaturze 125 – 140°C pod ciśnieniem 6 – 7 atmosfer. Kwas o-hydroksybenzoesowy można otrzymać także przez utlenienie grupy metylowej w krezolach lub diazowanie kwasu antranilowego i hydrolizę powstającego produktu [28,29].

Właściwości fizykochemiczne

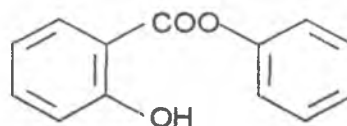
Kwas salicylowy jest ciałem stałym, o ostrym słodkawokwaśnym smaku. Krystalizuje z wody w postaci białych, igiełkowatych kryształów, topiących się w temperaturze 158°C. Wolno ogrzewany pod zmniejszonym ciśnieniem sublimuje bez rozkładu i może być destylowany z przegrzaną parą wodną. Natomiast przy szybkim ogrzewaniu rozkłada się, wydzielając charakterystyczny zapach fenolu. Substancja jest trudno rozpuszczalna w zimnej wodzie i olejach mineralnych, nieco lepiej we wrzącej wodzie, chloroformie i glicerolu, natomiast bardzo dobrze rozpuszcza się w etanolu i eterze dietylowym [30 - 32]. Związek ten wykazuje własności chemiczne kwasu, jak i fenolu. Jest dość mocnym kwasem ($pK_a = 3$), w związku z tym wypiera słabsze kwasy, np. węglowy z ich soli. Ze względu na obecność obu grup funkcyjnych może tworzyć estry zarówno z alkoholami, np. salicylan metylu, fenylu, jak i z kwasami, m.in. kwas acetylosalicylowy. Ponadto tworzy sole, amidy, np. salicylamid i inne pochodne kwasowe, z drugiej zaś strony, jak większość fenoli sprzęga się z solami diazoniowymi, daje fenolany i etery fenolowe [28]. Związek ten tworzy z wodorotlenkiem wapnia nierozpuszczalną sól o budowie cyklicznej. Natomiast ogrzewanie kwasu salicylowego z tlenkiem wapnia powoduje wydzielanie się specyficznego zapachu fenolu [33,34]. Substancja ta daje z kwasem borowym kompleksowy kwas borosalicylowy. Ponadto w wyniku energicznej redukcji kwasu salicylowego sodem w roztworze alkoholu amyłowego otrzymuje się kwas pimelinowy,

powstający wskutek rozpadu kwasowego tworzącego się pośrednio kwasu cykloheksanokarboksylowego [27].

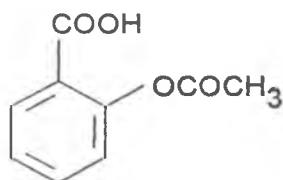
Do wykrywania kwasu salicylowego służy reakcja z chlorkiem żelaza (III). W roztworze wodnym lub alkoholowym tworzą się kompleksy, których zabarwienie zależy od pH środowiska. Przy pH~1 powstaje fioletowy kompleks, przy pH~3 kompleks zabarwiony jest na czerwono, natomiast przy pH~7 przyjmuje żółtą barwę. Zabarwienie znika po dodaniu do roztworu kwasów mineralnych. Fenolokwas ten w środowisku kwaśnym ulega także reakcji kondensacji z formaldehydem, w wyniku czego powstaje czerwone zabarwienie [34]. Natomiast pod wpływem działania wody bromowej na kwas salicylowy następuje dekarboksylacja i wytrąca się 2,4,6-tribromofenol [28].



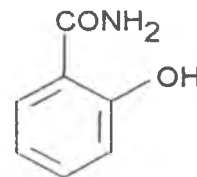
Salicylan metylu



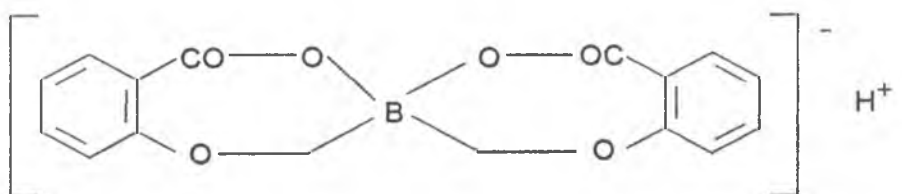
Salicylan fenylu



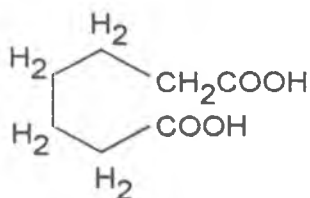
Kwas acetylosalicylowy



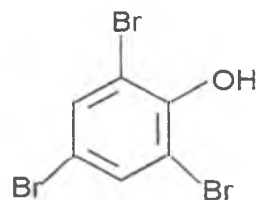
Salicylamid



Kwas borosalicylowy



Kwas pimelinowy



2,4,6-tribromofenol

Właściwości biologiczne i farmakologiczne, zastosowanie

W medycynie, a zwłaszcza w dermatologii wykorzystuje się właściwości antyseptyczne i keratolityczne kwasu salicylowego. W reumatologii stosowany jest zewnętrznie w maściach i płynach do nacierania jako środek przeciwbólowy oraz rozgrzewający. Związek ten oddziałuje bezpośrednio na ośrodkowy układ nerwowy, zwłaszcza na ośrodki bólowe kory mózgowej, dając uczucie ukojenia, a także na ośrodek termoregulacji, powodując zwiększone wydzielanie ciepła i obfite poty. Natomiast w tkankach kwas salicylowy działa odwadniająco, rozszerza naczynia limfatyczne, powodując zahamowanie procesów zapalnych. Ze względu na silne działanie wrzodotwórcze związek ten nie jest przeznaczony do stosowania wewnętrznego. Służy jednak do produkcji szeregu ważnych i rozpowszechnionych preparatów leczniczych. W postaci soli sodowej znalazł zastosowanie jako środek obniżający gorączkę oraz przeciwreumatyczny. Do celów leczniczych, w przypadkach reumatyzmu stawowego, zapalenia opłucnej i newralgii używany jest także salicylan metylu. Natomiast ester fenyłowy kwasu salicylowego, tzw. salol, dzięki swoim właściwościom przeciwbakteryjnym, stosowany jest jako środek dezynfekcyjny w schorzeniach jelit i dróg moczowych. Największe znaczenie lecznicze ma kwas acetylosalicylowy, znany pod nazwą aspiryny lub polopiryny. Związek ten jest jednym ze skuteczniejszych środków przeciwbólowych, przeciwgorączkowych i przeciwzapalnych. Stosowany jest w chorobach gośćcowych i newralgii, a ostatnie badania potwierdziły, iż profilaktyczne zażywanie niewielkich, określonych dawek aspiryny znacząco zmniejsza ryzyko zawału serca. Środkiem o podobnym do aspiryny działaniu leczniczym jest amid kwasu salicylowego. Powszechnie stosowany jest także kwas p-aminosalicylowy (PAS). Stanowi on jeden z ważnych leków przeciwgruźliczych, bowiem skutecznie zwalcza rozwój prątków Kocha [2,27 - 29,31,33, 35 – 39]. Kwas salicylowy i jego pochodne to leki o szerokim zastosowaniu i stosunkowo niskiej toksyczności (dawka śmiertelna 10-40 g). Jednakże salicylany działają drażniąco na błonę śluzową przewodu pokarmowego, mogą powodować stany

zapalne, owrzodzenia i krwawienia. Duże dawki tych związków przyczyniają się także do uszkodzenia wątroby i nerek oraz zaburzeń ze strony ośrodkowego układu nerwowego. W ostatnich latach stwierdzono, iż substancje te mają właściwości embriotoksyczne i teratogenne [38 – 40].

Kwas salicylowy ze względu na właściwości bakteriobójcze i grzybobójcze stosowany jest w przemyśle kosmetycznym, jako zewnętrzny środek dezynfekcyjny pod nazwą spirytusu salicylowego.

Szerokie zastosowanie w przemyśle kosmetycznym znalazły także pochodne kwasu salicylowego w postaci estrowej. W grupie tej szczególne znaczenie mają salicylany: fenyłu, benzylu, izopropylbenzylu czy trimetylocykloheksylu (Homosalate), stosowane powszechnie jako kosmetyczne filtry przeciwsłoneczne UV. Kwas salicylowy i jego pochodne wykorzystuje się także do konserwowania preparatów kosmetycznych [3, 32, 41, 42].

Ze względu na swoje właściwości bakteriostatyczne, kwas salicylowy znalazł zastosowanie jako środek konserwujący produkty spożywcze, głównie owoce i warzywa [43]. Jednak wycofywany jest z użycia, ponieważ wyniki wieloletnich badań wskazują na szkodliwe działanie kwasu salicylowego i jego soli sodowej [40,44]. Powszechnie stosowane są estry: etylowy (E 214), propylowy (E 216) i metylowy (E 218) oraz ich sole sodowe (E 215, E 217, E 219). Związki te hamują rozwój bakterii, drożdży i pleśni, w związku z tym dodawane są do przetworów owocowych, warzywnych i innych [25, 40, 45]

W przemyśle chemicznym kwas salicylowy używany jest w dużych ilościach do wytwarzania niektórych barwników azowych oraz kwasu p-hydroksybenzoesowego, stosowanego do produkcji jednego z nowszych typów włókien syntetycznych z grupy poliestrów [33,37]. Natomiast inna pochodna kwasu salicylowego – salicylan metylu, dzięki swojemu przyjemnemu, charakterystycznemu zapachowi, znalazła zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym [27,29]. Oprócz syntezy organicznej kwas salicylowy służy także jako wskaźnik fluorescencyjny.

Przegląd metod oznaczania kwasu salicylowego

Tabela 1. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV - VIS

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\text{max}}=730$ nm) kompleksu powstałego w wyniku reakcji analitu z octanem miedzi (II) w środowisku buforu octanowego	preparaty farmaceutyczne	46

Pomiar absorpcji ($\lambda_{\max}=446$ nm) próbki otrzymanej w wyniku reakcji analitu z $[\text{Ir}(\text{NO})\text{Cl}_5]^-$ i kwasem askorbinowym w środowisku kwaśnym		47
Pomiar absorpcji ($\lambda_{\max}=540$ nm) produktu reakcji analitu z odczynnikiem Trindera ($\text{Fe}(\text{NO})_3$, HgCl_2 , HCl)	preparaty farmaceutyczne	48
Pomiar absorpcji ($\lambda_{\max}=588$ nm) produktu reakcji analitu z fioletem krystalicznym	preparaty farmaceutyczne	49
Pomiar absorpcji analitu przy $\lambda_{\max}=297$ nm względem wody	preparaty farmaceutyczne	50
Spektrofotometria pochodna: -widmo pochodnej drugiego rzędu, technika zero – crossing, $\lambda=314$ nm -widmo pochodnej pierwszego rzędu, $\lambda=316$ nm -widmo pochodnej pierwszego rzędu, technika zero – crossing	preparaty farmaceutyczne	51
	oznaczanie wolnego kwasu salicylowego w aspirynie	52
	preparaty farmaceutyczne-mieszaniny syntetyczne	53
Pomiar absorpcji alkalicznego lub etanolowego roztworu analitu przy $\lambda=230 - 235$ nm lub $\lambda=296 - 303$ nm		54

Tabela 2. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy -faza ruchoma: etanol(96%)-toluen-chloroform-lodowaty kwas octowy, 6:20:14:0,5 (v/v) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=310$ nm	preparaty farmaceutyczne i kosmetyczne	55
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60, DC- Alufolien -faza ruchoma: heksan-chloroform-kwas octowy, 4:1:1 lub etanol-heksan-chloroform-kwas octowy, 12:12:8:1 lub chloroform-aceton-toluen, 12:5:2 -detekcja: densytometryczna, $\lambda=280$ nm	preparaty farmaceutyczne – przeciwbólowe i przeciwgorączkowe	56
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G -faza ruchoma: octan etylu-aceton, (9:2) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=295$ nm	maść zawierająca kwas benzoowy	57
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ -faza ruchoma: octan etylu-metanol-amoniak, (16:5:2) bądź (8:1:1) lub dichlorometan-dioksan-woda, (2:1:1) lub chloroform-metanol, (19:1) lub toluen-eter etylowy-bezwodny kwas octowy-metanol, (120:60:18:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=200-700$ nm		58

Tabela 3. Inne metody oznaczania kwasu salicylowego

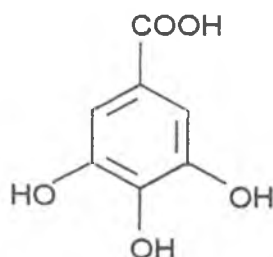
Metoda	Analizowany materiał	Lit.
Spektrometria absorpcji atomowej (AAS)	preparaty farmaceutyczne, maść	59
Fluorymetria	preparaty farmaceutyczne	60
Chemiluminescencja	preparaty bakteriobójcze	61
Kapilarna elektroforeza (CE)	ścieki	62
Chromatografia cieczowa z spektrometrią mas (LC-MS)	materiał biologiczny	63

Chromatografia gazowa z spektrometrią mas (GC-MS)	materiał roślinny	64
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	sok jabłkowy	65
	mocz ludzi nie zażywających salicylanów	66
	osocze i mocz	67
	-jonowymienna	68
	-par jonowych	69
-odwróconych faz	preparaty farmaceutyczne	70
Amperometria	preparaty farmaceutyczne	71
Woltamperometria różnicowa	preparaty farmaceutyczne	72

1.1.2. Kwas galusowy

Kwas galusowy był jednym z pierwszych fenolokwasów wyodrębnionych z soków roślinnych przez Karla Wilhelma Scheelego już w 1786 roku.

Budowa, występowanie i otrzymywanie



Kwas galusowy jest trihydroksylowym kwasem fenolowym zbudowanym z pierścienia aromatycznego z grupą karboksylową przy węglu 1 i trzema grupami hydroksylowymi przy węglu 3,4 i 5 [3].

Substancja ta jest szeroko rozpowszechniona w przyrodzie. Najczęściej występuje w połączeniach estrowych, głównie depsydowych oraz glikozydowych. W stanie wolnym znajduje się w orzeszkach galasowych, korze dębowej, liściach sumaka, liściach herbaty i innych roślinach garbnikowych. W stanie związanym stanowi główny składnik galotanin, z których otrzymuje się go przez hydrolizę kwasową lub enzymatyczną.

Do otrzymywania kwasu galusowego na skalę przemysłową stosuje się wodne wyciągi z galasówek. Hydrolizują one pod działaniem rozcieńczonego kwasu siarkowego (VI) lub pleśni (*Penicillium glaucum* i *Aspergillus niger*), które zawierają enzym tanazę, zdolny do hydrolizowania taniny. W wyniku tego procesu powstaje

glukoza i kwas digalusowy, a następnie kwas galusowy. Kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy można otrzymać także w wyniku syntezy organicznej, w której związkiem wyjściowym są pochodne monobromokwasów: protokatechowego lub α -rezorcyłowego. W wyniku stapiania z alkalią przechodzą one w kwas galusowy [11,27 – 29].

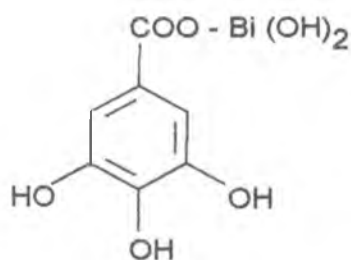
Właściwości fizykochemiczne

Kwas galusowy jest ciałem stałym, o kwaskowym i cierpkim smaku. Krystalizuje w postaci bezbarwnych, jedwabistych igieł z jedną cząsteczką wody. Substancja łatwo rozpuszcza się w gorącej wodzie, etanolu i eterze, natomiast trudno rozpuszcza się w zimnej wodzie [27,73]. Podczas ogrzewania w temperaturze 220°C topi się i rozkłada z wydzieleniem CO₂, tworząc przy tym pirogalol [31].

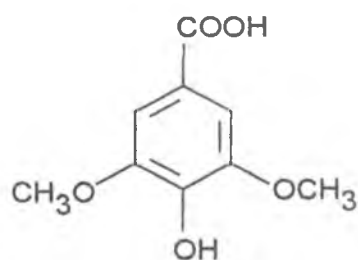
Kwas galusowy jest podatny na utlenienie, szczególnie w środowisku zasadowym. Sole metali alkalicznych i kwasu galusowego utleniają się na powietrzu, przybierając brunatne zabarwienie. Substancja ta jest silnym reduktorem, redukującym sole srebra i złota z wydzieleniem metalu. W zależności od stężenia sole żelaza (III) dają zabarwiony roztwór lub strącają niebieskoczarny osad z wodnego roztworu kwasu. Kwas galusowy reaguje z wodorotlenkiem bizmutu, tworząc bizmutawy galusan zasadowy. Substancja ta rozpuszcza się w roztworach wodorotlenków potasowców, tworząc żółte, przezroczyste roztwory, szybko przechodzące w brunatne. W wyniku reakcji z chlorkiem żelaza (III) powstaje ciemnoniebieskie zabarwienie. Fenolokwas ten tworzy także etery, czego przykładem jest 3,5-dimetylowy eter kwasu galusowego, zwany kwasem syryngowym [27,33,34].

Kwas galusowy jest substratem uczestniczącym w różnego rodzaju kondensacjach, w wyniku których powstają bardzo charakterystyczne dla roślin substancje garbnikowe [3]. Związek ten może ulegać estryfikacji międzycząsteczkowej, tworząc depsydy. Wśród związków tego typu szczególne znaczenie ma depsyd kwasu galusowego – kwas m-digalusowy, który występuje w przyrodzie jako składnik licznych garbników hydrolizujących. Substancja ta wytrąca żelatynę z roztworów wodnych, natomiast z chlorkiem żelaza (III) daje ciemnobłękitne zabarwienie. Ester kwasu 3,4,5-trihydroksybenzoesowego lub jego pochodnych depsydowych i glukozy nosi nazwę taniny [28,33,43]. Kwas galusowy ulega także reakcji wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji, w wyniku czego otrzymujemy laktony. W wyniku utlenienia tego fenolokwasu lub jego estrów chlorkiem żelaza (III), kwasem arsenowym lub manganianem (VII) tworzy się kwas heksahydroksydifenowy, który łatwo

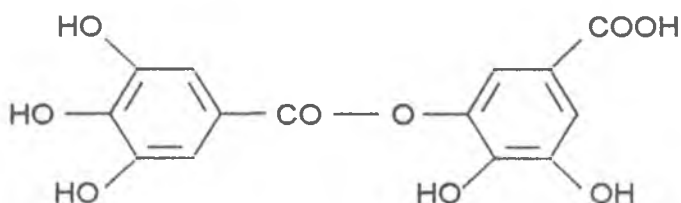
przechodzi w monolakton – kwas luteinowy, a następnie w odpowiedni dilakton – kwas elagowy (cykliczny didepsyd wewnętrzny). Kwas galusowy tworzy także złożone związki o strukturze eteru, m.in. kwas dehydrodigalusowy składający się z dwóch cząsteczek fenolokwasu połączonych ze sobą wiązaniem eterowym i dilakton kwasu waloneaikowego posiadający w swej budowie kwas elagowy związany eterowym mostkiem tlenowym z kwasem galusowym [27].



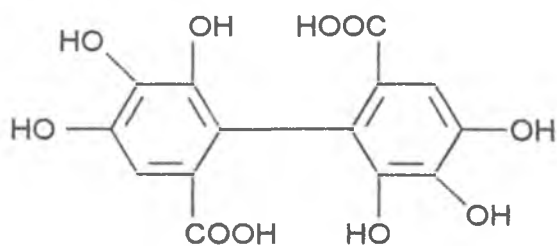
Bizmutawy galusan zasadowy



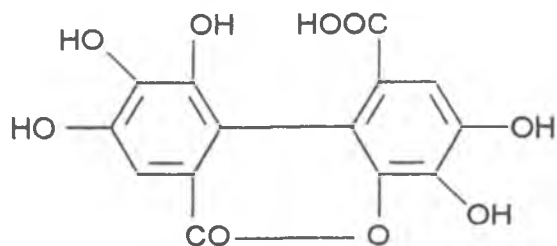
Kwas syringowy



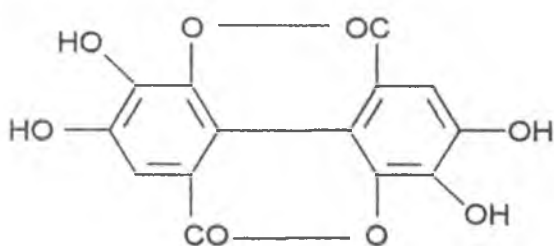
Kwas m-digalusowy



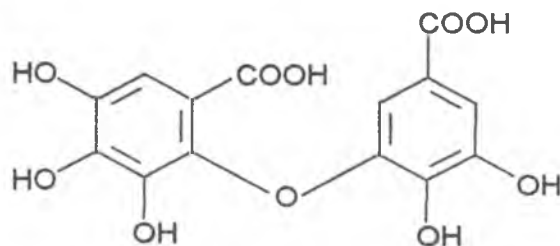
Kwas heksahydroksydifenowy



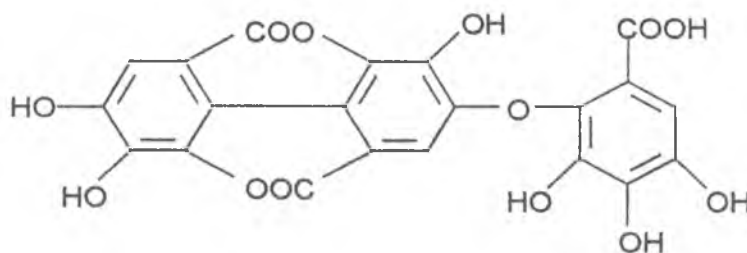
Kwas luteinowy



Kwas elagowy



Kwas dehydrodigalusowy



Dilakton kwasu waloneaikowego

Właściwości biologiczne i farmakologiczne, zastosowanie

Kwas galusowy, jako naturalny związek fenolowy uwalniany w wyniku hydrolizy garbników, wykazuje szereg efektów farmakologicznych. Działa grzybobójczo, bakteriobójczo i przeciwwirusowo. Posiada właściwości antymutagenne oraz antykancerogenne, hamując rozwój guzów nowotworowych. Ponadto wykazuje działanie przeciwanafilaktyczne, choleretyczne i spazmolityczne oraz hamuje degradację insuliny. Jako składnik biologicznie czynny przejawia aktywność przeciwutleniającą i hamującą wytwarzanie nadtlenków.

Kwas 3,4,5-trihydroksybenzoowy jest szeroko rozpowszechniony w chińskiej medycynie naturalnej. Fenolokwas ten, wyodrębniany z kory orzecha mandzurskiego – *Juglans mandshurica Maxim*, jest tradycyjnym chińskim lekiem ludowym, stosowanym w leczeniu raka wątroby oraz w przypadku chronicznego zapalenia wątroby. W Polsce kwas galusowy znajduje obecnie zastosowanie głównie w ziołolecznictwie. Dawniej był powszechnie stosowany jako środek ściągający i zapierający, do dziś jednak pozostaje w praktyce weterynaryjnej środkiem ściągającym przewodu pokarmowego. Natomiast w chorobach skórnych i w leczeniu ran stosuje się zewnętrzne środki dezynfekcyjne m.in. bizmutawy galusan zasadowy, znany pod nazwą Dermatolu, a także grzybobójczy preparat o nazwie Acifungin [4,33,74].

Kwas galusowy ze względu na działanie antyseptyczne, ściągające i przeciwpotne znalazł zastosowanie w przemyśle kosmetycznym. Galusany: etylu, propylu, oktylu i dodecyłu dodawane są do mydeł leczniczych, toników, maseczek kosmetycznych, kremów i maści. Do kosmetycznych filtrów UV, chroniących skórę przed skutkami promieniowania nadfioletowego, zaliczany jest także kwas m-digalusowy. Substancja ta stosowana jest w preparatach kosmetycznych w postaci trójoleinianu, występującego pod nazwą Solprotex [3,41,42].

W przemyśle spożywczym szerokie zastosowanie znajdują antyoksydanty fenolowe zarówno naturalne jak i pochodzenia syntetycznego. Służą one do ochrony produktów żywnościowych przed utlenieniem. Spośród przeciwutleniaczy otrzymywanych na drodze syntezy najczęściej stosowanymi są estry kwasu galusowego. Galusany: propylu (PG, E 310), oktylu (OG, E 311) i dodecyłu (DG, E 312) chronią tłuszcze przed jełczeniem i przykrym zapachem. Najbardziej efektywnym przeciwutleniaczem tej grupy jest galusan propylu. W mieszankach z di-tert-butylohydroksytoluenem (BHT, E 321) i tert-butylohydroksyanizolem (BHA, E 320) wykazuje on działanie synergistyczne. [45].

Najnowsze badania toksykologiczne wykazały, że większe ilości tych substancji hamują wzrost zwierząt, wywołują bezpłodność, uszkodzają nerki i zakłócają liczne procesy biochemiczne, m.in. metabolizm żelaza w organizmie. Ponadto wszystkie trzy estry są alergenami i mogą powodować reakcje uczuleniowe oraz podrażnienia przewodu pokarmowego [25,40,44, 45].

Kwas 3,4,5-trihydroksybenzoesowy, ekstrahowany z galasówek, znajduje zastosowanie w przemyśle chemicznym do produkcji barwników. Powszechnie dawniej stosowany czarny atrament był wodnym roztworem kwasu galusowego lub taniny, siarczanu żelaza (III), niewielkiej ilości kwasu siarkowego (VI) i gumy arabskiej. Pochodne tego związku, dzięki swoim właściwościom, stosowane są także w garbarstwie do garbowania skóry. W przemyśle chemicznym substancja ta służy jako odczynnik analityczny do otrzymywania pirogalolu oraz innych związków fenolowych [27,43]. Podobnie jak pirogalol, kwas galusowy redukuje sole złota i srebra z wydzieleniem metalu i dlatego stosowany jest jako wywoływacz w fotografii [33]. Substancję tą wykorzystuje się również w pirotechnice jako mieszaninę wybuchową, gdyż z silnymi utleniaczami może eksplodować.

Przegląd metod oznaczania kwasu galusowego

Tabela 4. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV - VIS

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\max}=560$ nm) kompleksu powstałego w wyniku sprzężenia analitu z produktem reakcji utleniania metolu (siarczan p-N-metyloaminofenolu) za pomocą KMnO_4 przy pH = 3	tłuszcze i oleje jadalne	75
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\max}=440$ nm) kompleksu powstałego w wyniku reakcji analitu z chlorowodorkiem 3-metylo-benzotioazo-2-on hydrazonu (MBTH), wcześniej utlenionego za pomocą $(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$	tłuszcze i oleje	76

Analit redukuje jony żelaza (III) do żelaza (II), które są następnie wiązane z 1,10 – fenantroliną ($\lambda_{\text{max}}=510 \text{ nm}$); pH = 3,5; w oznaczeniach stosuje się technikę analizy wstrzykowo – przepływowej, (FIA)	herbata, piwo	77
Analit reaguje z 2% roztworem kwasu jodowego (VII), po 15 minutach ogrzewania w temperaturze 60 °C powstaje żółty produkt ($\lambda_{\text{max}}=380 \text{ nm}$)		78
Analit reaguje z metolem i jodanem (VII) sodu , przy pH = 2,5, dając produkt wykazujący maksymalną absorpcję światła o $\lambda = 580 \text{ nm}$	tłuszcze i oleje	79
Spektrofotometria pochodna, widmo pochodnej drugiego rzędu, technika zero – crossing, $\lambda=267,6 \text{ nm}$	preparaty farmaceutyczne	80

Tabela 5. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
-faza stacjonarna: celuloza F ₂₅₄ (HPTLC) -faza ruchoma: izobutanol-kwas octowy-woda, (14:1:3,5) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=280 \text{ nm}$	materiał roślinny	81
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy Si 60 HPTLC -faza ruchoma: eter dipropylowy-heptan-kwas mrówkowy, (5:4:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=254 \text{ nm}$	materiał roślinny	82
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G -faza ruchoma: octan etylu-toluen-kwas mrówkowy, (540:300:62) -detekcja: spryskiwano 1%roztworem FeCl ₃ i mierzono absorbancję plamek przy $\lambda=530 \text{ nm}$	preparaty stosowane w chińskiej medycynie tradycyjnej	83
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (HPTLC) -faza ruchoma: octan etylu-kwas mrówkowy-kwas octowy-woda, (100:11:11:27)	materiał roślinny	84
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ HPTLC -faza ruchoma: toluen-octan etylu-kwas mrówkowy, (5:5:1) -detekcja: densytometryczna ($\lambda=254 \text{ i } 366 \text{ nm}$)	rośliny lecznicze	85
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G -faza ruchoma: octan etylu-toluen-kwas mrówkowy, (270:150:31) -detekcja: spryskiwano 1% FeCl ₃ i mierzono absorbancję plamek przy $\lambda=520 \text{ nm}$	preparaty stosowane w chińskiej medycynie tradycyjnej	86
-faza stacjonarna: RP – 18 F ₂₅₄ -faza ruchoma: kwas octowy-metanol, (1:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda=254 \text{ nm}$	materiał roślinny	87
-faza stacjonarna: celuloza -faza ruchoma: 20% metanol -detekcja: spryskiwano roztworem FeCl ₃ i mierzono absorbancję plamek przy $\lambda=700 \text{ nm}$	czerwone wino	88

Tabela 6. Inne metody oznaczania kwasu galusowego.

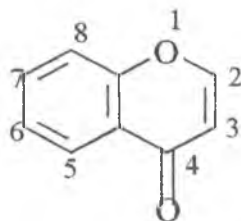
Metoda	Analizowany materiał	Lit.
Spektrometria w podczerwieni	napoje alkoholowe	89
Chemiluminescencja	chińska biała oliwka	90
Elektrochemiluminescencja	preparaty chińskiej medycyny naturalnej	91
Kapilarna elektroforeza	wino	92
Chromatografia gazowa z spektrometrią mas	wino	93
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	preparaty chińskiej medycyny naturalnej	94
	czerwone wino	95
	biomasa (drzewo, produkty żywnościowe)	96
	miód	97
	sok żurawinowy	98
	osocze, mocz	99
	herbata: zielona, oolong, pu – erh, czarna	od 100 do 104
Micelarna chromatografia elektrokinetyczna (MEKC)	herbata: zielona i czarna	105
Amperometria		106
Woltamperometria cykliczna	wino	107
Potencjometria		108

1.2. Flawonoidy

Nazwą flawonoidy są obejmowane substancje w zasadzie roślinne (w ostatnim czasie stwierdzono również ich obecność u niektórych owadów), o charakterze barwników, których podstawowy szkielet składa się z 15 atomów węgla, układających się w ugrupowanie $C_6-C_3-C_6$, które można zinterpretować jako układ pierścienia benzenowego A oraz układ fenylopropanu C_6-C_3 (pierścień B + C_3)



Ze względu na to, że u większości flawonoidów wytwarza się między pierścieniami aromatycznymi A i B układ heterocykliczny (z atomem tlenu) γ -pironu, związki te mogą być uważane za pochodne benzo- γ -pironu, czyli chromonu [11].



Benzo - γ - piron

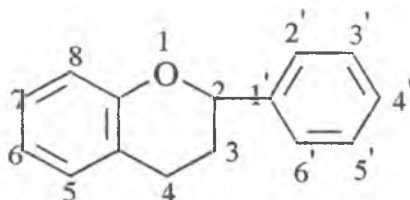
Dotychczas poznano w przyrodzie około 800 wariantów pochodnych wymienionego ugrupowania, a liczba ta stale rośnie.

Flawonoidy dzielą się na kilka grup o różnej strukturze podstawowej. Najważniejsze z nich to:

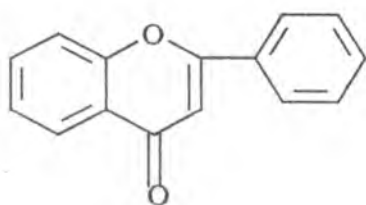
- flawony (np.: apigenina)
- flawanole (np.: (+)-katechina)
- flawonole (np.: kemferol, kwercetyna)
- flawanony (np.: hesperedyna)
- izoflawony (np.: genisteina)

W obrębie grupy związki te różnią się rodzajem i liczbą podstawników. Najczęściej są to grupy hydroksylowe, a także metoksyłowe [109]. Większość flawonoidów występuje w roślinach w postaci O-glikozydów i ma część cukrową złożoną z 1 do 5 cząsteczek cukrów prostych (glukoza, galaktoza, ramnoza); niektóre z nich występują w postaci C-glikozydów. W cząsteczce mogą również występować dwa aglikony połączone ze sobą bezpośrednim wiązaniem atomów węgla, lub poprzez atom tlenu – związki te zwane są biflawonoidami.

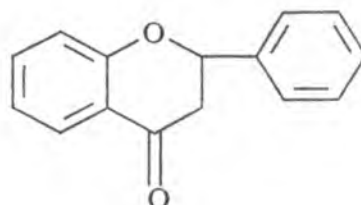
Podstawowe struktury flawonoidów przedstawiono poniżej [110].



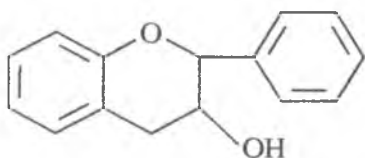
FLAWAN



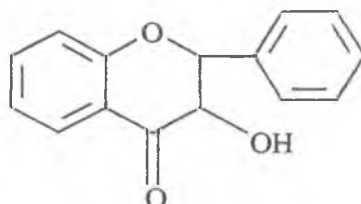
FLAWON



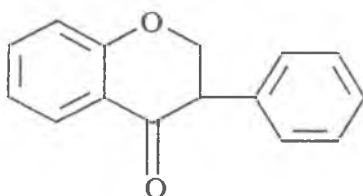
FLAWANON



FLAWANOL



FLAWONOL



IZOFLAWON

Występowanie

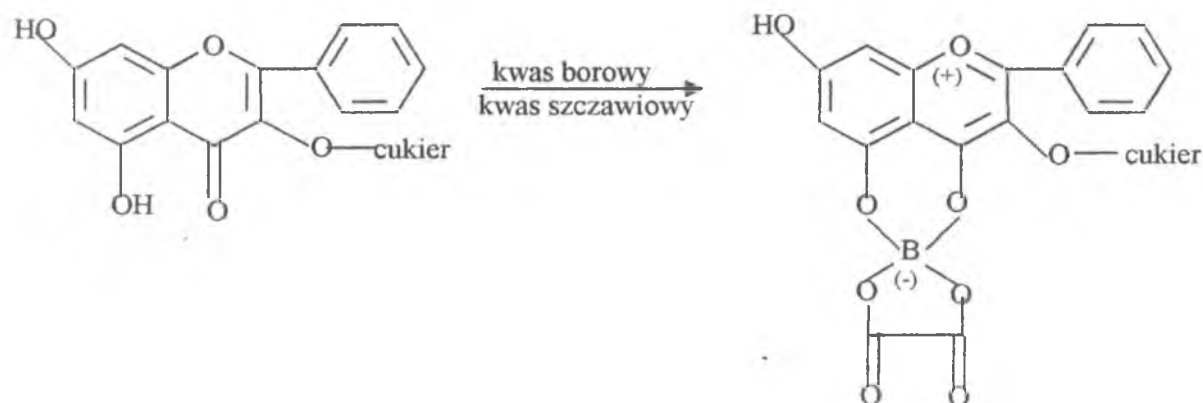
Flawonoidy są szeroko rozpowszechnionymi substancjami roślinnymi, szczególnie wśród roślin kwiatowych. Powszechnie występują u roślin jedno i dwuliściennych. Najczęściej flawonoidy występują jako żółte barwniki, rozpuszczone w soku komórkowym w kwiatach i liściach. Związki te dzięki temu, że silnie pochłaniają promieniowanie UV w zakresie 300 – 400 nm, mogą być naturalnym filtrem światła dla organelli komórek roślinnych [11].

Właściwości fizykochemiczne

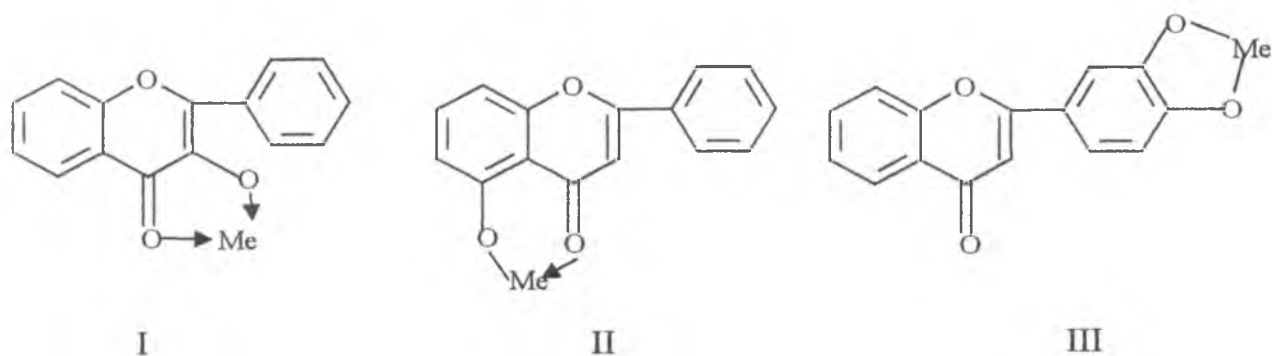
Flawonoidy są najczęściej żółtymi lub bezbarwnymi substancjami stałymi. W postaci glikozydów są na ogół rozpuszczalne w wodzie i alkoholu etylowym, są natomiast nierozpuszczalne w eterze, chloroformie i benzenie. Aglikony zaś są w wodzie prawie nierozpuszczalne, rozpuszczają się na ogół w rozpuszczalnikach organicznych. Większość glikozydów flawonoidowych rozpuszcza się w octanie etylu, co jest wykorzystywane przy preparatywnym otrzymywaniu tych związków. Ogólną cechą flawanoidów jest rozpuszczalność w alkaliach, z wytworzeniem żółtego zabarwienia.

Pod wpływem stężonego kwasu solnego i magnezu, na skutek redukcji, flawonoidy tworzą barwne połączenia typu antocyjanidyn o różnym zabarwieniu, np: flawony – pomarańczowe, flawonole – różowe, flawanony – różowofioletowe.

Również charakterystyczna dla flawonoidów jest reakcja z kwasem borowym, polegająca na tworzeniu się barwnego kompleksu w obecności kwasu szczawiowego, który po rozpuszczeniu w eterze wykazuje żółtozieloną fluorescencję.



Liczne odczynniki barwne, jak roztwory chlorku żelaza (III), chlorku glinu, tlenochlorku cyrkonu, są stosowane do wykrywania flawonoidów, tworząc barwne kompleksy chelatowe – główne zastosowanie mają w chromatografii bibułowej tych związków, przy czym plamy barwne są obserwowane zarówno w świetle widzialnym jak i nadfiolecie. Podczas powstawania kompleksu jon metalu i atomy grup podstawnikowych zamykają pierścień albo kilka pierścieni chelatowych. Pochodne hydroksylowe flawonów i flawanonów mają trzy możliwości kompleksowania jonów metali.



Największe zdolności kompleksotwórcze wykazują flawonoidy, które zawierają grupy hydroksylowe przy węglu 3, 5, 3', 4'. Najtrwalsze kompleksy powstają w układzie I.

W wykrywaniu flawonoidów bardzo pomocna jest ich fluorescencja w świetle UV (żółta – flawonole, izoflawony; brunatna – flawony i ich aglikony, glikozydy flawonolowe). Pod wpływem niektórych odczynników zasadowych fluorescencja żółta pogłębia się, a brunatna zmienia na żółtą. Szczególnie dogodnie jest stosowanie par amoniaku [110].

Właściwości biologiczne i farmakologiczne

Związki flawonoidowe wykazują silne właściwości antyoksydacyjne. Z tego względu pełnią ważną rolę w surowcach naturalnych, chroniąc przed utlenieniem kwas askorbinowy, witaminę E i inne substancje łatwo ulegające oksydacji. Aktywność przeciwutleniająca poszczególnych związków flawonoidowych jest różna i wynika z ich budowy tj. wzrasta wraz z liczbą grup hydroksylowych przy aromatycznym pierścieniu B. Szczególną aktywność antyoksydacyjną posiadają flawanole, pochodne flawan-3-olu. Związki te występują dość powszechnie w różnych częściach roślin jako monomery – katechiny i epikatechiny, w formie oligomerów i polimerów zawierających do 50 pojedynczych jednostek – zwanych garbnikami skondensowanymi [11].

Związki flawonoidowe uszczelniają i wzmacniają ściany naczyń krwionośnych. Zapobiegają powstawaniu zakrzepów dzięki hamowaniu agregacji płytek krwi. Wpływają również na krążenie w mięśniu sercowym, a także działają diuretycznie i spazmolitycznie.

Ponadto flawonoidy działają rozjaśniająco, zmiękczejaco, ściągająco oraz bakterio-, grzybo- i wirusobójczo. Działanie przeciwwirusowe związane jest z utrudnieniem penetracji wirusów przez błonę komórkową, blokowaniem replikacji ich materiału genetycznego oraz uszkodzaniem materiału do budowy białkowej kapsuły wirusa. Badania potwierdziły ten wpływ flawonoidów na namnażanie się wirusa HIV i opryszczki.

Flawonoidy wykazują również właściwości immunomodulujące. Pochodne flawonoidów zawierające grupę octanową z jednej strony stymulują układ immunologiczny, a z drugiej wykazują działanie kancerogenne. Zwiększają one produkcję interleukin likwidujących komórki rakowe. Niektóre flawonoidy wykazują właściwości blokujące namnażanie się komórek rakowych.

Związki flawonoidowe posiadają także właściwości przeciwzapalne, przeciwczerwieniowe i przeciwalergiczne (hamują uwalnianie histaminy, uszczelniają naczynia włosowate).

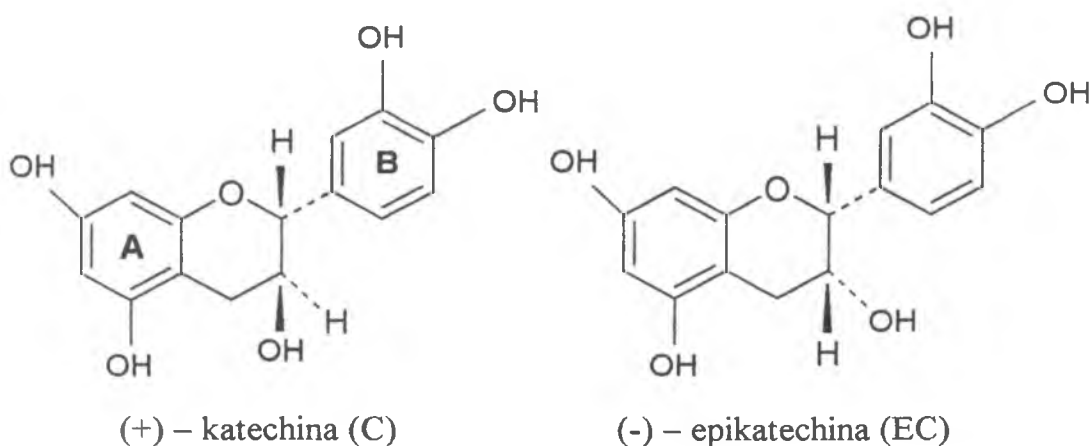
Ze względu na wspomniane właściwości związki flawonoidowe są składnikami licznych preparatów farmaceutycznych, zwłaszcza pod postacią wyciągów czy innych form galenowych [3,5,41].

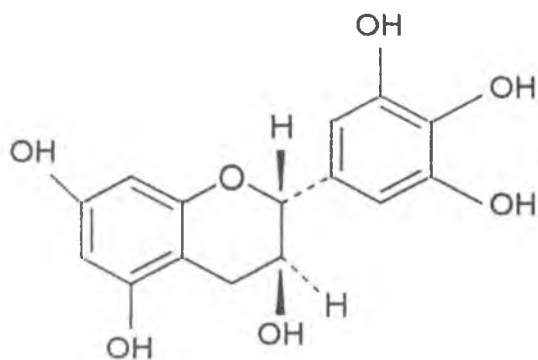
1.2.1. Właściwości (+)-katechiny i jej pochodnych

Katechiny, nazywane też flawan-3-olami są związkami o budowie flawanoidów, które w pozycji 3 pierścienia oksanowego zawierają grupę hydroksylową. Zawierają ponadto co najmniej cztery grupy hydroksylowe. Dwie znajdują się w pierścieniu A, a dwie w pierścieniu B. Katechiny posiadają zatem strukturę pentahydroksypolifenolu. Związki tego typu mogą mieć dwie różne konfiguracje: katecholową i epikatecholową. Katechiny i epikatechiny różnią się między sobą przestrzennym usytuowaniem grupy hydroksylowej przy węglu w pozycji 3.

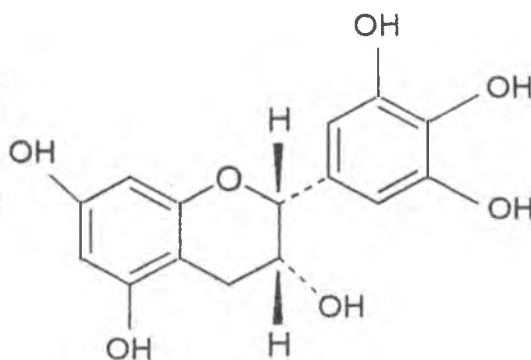
W pierścieniu B mogą znajdować się również trzy grupy hydroksylowe, a związek taki zwany jest galokatechiną. Ponadto grupy hydroksylowe katechin łatwo ulegają estryfikacji kwasem galusowym. Kwas ten estryfikuje grupę -OH przyłączoną do pierścienia oksanowego w pozycji 3. W wyniku tej reakcji powstają galusany katechin [111].

Wzór strukturalny dla katechin ustalił Freudenberg [33].

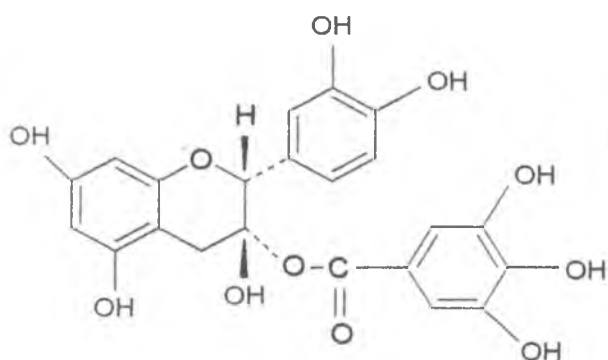




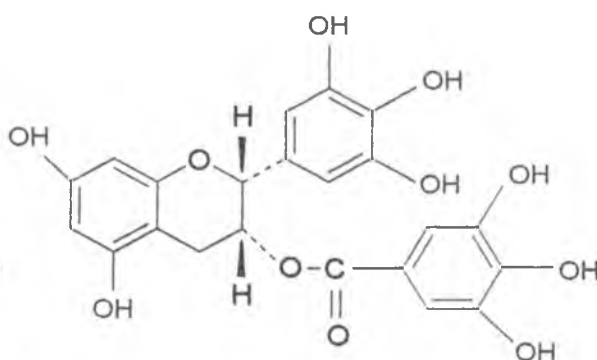
(+) – galokatechina (GC)



(-) – epigalokatechina (EGC)



(-) – galusan epikatechiny (ECG)

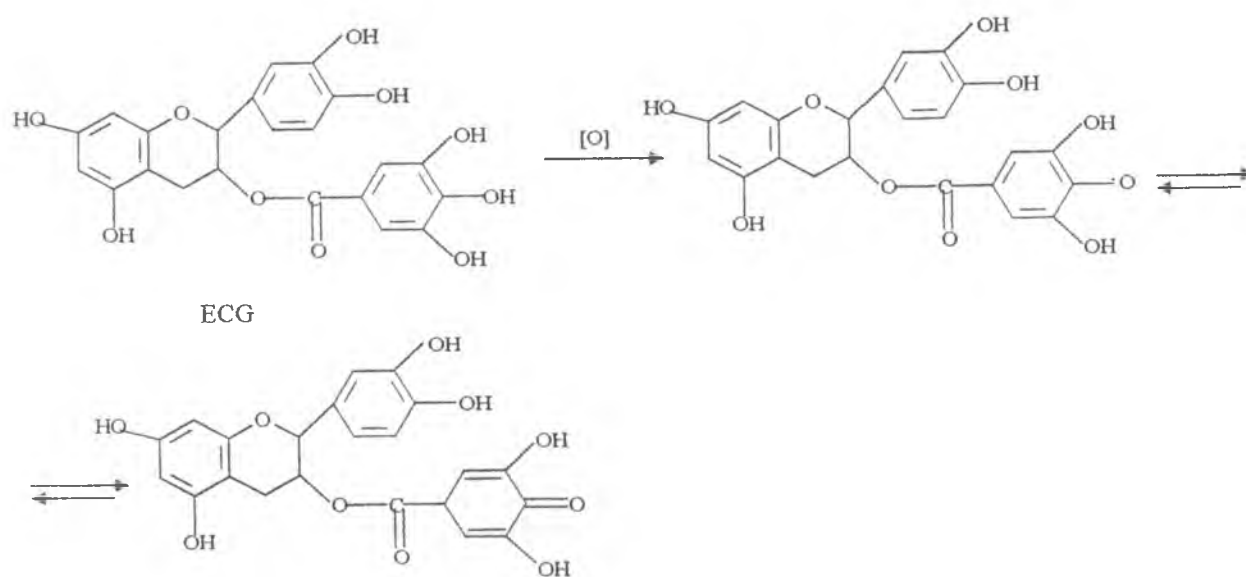
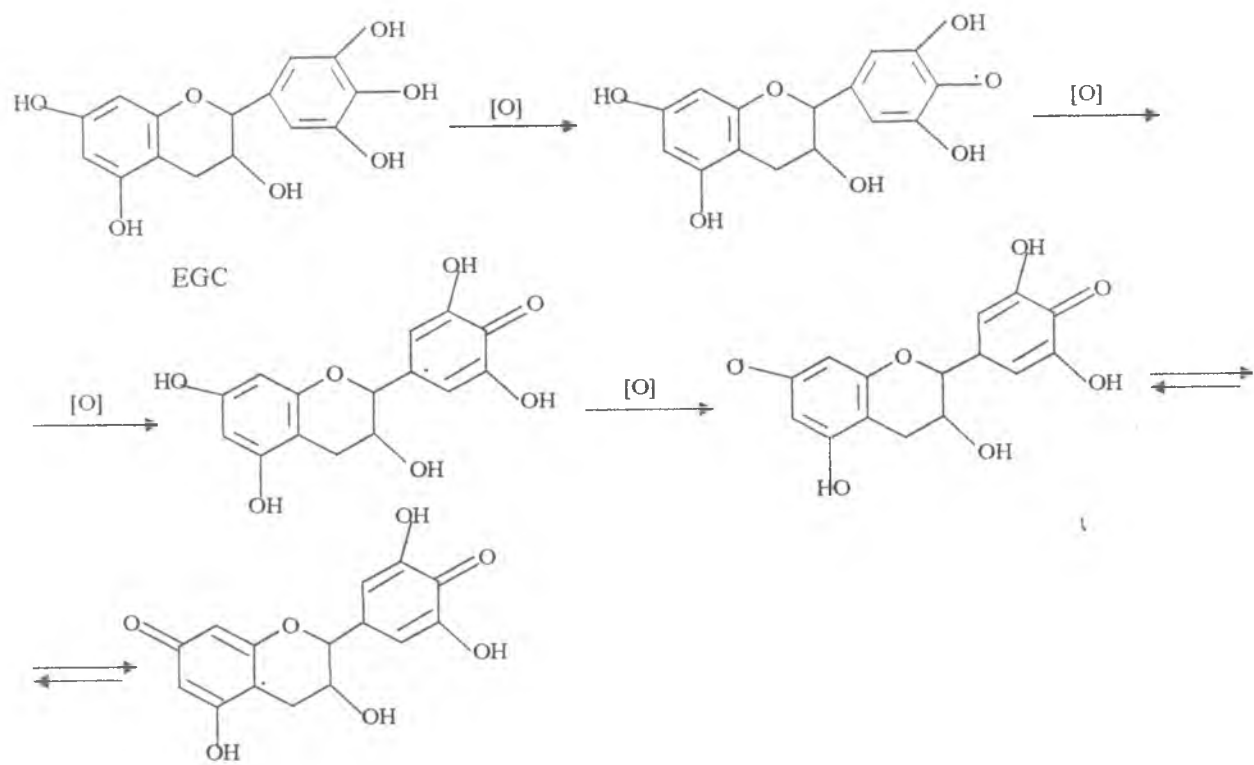
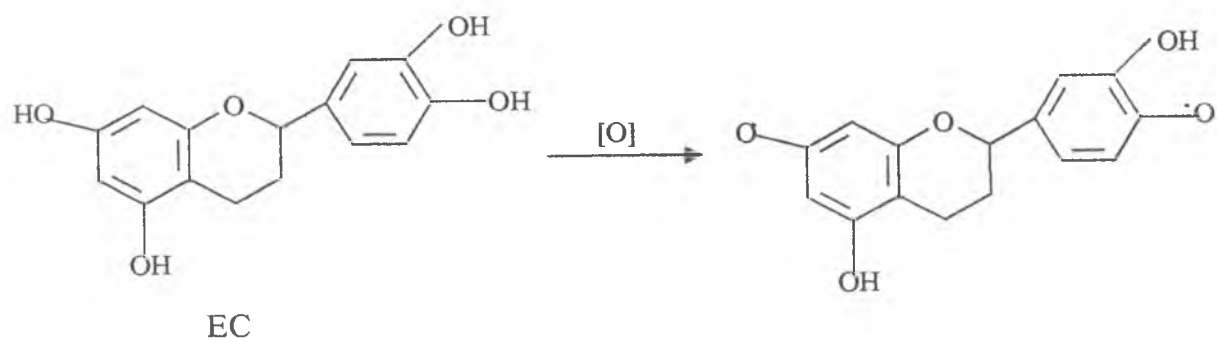


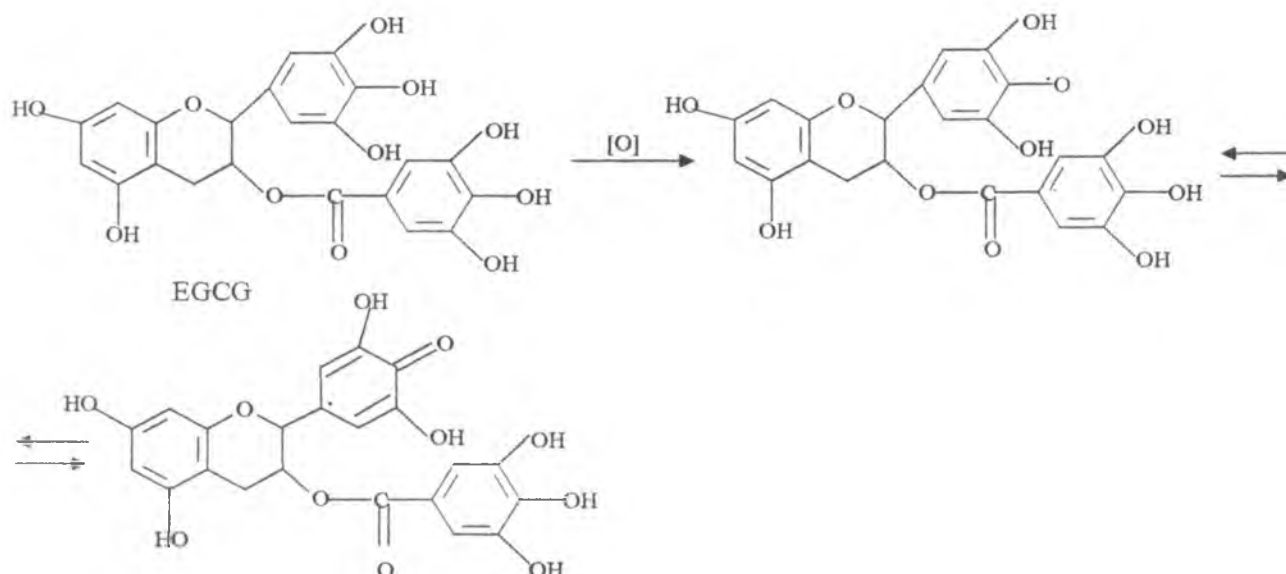
(-) – galusan epigalokatechiny (EGCG)

Katechiny i ich polimery obecne są w dużych ilościach w korze świerków, kasztana szlachetnego czy eukaliptusa. Owoce, w których występują to głównie aronia, wiśnie, czarne porzeczki, jabłka oraz winogrona. Z tych ostatnich wytwarzane jest wino, w którym zawartość polifenoli sięga 2 – 3 mg/l z czego 20% stanowi katechina i jej estry z kwasem galusowym, a 50% polimery katechiny (proantycyjanidyna i tanina). W pożywieniu bogatym źródłem katechin jest kakao i wykonywana z niego czekolada. Bogate w produkty kondensacji katechin są egzotyczne surowce i preparaty np. indyjskie znane pod nazwą Katechu i Kino. Najbardziej rozpowszechnionym i znanym źródłem katechin są liście herbaty (*Camellia sinensis*). Terapeutyczne działanie herbaty, zwłaszcza zielonej, wiąże się głównie z zawartymi w niej katechinami. Związki te posiadają właściwości antyoksydacyjne znacznie silniejsze niż związki dotychczas uważane za silne antyutleniacze takie jak np. glutation, kwas askorbinowy, tokoferol, butylohydroksytoluen czy mannitol. Zdolności antyoksydacyjne katechin wynikają z ich budowy. Posiadają one strukturę 3, 5, 7, 3', 4' – pentahydroksypolifenolu. Obecność tylu grup hydroksylowych nadaje katechinom silne właściwości antyoksydacyjne. O zdolnościach antyoksydacyjnych w największym stopniu decyduje obecność dwóch

grup hydroksylowych w pierścieniu B przy węglu 3' i 4'. Stwierdzono, że zdolności antyoksydacyjne grupy hydroksylowej w pozycji 5' zależą od warunków otoczenia – w środowisku lipofilowym grupa ta nie wpływa na potencjał antyoksydacyjny, natomiast w środowisku wodnym może zwiększyć zdolności antyoksydacyjne katechin. Aktywność antyoksydacyjna katechin zależy również od ich stereochemii. Epikatechiny mimo niewielkiej różnicy w budowie, wykazują znacznie większe zdolności antyutleniające. W związku z tym najsilniejsze właściwości antyoksydacyjne wykazuje galusan epigalokatechiny i galusan epikatechiny, a mniejsze odpowiednio epigalokatechina, epikatechina, katechina i kwas galusowy. Zdolności redukcyjne katechin są ściśle uzależnione od pH środowiska. Epigalokatechina wykazuje wyższy potencjał redukcyjny w roztworach o kwaśnym pH niż w roztworach o odczynie obojętnym czy zasadowym, natomiast inne katechiny wykazują tendencję odwrotną i w środowisku kwaśnym mają niższy potencjał redukcyjny niż w pH obojętnym i zasadowym. Na podstawie badań stwierdzono, że antyoksydacyjne działanie ekstraktu katechin jest znacznie silniejsze niż wynikałoby to z działania pojedynczych związków. Właściwości antyoksydacyjne katechin objawiają się przede wszystkim zdolnością do hamowania generacji wolnych rodników, wychwytywania wolnych rodników oraz chelatowania jonów metali ciężkich będących katalizatorami reakcji wolnorodnikowych. Rodniki katechinowe mają niższe potencjały redoks niż wolne rodniki tlenowe, dlatego katechiny mogą wychwytywać powstające w organizmie wolne rodniki takie jak: rodnik hydroksylowy, anionorodnik ponadtlenkowy, rodniki nadktlenkowe i lipidowe. Zdolność katechin do wychwytywania rodników związana jest z posiadaniem struktury di- lub trihydroksylowej pierścienia B, która zapewnia stabilizację formom rodnikowym. Katechiny, ze względu na zdolność chelatowania jonów metali przejściowych (żelaza i miedzi) biorących udział w reakcjach wolnorodnikowych, obniżają stężenie tych jonów w organizmie. Zdolność do chelatowania jonów Fe^{2+} posiadają cztery z katechin, przy czym najsilniejsze właściwości chelatujące posiada EGCG, mniejsze działanie wykazuje EGC, a najmniej ECG i EC [6,110,111].

Mechanizmy reakcji wychwytywania rodników tlenowych przez poszczególne katechiny przedstawiają poniższe schematy:





Przegląd metod oznaczania (+)-katechiny

Tabela 7. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV - VIS

Wybrane parametry metody	Analizowany material	Lit.
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\max} = 425 \text{ nm}$) kompleksu powstałego w reakcji analitu z azotynem sulfanilowym	kielki herbaty	112
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\max} = 637 \text{ nm}$) kompleksu powstałego w reakcji analitu z 4-dimetyloamino aldehydem cynamonowym (DMACA)	suma katechin w osoczu	113
Pomiar absorbancji związku kompleksowego powstałego po zmieszaniu metanolowych roztworów (+)-katechiny i FeCl_3 , w środowisku alkalicznym (25% roztwór amoniaku), ($\lambda_{\max} = 560 \text{ nm}$)	preparat farmaceutyczny Catergen	114
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\max} = 500 \text{ nm}$) produktu reakcji analitu z 12% metanolowym roztworem waniliny	ocet winny	115
Pomiar absorbancji produktu reakcji analitu z: -4-aminofenolem ($\lambda_{\max} = 600 \text{ nm}$) -rezorcynolem ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$) -kwasem fosfomolibdenowym ($\lambda_{\max} = 680 \text{ nm}$) -odczynnikiem Folin Ciocalteu ($\lambda_{\max} = 650 \text{ nm}$) -dichlorowodorkiem p-fenylendiaminy ($\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$)	preparaty farmaceutyczne	116

Tabela 8. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej

Wybrane parametry metody	Analizowany material	Lit.
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F_{254} (HPTLC), celuloza F -faza ruchoma: chloroform–mrówczan etylu–kwas mrówkowy, (50:40:10) -detekcja: densytometryczna, $\lambda_{\max} = 277 \text{ nm}$	material roślinny (Pale catechu)	117

-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 -faza ruchoma: octan butylu–kwas mrówkowy–woda, (18:1:1) -detekcja: spryskanie 1% roztworem waniliny w stężonym HCl, pomiar densytometryczny przy $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$,	preparat farmaceutyczny - Catergen	114
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G 60, na podłożu aluminiowym -faza ruchoma: octan butylu–kwas mrówkowy–woda, (16:1:1) -detekcja: spryskanie 1% roztworem waniliny w stężonym HCl, pomiar densytometryczny przy $\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$,	material roślinny (kora drzew i krzewów)	118
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy chemicznie modyfikowany (HPTLC CN, HPTLC NH ₂ , HPTLC RP-18W) -faza ruchoma: aceton-lodowaty kwas octowy, (93:7) oraz woda-metanol-kwas mrówkowy, (84:15:1) oraz woda-dioksan, (10:1) oraz 15% kwas octowy oraz toluen-mrówczan etylu-kwas mrówkowy, (5:4:1)	material roślinny - kora	119
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ -faza ruchoma: octan etylu-woda-kwas mrówkowy-kwas octowy, (25:4:0,6:0,4) -detekcja: densytometryczna $\lambda_{\text{max}} = 254 \text{ nm}$	material roślinny	120
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy -faza ruchoma: chloroform-mrówczan etylu -n-butanol-kwas mrówkowy -detekcja: światło UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$), pomiar powierzchni plam	zielona herbata	121
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (HPTLC) -faza ruchoma: chloroform-octan etylu-metanol-toluen-kwas mrówkowy, (6:4:2:1:1) -detekcja: densytometryczna $\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$	zielona herbata, Pale catechu	122

Tabela 9. Inne metody oznaczania (+)-katechiny.

Metoda	Analizowany material	Lit.
Spektrometria w podczerwieni (NIR)	herbata	123
Kapilarna elektroforeza	herbata	92, 124
Chromatografia cieczowa z spektrometrią mas	herbata (zielona, czarna)	125
Chromatografia gazowa z spektrometrią mas	osocze krwi	126
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	wino	127
	nasiona kakaowca	128
	osocze krwi	129
	pestki wingron	130
	herbata: zielona, oolong, pu – erh, czarna	od 100 do 104
Micelarna chromatografia elektrokinetyczna	zielona i czarna	105
Woltamperometria i amperometria		131
Amperometria i potencjometria	wino	132

1.3. Garbniki

Definicja i klasyfikacja

Garbniki to polifenolowe, wielkocząsteczkowe (masa cząsteczkowa od 500 do 3000), bezazotowe substancje naturalne. Są to związki o różnej budowie chemicznej, które łączy szereg wspólnych właściwości tj. działanie ściągające, zdolność wiązania się z białkami, metalami ciężkimi i alkaloidami. Substancje te są od dawna stosowane do garbowania skóry, czyli przemiany surowej skóry zwierzęcej w rzemień albo trwałą skórę przemysłową. Rozróżnia się dwa typy związków garbnikowych:

a) garbniki hydrolizujące (pirogalolowe, tanoidy) – zawierają w swej cząsteczce cukry lub alkohole wielowodorotlenowe, zestryfikowane cząsteczkami kwasu galusowego (galotaniny), elagowego (elagotaniny), lub innych polifenolokwasów (np.: pochodnymi kwasu kawowego)

b) garbniki nie hydrolizujące (skondensowane, pirokatechinowe) – są zbudowane z cząsteczek flawanów, głównie katechin, leukoantocyjanidyny i ich analogów. W środowisku słabo kwaśnym związki te ulegają łatwo polimeryzacji lub polikondensacji, przechodząc w bezpostaciowe, rozpuszczalne w wodzie oligomery.

Zasadnicza różnica między obu grupami wynika z reakcji w środowisku kwaśnym. Tanoidy ulegają hydrolizie do fenolokwasów, cukrów bądź alkoholi wielowodorotlenowych, a garbniki skondensowane pod wpływem czynników hydrolizujących tworzą polimery wysokocząsteczkowe, nazywane flobafenami, o zabarwieniu czerwono-brunatnym [6,11,133-135].

Występowanie

Garbniki są szeroko rozpowszechnione w świecie roślinnym. Nie występują one pojedynczo, lecz w skomplikowanych mieszaninach, różnych w zależności od wieku i okresu wegetacji rośliny. Związki hydrolizujące występują rzadziej niż skondensowane i znajdują się głównie w roślinach nagozalążkowych i okrytozalążkowych. Garbniki skondensowane występują przede wszystkim w roślinach naczyniowych.

Typowo garbnikowymi surowcami są: kłącze wężownika, liście orzecha włoskiego, owoc borówki czernicy, kłącze pięciornika, liście herbaty i kora dębowa.

W pożywieniu bogatym źródłem garbników jest kakao, czerwone wino i herbata. Bogate w tego typu związki są owoce, np.: jabłka, truskawki, żurawiny, winogrona. W niedojrzałych owocach jest ich znacznie więcej niż w dojrzałych, zaś w przetworach owocowych ilość garbników jest znacznie mniejsza, niż w surowcu, gdyż są to związki niestabilne i ulegają znacznym stratom w procesie przetwarzania [11,136,137].

W roślinach garbniki odgrywają rolę substancji obronnych przed bakteriami, grzybami patogennymi i zwierzętami trawożernymi.

Właściwości fizykochemiczne

Garbniki są związkami stałymi, bezpostaciowymi, o słabo kwaśnym odczynie i cierpkim, ściągającym smaku. Substancje te dobrze rozpuszczają się w wodzie, metanolu, etanolu oraz acetonie, natomiast nie rozpuszczają się w eterze, chloroformie i benzenie. Związki te tworzą osady z solami metali ciężkich, alkaloidami, białkami, żelatyną, śluzami i pektynami. Ogólną reakcją barwną garbników jest tworzenie ciemnoniebieskich lub zielonych połączeń z solami żelaza (III). Garbniki nie są związkami trwałymi i w wyniku samokondensacji, enzymatycznej polimeryzacji i utleniania tlenem z powietrza, bezbarwne lub zwykle słabo zabarwione związki, przechodzą w ciemno zabarwione, trudniej rozpuszczalne, fizjologicznie mniej czynne produkty oksydacji i kondensacji, zwane flobafenami [6,11,138].

Spośród wielu reakcji służących do wykrywania garbników kilka należy do szerzej stosowanych. Garbniki odróżnić można od innych związków za pomocą reakcji z żelatyną. Reakcja polega na tworzeniu połączeń addycyjnych grup fenolowych garbników z grupami aminowymi lub amidowymi cząsteczek białka. W celu stwierdzenia obecności garbników stosowany jest również odczynnik Mitchella (siarczan żelaza (III), winian sodowo – potasowy). Po dodaniu do wyciągu odczynnika i octanu sodu, ogrzaniu, a następnie ochłodzeniu, wytrąca się purpurowy, fioletowy lub czarny osad, nierozpuszczalny w gorącej wodzie, etanolu i roztworze amoniaku.

Garbniki hydrolizujące odróżnia od skondensowanych zdolność do hydrolizy pod wpływem kwasów, zasad lub enzymu tannazy. Garbniki obu grup odróżnić można również na podstawie wielu reakcji, z których najważniejsze to:

- reakcja z solami żelaza (III) – garbniki hydrolizujące dają zabarwienie niebieskie, garbniki skondensowane – zielone. Wynik reakcji zależy jest od położenia grup hydroksylowych w pierścieniu benzenowym. W przypadku występowania obu grup garbników, nawet mała ilość garbników hydrolizujących daje zabarwienie granatowe, maskujące barwę zieloną. Reakcja ta jest mało specyficzna, gdyż inne związki zawierające grupy hydroksylowe mogą reagować w podobny sposób.
- reakcja z waniliną w kwasie solnym – garbniki skondensowane dają czerwonomalinowe zabarwienie. W obecności wyłącznie garbników hydrolizujących zabarwienie nie występuje.
- reakcja z formaldehydem i kwasem solnym – powstanie osadu (po gotowaniu przez pół godziny), wskazuje na obecność garbników skondensowanych
- reakcja z wodą bromową – garbniki skondensowane dają osady, natomiast hydrolizujące tworzą połączenia rozpuszczalne, wytrącające się dopiero przy nadmiarze bromu.

Wyniki tych reakcji rzadko są całkowicie jednoznaczne, zwłaszcza w przypadku mieszanki różnych garbników. Z tego względu zachodzi potrzeba stosowania kilku różnych prób w celu otrzymania pewnych wyników badań [110,133].

Właściwości biologiczne i farmakologiczne

Działanie farmakologiczne garbników łączy się z ich ogólnymi właściwościami łączenia się z białkami. Ścinają one powierzchownie śluzówkę, tworząc nierozpuszczalną warstwę ochronną, szczególnie w miejscach uszkodzonych lub podrażnionych. Śluzówka traci swą normalnie miękką konsystencję, kurczy się, zapobiegając powstawaniu stanów zapalnych pod wpływem bodźców chemicznych, bakteryjnych bądź mechanicznych. Garbniki odwadniają włókna nerwowe, działają słabo znieczulająco, znoszą odruchy bólowe, jak pieczenie, i swędzenie, towarzyszące stanom zapalnym. Działają także przeciwprzebiegowo, przeciwobrzękowo i przeciwzapalnie. Garbniki denaturują również białka krwi, aglutynują krwinki, ułatwiają powstawanie skrzepów włóknikowych.

Utrudniając przepływ przez kapilary związki garbnikowe hamują przenikanie do głębszych warstw skóry i do krążenia trujących produktów rozpadu tkanek oraz hamują wchłanianie ze światła przewodu pokarmowego metabolitów pokarmowych lub toksyn pochodzenia bakteryjnego.

Zdolność łączenia się garbników z pewnymi związkami – nie zawsze jest korzystna dla zdrowia, gdyż powstające kompleksy są czasami formą unieczynniania cennych składników pożywienia tj. niektóre witaminy (B₁) oraz pierwiastki (Mg, Ca, Fe, Zn, Se, Mn). Garbniki tworząc wiązania z alkaloidami (berberyna, strychnina, papaweryna) oraz metalami ciężkimi (Pb, As, Cr, Cd) chronią organizm przed zatruciami.

Z powinowactwem garbników do białek wiąże się ich aktywność przeciwwirusowa. W doświadczeniach nad zwierzętami wykazano, że hamują one replikację wirusa HIV oraz jego adsorpcję na powierzchni komórek, a także hamują wzrost wirusa opryszczki.

Garbniki wykazują aktywność przeciwutleniającą. Pochodne kwasu elagowego i oligomery garbników skondensowanych posiadają silne działanie wychwytyjące wolne rodniki, znacznie silniejsze niż kwas askorbinowy i tokoferole.

• Pochłanianie promieniowania UV w zakresie 240 – 290 nm i częściowo w zakresie 290 – 320 nm przez garbniki chroni organizm ludzki przed szkodliwymi skutkami promieniowania nadfioletowego i przed promieniowaniem jonizującym. Ponadto garbniki wiążą promieniotwórczy stront i neutralizują wolne rodniki będące skutkiem promieniowania.

W obecności niektórych czynników mutagennych i kancerogennych, np. benzopirenu, garbniki działają ochronnie, wiążąc się z jego rakotwórczą pochodną, która działa na DNA wywołując mutacje.

Zewnętrznie stosuje się surowce garbnikowe w postaci wyciągów wodnych lub alkoholowych nalewek, do: płukanek, przemywań i pędzlowań skóry oraz błon śluzowych, w zranieniach powierzchniowych, otarciach naskórka, oparzeniach, odmrożeniach, w opryszczce, zapaleniu dziąseł, anginie i innych infekcyjnych stanach zapalnych jamy ustnej. W zastosowaniu wewnętrznym surowców garbnikowych używa się głównie jako leki przeciwbiegunkowe. Najczęściej używa się połączenia garbników z białkami (np. białczan taniny), które wolno uwalniają garbnik nie drażniąc błony śluzowej żołądka.

Dostarczenie organizmowi zbyt dużej ilości garbników jest niepożądane. Omawiane substancje nadmiernie wiążąc żelazo mogą przyczynić się do powstawania anemii. Mogą też powodować podrażnienia błon śluzowych żołądka i jelit, wywołać biegunki lub zaparcia na przemian. Garbniki hydrolizujące wykazują w większych dawkach działanie hepatotoksyczne. Uszkodzenie wątroby może wystąpić nawet po

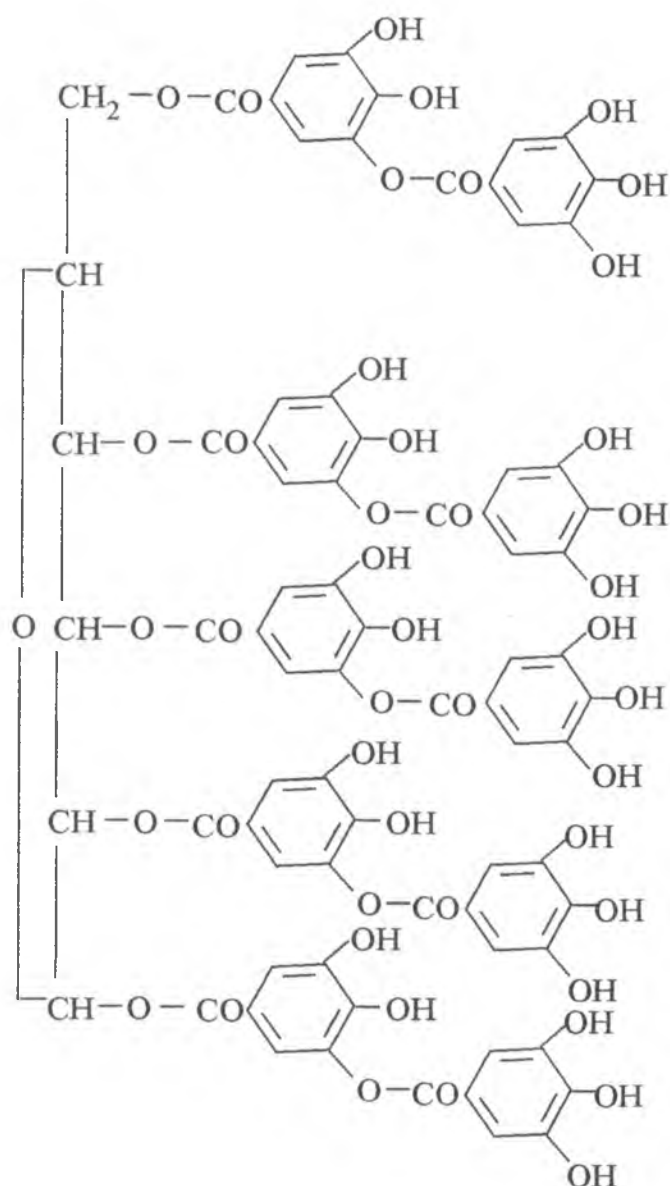
zewnątrznym zastosowaniu garbników na rozległe uszkodzenia skóry i błon śluzowych. Następuje wtedy wchłonięcie garbników do krwioobiegu przez pęknięte naczynka włosowate, co daje możliwość uszkodzenia wątroby. Garbniki są również toksyczne po wstrzyknięciu do krwioobiegu, gdyż wytrącają białka krwi. Są to więc związki, które zarówno w lecznictwie, jak i w pożywieniu powinny być stosowane z umiarem [7,11,133,137,139]. Preparaty farmaceutyczne zawierające garbniki powinny być standaryzowane, aby zapewnić stałość ich składu, skuteczność i bezpieczeństwo stosowania.

W kosmetyce garbników używa się w kąpielach przeciwpotowych, do produkcji mydeł leczniczych i szamponów przeciwłupieżowych, do przeciwłojotokowych i przeciwtrądzikowych maseczek kosmetycznych oraz w kremach chroniących skórę przed promieniami UV [3].

1.3.1. Kwas taninowy

Tanina to jeden z najbardziej pospolitych garbników. Jest glikozydem kwasu galusowego i glukozy, otrzymywanym z dębianek – patologicznych narośli na liściach dębów, wywoływanych przez pasożytnicze owady. Taninę turecką otrzymuje się z dębianek zbieranych z liści dębu *Quercus infectoria*, wywoływanych przez czerwie błonkówki, a taninę chińską z dębianek na liściach sumaku *Rhus semialata*, powodowanych przez mszyce. Na liściach dębów rosnących w Polsce błonkówka powoduje również tworzenie dębianek, lecz o znacznie mniejszej zawartości taniny [136].

Wydzielona i oczyszczona tanina ma postać żółtego, białego lub brunatnego, bezpostaciowego proszku. Jest bezwonna lub o słabym zapachu i cierpkim, ściągającym smaku. Substancja bardzo łatwo rozpuszcza się w wodzie, acetonie, alkoholu etylowym oraz 80% glicerolu, natomiast bardzo trudno rozpuszcza się w benzenie, chloroformie i eterze dietylowym [32]. Taninę zwykle opisuje się wzorem sumarycznym $C_{76}H_{52}O_{46}$. Poszczególne gatunki taniny mogą różnić się ilością reszt kwasu galusowego lub jego pochodnych estryfikujących glukozę. Kwas taninowy można opisać następującym wzorem strukturalnym:



Kwas taninowy ze względu na swoje właściwości ściągające, przeciwzapalne, zapierające i hamujące drobne krwawienia, jest stosowany zewnętrznie pod postacią etanolowych wyciągów i nalewek np.: do pędzlowania dziąseł, na drobne skaleczenia, do płukania gardła przy anginie. Tanina drażni przewód pokarmowy i uszkadza wątrobę, rzadko bywa więc podawana wewnętrznie, natomiast w biegunce, niezycie żołądka, małych krwawieniach oraz zatruciach pokarmowych stosuje się jej połączenie z białkiem - Tanninum albuminatum (białczan taniny), działający łagodniej [140,141].

W kosmetyce tanina jest składnikiem preparatów stosowanych przeciw nadmiernemu poceniu się, a ponadto preparatów używanych w przypadkach oparzeń słonecznych oraz odmrożeń, co jest związane z jej właściwościami przeciwzapalnymi. Obecność taniny w takich preparatach prowadzi do wytworzenia na powierzchni

podrażnionej skóry powłoki ochronnej w formie skoagulowanego białka. W obrębie utworzonej powłoki naczynia krwionośne kurczą się, co zmniejsza wysięki i ogranicza obszar objęty ogniskiem stanu zapalnego [41].

Przegląd metod oznaczania kwasu taninowego

Tabela 10. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV - VIS

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
Kwas taninowy utleniano Br_2 , którego nadmiar był redukowany I^- tworząc I_2 . Stężenie powstałego I_2 rozpuszczonego w etanolu oznaczano przez pomiar absorbancji próby przy $\lambda_{\text{max}} = 289 \text{ nm}$	dębianki	142
Kinetyczno – spektrofotometryczna metoda oparta na katalizującym efekcie jaki kwas taninowy wywiera na utlenianie czerwieni propylowej za pomocą KIO_3	preparaty chińskiej medycyny naturalnej	143
W oznaczaniu kwasu taninowego wykorzystano odczynnik Folin – Ciocalteu, ($\lambda_{\text{max}} = 760 \text{ nm}$)	materiał roślinny	143
	wino	145
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\text{max}} = 527 \text{ nm}$) produktu reakcji analitu z błękitem tetrazoliowym w środowisku zasadowym (2M NaOH)	herbata	146
Pomiar absorbancji ($\lambda_{\text{max}} = 600 \text{ nm}$) produktu reakcji analitu z 0,2% metolem i 5 M $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$		147
Białko reaguje z analitem (bufor octanowy), powstały kompleks ulega hydrolizie (13,5M NaOH, 120 °C, 20 min.), a następnie po zakwaszeniu reaguje z roztworem ninhydryny. Pomiar absorbancji przy $\lambda_{\text{max}} = 570 \text{ nm}$	liście dębu	148

Tabela 11. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G -faza ruchoma: chloroform-octan etylu-kwas octowy (50:50:1) -detekcja: pary jodu, chlorek żelaza (III)		149
-faza stacjonarna: Silufol -faza ruchoma: benzen-metanol-bezwodny kwas octowy, (45:8:15) -detekcja: zdrapywano plamki analitu, wymywano gorącą wodą, dodawano 1% roztwór molibdenianu amonu i bufor octanowy, pomiaru absorbancji dokonywano przy ($\lambda_{\text{max}} = 364 \text{ nm}$)		150

Tabela 12. Inne metody oznaczania kwasu taninowego.

Metoda	Analizowany materiał	Lit.
Spektrometria absorpcji atomowej (AAS)	wino	151
Chemiluminescencja	preparaty farmaceutyczne, mocz, woda	152
Kapilarna elektroforeza	oliwa z oliwek	153
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	głyny biologiczne	154
	piwo	155
	próbki biologiczne: mocz, surowica krwi, jelita	156
Amperometria	herbata, dębianki	157
Woltamperometria	wino	107
Polarografia	materiał roślinny	158

1.4. Wyodrębnianie związków fenolowych z materiałów roślinnych

Rozdrobniony surowiec roślinny na wstępie odtłuszcza się w aparacie Soxhleta, eterem naftowym. Do dalszych badań stosuje się najczęściej wyciągi wodne (wrząca woda) lub alkoholowe. Garbniki z materiału roślinnego można również ekstrahować 60 – 80 % acetonem, po czym zagęszczony wyciąg rozpuszczać w wodzie.

Wyciągi z surowców roślinnych zawierają obok garbników związki towarzyszące, które mogą reagować z wieloma odczynnikami w sposób podobny do garbników. Z tego względu zachodzi potrzeba wstępnego oczyszczenia wyciągu. W tym celu stosuje się ekstrakcję eterem etylowym i octanem etylu. Ekstrakcja eterem pozwala na oddzielenie wolnego kwasu galusowego i flawonoidowych połączeń nieglikozydowych, ale równocześnie powoduje rozpuszczenie się w eterze niektórych związków garbnikowych. Ekstrakcja octanem etylu prowadzi do usunięcia z wyciągu flawonoidów oraz garbników hydrolizujących, a także częściowo i garbników katechinowych. Ze względu na różną budowę chemiczną, zarówno metody wstępnego oczyszczania, jak i dalszego rozdziału wyciągów garbnikowych powinny być dobierane indywidualnie dla każdego surowca [110,138,159].

Sporządzanie wyciągów z materiału roślinnego do badania obecności kwasów fenolowych jest różne i zależy od substancji towarzyszących. Fenolokwasy ze względu na rozpuszczalność znajdują się w ekstrakcie alkoholowym lub wodnym, obok cukrów, glikozydów, garbników i innych składników rozpuszczalnych w wodzie i alkoholu.

Stosunkowo najprostszą metodą zapewniającą jednocześnie rodzimą postać składników jest ekstrakcja świeżego surowca po uprzedniej stabilizacji alkoholem. Stabilizowany surowiec suszy się lub przeprowadza wyczerpującą ekstrakcję 80 – 85% wrzącym metanolem lub etanolem. Należy jednak wziąć pod uwagę, że dłuższy kontakt surowca z alkoholem może powodować estryfikację. Z otrzymanego wyciągu oddestylowuje się rozpuszczalnik a pozostałość wytrawia porcjami gorącej wody, po czym odstawia na 24 h w temperaturze pokojowej w celu wytrącenia substancji balastowych. Przesącz wodny odtłuszcza się eterem naftowym oraz dodatkowo przemywa chloroformem w celu usunięcia resztek chlorofilu i żywic. Następnie roztwory wodne ekstrahuje się wyczerpująco eterem dietylowym. Z połączonych wyciągów eterowych oddestylowuje się rozpuszczalnik i wyodrębnia frakcje zawierające wolne kwasy fenolowe. Pozostały roztwór wodny poddaje się hydrolizie – kwasowej i zasadowej, celem wyizolowania reszty kwasów fenolowych uwolnionych w wyniku hydrolizy. Nowoczesne metody wyodrębniania kwasów fenolowych z surowego ekstraktu obejmują wstępne oczyszczanie (usuwanie balastów) za pomocą chromatografii rozdzielczej kolumnowej (żel krzemionkowy, celit) oraz jonowymiennej przy jednoczesnej kontroli toku oczyszczania przez chromatografię bibułową. Na tej drodze udaje się niejednokrotnie uzyskać rozdzielenie na szereg frakcji, z których wyodrębnienie poszczególnych kwasów opiera się na ponownym zastosowaniu chromatografii kolumnowej, bibułowej preparatywnej oraz zastosowaniu zwykłych metod analizy jakościowej [160,161].

2. Alkaloidy – właściwości, metody oznaczania.

Definicja i podział klasyfikacyjny

Nazwę alkaloid przypisuje się roślinnym substancjom azotowym o charakterze zasadowym, o mniej lub bardziej silnym działaniu fizjologicznym, których fragment azotowy zawiera heterocykliczny azot i biogenetycznie pochodzi z aminokwasu lub substancji będącej bezpośrednią pochodną aminokwasu (np. odpowiedniej aminy), a także kwasu nikotynowego lub antranilowego. Substancje te są zaliczane do tzw. wtórnej przemiany materii u roślin. Jednakże należy wspomnieć, że:

- są znane również związki alkaloidowe u zwierząt (np. samandaryna u salamandry)
- nie wszystkie alkaloidy mają charakter zasadowy, niekiedy są to związki obojętne (np. niektóre puryny, kolchicina),
- do alkaloidów zaliczamy również zasadowe substancje azotowe, nie mające azotu w pierścieniu heterocyklicznym, np. efedryna [11]

Wskutek skomplikowanej budowy alkaloidów nie można przeprowadzić wyraźnego i jednoznacznego ich podziału w oparciu o strukturę chemiczną. Za podstawę klasyfikacji chemicznej przyjmuje się najczęściej budowę głównego, zawierającego azot, układu cząsteczki alkaloidu. Zgodnie z takim założeniem alkaloidy dzielimy na następujące grupy [33]:

- 1) alkaloidy zawierające azot nie wchodzący w skład pierścienia, np.: L-efedryna, meskalina, gordenina, kolchicina.
- 2) pochodne pirolu, np.: pirolidyna, N-metylopirolidyna
- 3) pochodne 1-metylopirolizydyny, np.: platyfilina
- 4) pochodne pirydyny i piperydyny, np.: koniina, arekaidyna, arekolina, alkaloidy lobelii
- 5) alkaloidy zawierające nieskondensowane pięcio- i sześcioczłonowe pierścienie azotowe, np.: nikotyna
- 6) alkaloidy z dwoma nieskondensowanymi sześcioczłonowymi pierścieniami zawierającymi azot, np.: anabazyna
- 7) alkaloidy o skondensowanych pięcio- i sześcioczłonowych pierścieniach zawierających azot, np.: atropina, kokaina
- 8) alkaloidy zawierające dwa skondensowane pierścienie piperydynowe, np.: pseudopelletieryna

- 9) pochodne chinoliny, np.: chinina, cynchonina, chinidyna, cynchonidyna
- 10) pochodne izochinoliny, np.: morfina, kodeina, tebaina; alkaloidy grupy kurary; cefalina, emetyna
- 11) pochodne indolu, np.: strychnina i brucyna
- 12) pochodne imidazolu, np.: pilokarpina
- 13) alkaloidy zawierające układ purynowy, np.: teobromina, teofilina, kofeina
- 14) alkaloidy sterydowe (pochodne cyklopentenofenantrenu), np.: solanina; alkaloidy ciemiężycy

Występowanie

Alkaloidy występują przede wszystkim wśród organizmów roślinnych. Szczególnie często spotykamy je u jednoliściennych (zwłaszcza traw i liliowców) oraz dwuliściennych. [162,163]. Alkaloidy występują najczęściej w pewnych określonych częściach rośliny, na przykład alkaloidy krzewu herbacianego w liściach [11].

Zawartość alkaloidów w roślinie jest różna, zależnie od rejonu, klimatu, pory roku, nasłonecznienia i czasu zbioru. Ocenia się, że synteza alkaloidów zachodzi w 15 – 20% wszystkich gatunków roślin [162].

Właściwości fizykochemiczne

Historycznie nazwa alkaloidy wywodzi się od słów łacińskich: alkali (alkalie) i oides (podobny), co oznacza podobieństwo do zasad. Były to bowiem te związki organiczne, u których po raz pierwszy stwierdzono możliwość przyłączania przez nie kwasów [164].

W cząsteczkach alkaloidów występują układy cykliczne, przy czym najczęściej są to pierścienie heterocykliczne z atomami azotu, typu pirydyny, piperydyny, chinoliny, izochinoliny, puryny, tropanu i steroli. Azot zawarty w związkach alkaloidowych w większości przypadków występuje w postaci aminy III-rzędowej, czasem II i IV-rzędowej. Poza tym w skład cząsteczki wchodzi węgiel, wodór oraz niekiedy tlen, siarka i potas. Związki zawierające grupy tlenowe są na ogół substancjami stałymi, krystalicznymi (wyjątek stanowią m.in. pilokarpina i arekolina, które są cieczeniami). Związki beztlenowe są często płynne i lotne, np. koniina, nikotyna [11,162,165].

Alkaloidy jako zasady trudno rozpuszczają się w wodzie, a łatwo w rozpuszczalnikach organicznych, takich jak alkohole, chloroform, eter [29,44]. Sole alkaloidów zazwyczaj łatwiej rozpuszczają się w wodzie, a trudniej w rozpuszczalnikach organicznych [11]. Większość alkaloidów występuje w roślinach w postaci glikozydów oraz połączeń z kwasami organicznymi (rzadziej nieorganicznymi). Szczególnie często z alkaloidami związane są kwasy: jabłkowy, cytrynowy, szczawiowy, bursztynowy [27,33]. Alkaloidy są na ogół substancjami bezbarwnymi, z nielicznymi wyjątkami destylują bez rozkładu. Ich cechą charakterystyczną jest gorzki smak. Większość alkaloidów jest optycznie czynna. W roślinach występują przeważnie jako odmiany lewoskrętne [11,166].

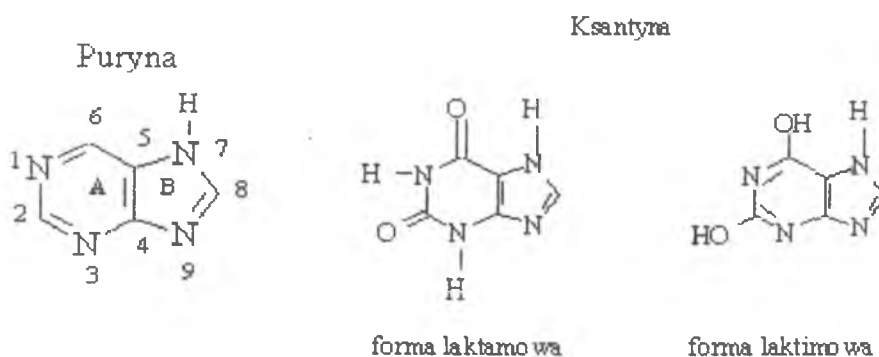
Bardzo wiele alkaloidów, nawet przy niewielkiej ich zawartości w wodnym roztworze daje nierozpuszczalne osady z odczynnikami, które otrzymały nazwę ogólnych odczynników na alkaloidy. Należą do nich m.in. kwas pikrynowy, tanina, kwas fosfomolibdenowy, fosfowolframowy, związki kompleksowe (K_2HgJ_4 , $K_3Fe(CN)_6$). Kwas taninowy jest często stosowany jako antidotum w przypadkach zatrucia alkaloidami, ponieważ nierozpuszczalna sól jaką tworzy z tymi związkami, ulega bardzo trudno absorpcji w przewodzie pokarmowym. Do identyfikacji służą również reakcje barwne, głównie z odczynnikami zawierającymi stężone kwasy azotowy (V) i siarkowy (VI) (o. Fröhdego, Mandelina, Marquisa, Wasicky'ego i inne). Ponadto, dla licznych typów alkaloidów znane są odczynniki specjalne, które powodują np.: reakcję mureksydową dla alkaloidów purynowych [11,28,29,33].

Cechą charakterystyczną alkaloidów jest ich wysoka aktywność biologiczna, co powoduje, że stosowane są jako leki. Jednakże silny wpływ alkaloidów na organizm ludzki, a zwłaszcza na system nerwowy, stanowi o ich toksyczności [44].

Alkaloidy znajdują się w grupie związków pochodzenia naturalnego, u których zaobserwowano działanie onkostatyczne. Największe kliniczne zastosowanie znajdują dimeryczne alkaloidy indolowe: winblastyna oraz winkrystyna [2,162,167].

2.1. Alkaloidy purynowe

W cząsteczce alkaloidów pochodnych puryny wyróżnić można człon pirymidynowy (A) skoniugowany z członem imidazolowym (B). Substancją podstawową kilku zasad purynowych jest ksantyna – pochodna puryny. Ksantyna i jej pochodne mogą występować w dwóch formach tautomerycznych: laktamowej lub laktimowej. Zasady purynowe odgrywają istotną rolę biologiczną jako składniki kwasów nukleinowych.

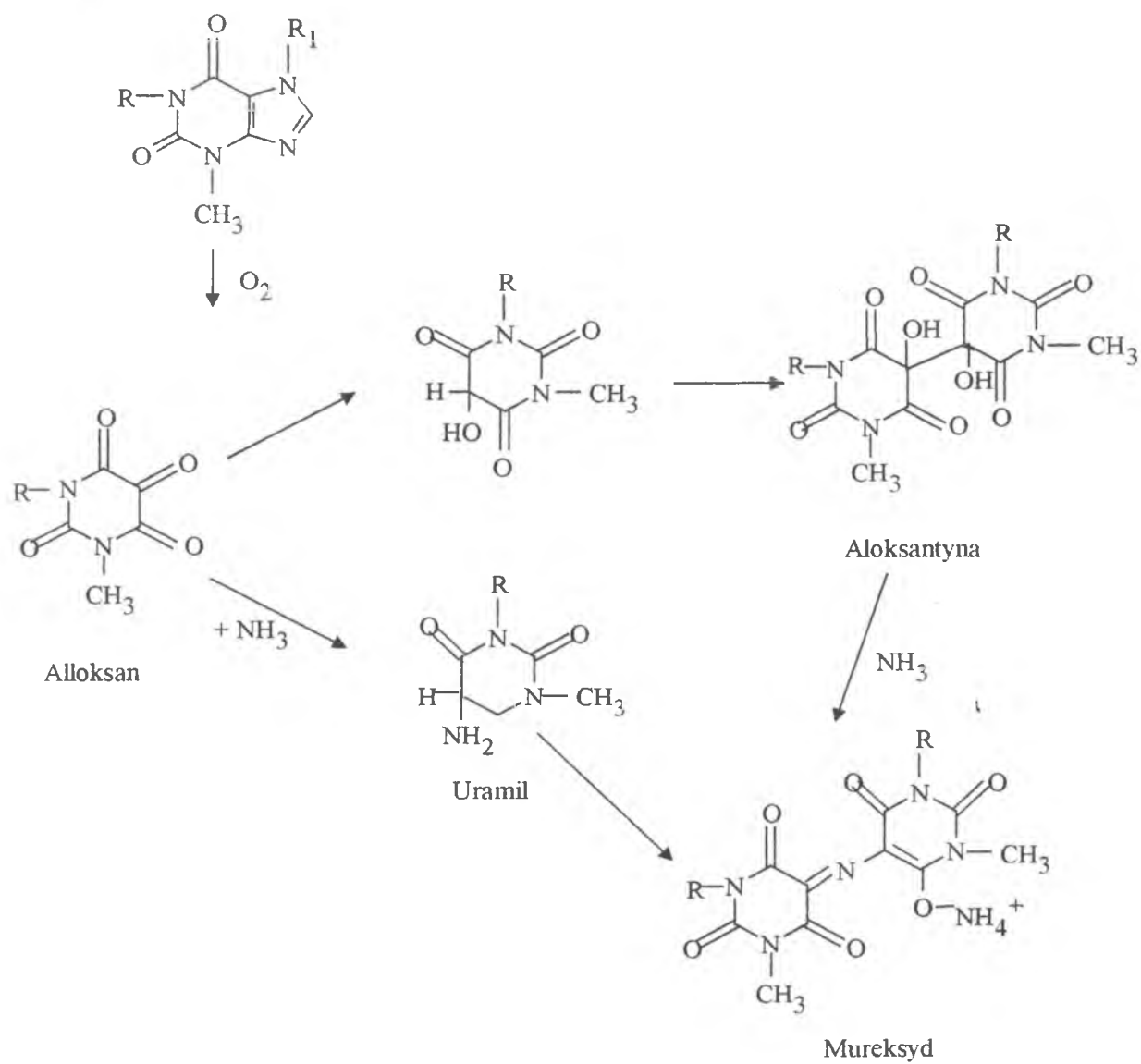


Spośród licznych, spotykanych w świecie roślinnym pochodnych puryny (np. guanina, kwas moczowy), tylko niektóre są uważane za alkaloidy. Są to teobromina, teofilina i kofeina. Niekiedy te związki bywają zaliczane do tzw. pseudoalkaloidów (według Hegnauera), ponieważ biogenetycznie nie wywodzą się bezpośrednio z aminokwasów i nie mają charakteru alkalicznego.

Wspomniane alkaloidy, pomimo że zawierają cztery atomy azotu, są bardzo słabymi zasadami, gdyż ani oba atomy azotu w pierścieniu pirymidynowym (położenie 1,3), ani azot w położeniu 7 nie mają charakteru zasadowego. Poszczególne alkaloidy różnią się między sobą ilością oraz miejscem podstawienia grup metylowych, a także rozpuszczalnością.

Specyficzną dla alkaloidów purynowych reakcją jest próba mureksydowa. Mureksydem określa się fioletowo zabarwione sole amonowe kwasu purpurowego. Związek ten powstaje podczas utleniania pochodnych puryny przebiegającego z rozpadem, przy czym tworzą się pochodne alloksanu i uramilu. Wskutek następnej

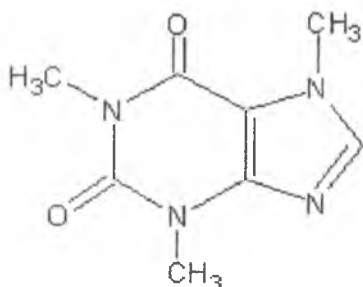
kondensacji powstają pochodne kwasu purpurowego, dające z amoniakiem charakterystyczne fioletowe zabarwienie [110].



$R, R_1 = H$ lub CH_3
Reakcja mureksydowa

2.1.1. Kofeina

Budowa, występowanie i otrzymywanie



Kofeina, czyli 1,3,7 – trimetyloksantyna jest głównym alkaloidem nasion krzewu kawowego (1-2%). Ponadto występuje w liściach herbaty (1-4%), orzeszkach kola (2,5-5%) [11], a także nasionach osmęty beczkowatej (*Paullinia cupana*), zwanej guaraną (3-6%) [12,13,168,169] oraz liściach Yerba Mate (0,8-2,2%) [14,15]. W małych ilościach występuje także w innych roślinach, m. in. w krajowym gatunku *Erodium cicutarium* (*Geraniaceae*) [11].

Po raz pierwszy została wyodrębniona z ziaren kawy w 1820 roku. Obecnie głównym źródłem pozyskiwania tego alkaloidu jest dekofeinizacja kawy przeprowadzana za pomocą dwutlenku węgla w procesie zwanym ekstrakcją w stanie nadkrytycznym (SFE) [170].

Właściwości fizykochemiczne

Kofeina jest ciałem stałym, o białych połyskujących kryształach w kształcie igieł lub drobnokrystalicznym proszkiem bez zapachu, o gorzkim smaku. Krystalizuje z jedną cząsteczką wody. Bezwodna kofeina topi się w temperaturze 234-237 °C, podczas ostrożnego ogrzewania może sublimować. Substancja rozpuszcza się łatwo w chloroformie, wrzącej wodzie, roztworach benzoesanów i salicylanów potasowców, słabo rozpuszcza się w etanolu, zimnej wodzie, trudno w eterze [29]. Ponieważ kofeina nie ma żadnego atomu wodoru związanego z azotem, nie może tworzyć soli z metalami. W odróżnieniu od innych pochodnych ksantyny, nie ma charakteru amfoterycznego, ponieważ wszystkie atomy azotu są zmetylowane. Wodne roztwory kofeiny wykazują odczyn obojętny. Z kwasami kofeina daje sole, które w roztworze wodnym ulegają hydrolizie z odczynem kwasowym (cytrynian kofeiny). Znacznie trwalsze są

rozpuszczalne w wodzie sole podwójne kofeiny z benzoesanem sodu lub salicylanem sodu [170].

Właściwości biologiczne i farmakologiczne

Kofeina pobudza ośrodkowy układ nerwowy, działa analeptycznie na ośrodek oddechowy, naczynioruchowy, a także sferę psychiczną kory mózgowej. Rozszerza naczynia wieńcowe i mózgowe, przyspiesza procesy myślenia, wzmacnia akcję serca, niweluje uczucie zmęczenia psychicznego i fizycznego [15]. Ponadto, substancja ta pobudza wydzielanie kwasu żołądkowego, wspomagając proces trawienia oraz działa moczopędnie. Z uwagi na takie efekty, kofeina jest stosowana do produkcji napojów energetyzujących i pobudzających np. dla sportowców, czy osób pragnących zwiększyć wydolność psycho – fizyczną. Wykazano, że dawki istotnie wpływające na poprawę wydolności fizycznej zawierają się w granicach od 2 do 5 mg/kg masy ciała [171]. Kofeina nie kumuluje się w organizmie, jej metabolizm przebiega w wątrobie, a okres biologicznego półtrwania wynosi 2,5 – 4,5 h. Ulega biotransformacji do kwasów 1-metylomoczowego i 1,3-dimetylomoczowego, 7-metyloksantyny i 1,7-dimetyloksantyny. Wydalana jest z moczem w postaci nie zmienionej (10%) oraz jako metabolity pochodne kwasu moczowego i ksantyny. Mutagenne działanie kofeiny nie zostało potwierdzone, pomimo stwierdzenia pod jej wpływem pewnych zaburzeń chromosomów. Badania nie wykazały również szkodliwego działania rakotwórczego i teratogenne kofeiny. Nadmierne spożycie kofeiny (powyżej 600 mg dziennie) może wywołać zbytnią pobudliwość, uczucie niepokoju, przyspieszenie oddychania, kołatanie serca, nudności i nasiloną potliwość. Wpływa także na wzmożone wypłukiwanie wapnia i magnezu z układu kostnego, co sprzyja rozwojowi osteoporozy.

W preparatach farmaceutycznych, kofeina w postaci łatwo rozpuszczalnych soli jest stosowana głównie jako składnik leków łagodzących bóle głowy. Dawka maksymalna przy podaniu doustnym wynosi 1,5 g. Doustna dawka śmiertelna kofeiny wynosi 10 – 12 g, ale zdarzają się przypadki przeżycia dawki znacznie większej [44].

Przegląd metod oznaczania kofeiny

Tabela 13. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV - VIS

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
Pomiar absorbancji ($\lambda = 420 - 450$) produktu reakcji analitu z kwasem fosfomolibdenowym	preparaty farmaceutyczne	172
Pomiar absorbancji roztworu analitu, po izolacji i wymyciu z żelu krzemionkowego, przy $\lambda = 265$ nm	lekarstwa na przeziębienie	173
Pomiar absorbancji roztworu analitu, po izolacji i wymyciu z żelu krzemionkowego, przy $\lambda = 272$ nm	preparat farmaceutyczny	174
Pomiar absorbancji roztworu analitu przy $\lambda = 275$ nm	preparat farmaceutyczny	175
Spektrofotometria pochodna		
-widmo pochodnej pierwszego rzędu, $\lambda = 256$ nm	preparaty chińskiej medycyny tradycyjnej	176
-widmo pochodnej drugiego rzędu, $\lambda = 272,5$ nm	kawa	177
-widmo pochodnej drugiego rzędu, $\lambda = 298,6$ nm	kawa, herbata	178

Tabela 14. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej

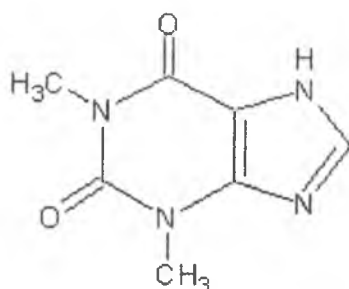
Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy ze strefą koncentracji -faza ruchoma: metanol-octan etylu, (15:85) -detekcja: densytometryczna	preparaty farmaceutyczne	179
-faza stacjonarna: RP C8 -faza ruchoma: metanol-woda, (70:30) -detekcja: plamki kofeiny zdrapywano, eluowano przy użyciu techniki SPE, a następnie oznaczano stosując spektrometr MS	napoje: Coca-cola, Pepsi	180
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ HPTLC -faza ruchoma: dichlorometan-metanol, (90:10) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 270$ nm	napoje bezalkoholowe, np.: Coca-cola	181
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G ₂₅₄ -faza ruchoma: octan etylu-woda amoniakalna, (24:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 272$ nm	mocz, krew	182
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy -faza ruchoma: chloroform-etanol, (19:1) -detekcja: światło UV	materiał roślinny	183
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ HPTLC -faza ruchoma: octan etylu-metanol, (85:15) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 275$ nm	preparaty farmaceutyczne	184
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy F ₂₅₄ -faza ruchoma: dichlorometan-octan etylu-etanol-kwas mrówkowy, (7:4:8:1) lub dichlorometan-octan etylu-etanol, (5:5:1) lub acetonitryl-chloroform, (1:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 274$ nm	preparaty farmaceutyczne	185
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60, (Alufohlen) -faza ruchoma: heksan-chloroform-kwas octowy, (4:4:1) lub etanol-heksan-chloroform-kwas octowy, (12:12:8:1) lub chloroform-aceton-toluen, (12:5:2) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 280$ nm	preparaty przeciwbólowe i przeciwgorączkowe	56

-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 -faza ruchoma: chloroform-kwas octowy, (3:2) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 280 \text{ nm}$	liście herbaty	186
---	----------------	-----

Tabela 15. Inne metody oznaczania kofeiny.

Metoda	Analizowany materiał	Lit.
Spektrometria w podczerwieni z transformacją Fouriera	herbata	187
	tw. soft drinks	188
Fluorymetria	syrop na przeziębienie	189
Kapilarna elektroforeza	preparaty farmaceutyczne	190
	kawa, herbata, coca-cola, kakao	191
Chromatografia gazowa z spektrometrią mas	kawa, herbata, coca-cola	192
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	kawa	193
	herbata: zielona, oolong, pu – erh, czarna	od 100 do 104
	czekolada, napoje bezalkoholowe, herbata	194
	osocze i mocz	195
	osocze i ślina	196
	preparaty farmaceutyczne, osocze	197
Micelarna chromatografia elektrokinetyczna	żywność, surowica, preparaty farmaceutyczne	198
Amperometria	napoje bezalkoholowe	199
Woltamperometria zmiennoprądowa	herbata	200
Potencjometria	herbata, tw. soft drinks, preparaty farmaceutyczne	201

2.1.2. Teofilina



Teofilina, czyli 1,3 – dimetyloksantyna, została wykryta w 1888 roku przez Kossela w liściach herbaty. Jej niewielkie ilości można także znaleźć w zarodkach cola i nasionach kawy.

Tworzy bezbarwne, igiełkowate kryształy lub biały krystaliczny bądź bezpostaciowy proszek, bez zapachu, o gorzkim smaku. Substancja łatwo rozpuszcza się w 10% amoniaku, rozcieńczonych kwasach, wrzącej wodzie i etanolu 95% oraz 5% roztworze KOH. Trudno rozpuszcza się w choroformie, etanolu i wodzie. Jest praktycznie nierozpuszczalna w eterze. Temperatura topnienia bezwodnej teofiliny wynosi 270 – 274 °C. W odróżnieniu od kofeiny, teofilina łatwo tworzy biały, galaretowaty osad związku srebrowego, a w roztworach alkalicznych tworzy z jonami miedzi (II) rozpuszczalny w wodzie związek sprzężony. 0,001% roztwór bezwodnej substancji w 0,1M HCl wykazuje maksimum absorpcji promieniowania przy $\lambda = 272$ nm.

Teofilina działa podobnie, lecz słabiej niż kofeina jako psychoanaleptyk. Alkaloid ten jest stosowany jako lek moczopędny i przeciwskurczowy w astmie oskrzelowej, chorobie wieńcowej i nadciśnieniowej. Duże znaczenie farmakologiczne ma pochodna teofiliny – aminofilina, stanowiąca połączenie teofiliny z etylenodiaminą [9,11].

Przegląd metod oznaczania teofiliny

Tabela 16. Metody wykorzystujące technikę spektrofotometrii UV – VIS.

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
Na próbkę podziałano roztworem KBrO ₃ i HCl, odparowano do sucha, pozostałość rozpuszczono w dimetyloformamidzie i mierzono absorbancję roztworu przy $\lambda_{\text{max}} = 500$ nm	kawa, herbata	202
Analit połączono z 0,5% roztworem metylocelulozy, 2 M roztworem eozyny i jonów Pd(II), w środowisku buforu octanowego. Całość ogrzewano przez 30 min. w temp 50 °C i mierzono absorbancję próby przy $\lambda_{\text{max}} = 545$ nm	preparaty farmaceutyczne	203
Na próbkę analitu podziałano 5% roztworem H ₂ O ₂ i kwasem solnym, odparowano do sucha a pozostałość rozpuszczono w acetonie. Pomiar absorbancji wykonywano przy $\lambda_{\text{max}} = 480$ nm		204
Tabletkę rozpuszczono w 0,01M KOH, po odsączeniu mierzono absorbancję przy $\lambda_{\text{max}} = 275$ nm	preparaty farmaceutyczne	205
Analit reaguje z 3.3% roztworem Na ₂ CO ₃ i azotynem 4-nitroaniliny, absorbancję próby mierzono przy $\lambda_{\text{max}} = 440$ nm	preparaty farmaceutyczne	206

Spektrofotometria pochodna -widmo zerowego rzędu, $\lambda = 275 \text{ nm}$ -widmo pochodnej pierwszego rzędu, $\lambda = 287 \text{ nm}$ -widmo pochodnej drugiego rzędu, $\lambda = 296 \text{ nm}$		207
widmo pochodnej drugiego rzędu, $\lambda = 278 \text{ nm}$	kakao, czekolada, kawa, herbata	208

Tabela 17. Metody wykorzystujące technikę chromatografii cienkowarstwowej.

Wybrane parametry metody	Analizowany materiał	Lit.
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ (HPTLC) -faza ruchoma: toluen-propanol-kwas octowy, (80:10:5) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 278 \text{ nm}$	osocze krwi	209
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 -faza ruchoma: chloroform-kwas octowy, (3:2) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 280 \text{ nm}$	herbata	186
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G ₂₅₄ -faza ruchoma: octan etylu-woda amoniakalna, (24:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 272 \text{ nm}$	krew, mocz	182
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy F ₂₅₄ -faza ruchoma: propanol-toluen-woda amoniakalna(25%), (3:6:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 268 \text{ nm}$	preparaty farmaceutyczne	210
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 G F ₂₅₄ -faza ruchoma: octan etylu-metanol-woda amoniakalna, (17:2:1) -detekcja: odczynnik Dragendorfa i światło UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	preparaty farmaceutyczne, mocz	211
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ -faza ruchoma: chloroform-metanol, (9:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 278 \text{ nm}$	preparaty farmaceutyczne	212
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy G -faza ruchoma: octan etylu-metanol-woda, (200:27:20) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 270 \text{ nm}$	preparaty farmaceutyczne	213
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 F ₂₅₄ -faza ruchoma: chloroform-czterochlorek węgla-metanol, (8:5:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 275 \text{ nm}$	mocz, ślina	214
-faza stacjonarna: żel krzemionkowy 60 G F ₂₅₄ -faza ruchoma: chloroform-etanol, (15:1) -detekcja: densytometryczna, $\lambda = 274 \text{ nm}$	osocze krwi	215

Tabela 18. Inne metody oznaczania teofiliny.

Metoda	Analizowany materiał	Lit.
Fluorymetria	surowica krwi	216
Chemiluminescencja	surowica krwi	217
Kapilarna elektroforeza	osocze krwi	218
Chromatografia cieczowa z spektrometrią mas	osocze krwi	219
Chromatografia gazowa z spektrometrią mas	osocze i ślina dzieci	220
Wysokosprawna chromatografia cieczowa, HPLC	surowica krwi	221
	mocz	222
	krew	223
	preparaty farmaceutyczne	224

Amperometria	surowica krwi	225
Woltamperometria	preparaty farmaceutyczne, herbata	226
Micelarna chromatografia elektrokinetyczna	preparaty farmaceutyczne	227
Potencjometria	preparaty farmaceutyczne	228

2. 2. Surowce purynowe

Folium Theae – Liść herbaty

Herbata, obok wody jest najczęściej spożywanym napojem na świecie. Produkcja surowca wynosi 1 milion ton rocznie, a statystyczne spożycie herbat na jedną osobę waha się od 100 cm³ do nawet 2 dm³ dziennie.

Liście krzewu herbacianego odznaczają się niezwykle bogactwem zawartych w nich substancji fizjologicznie czynnych, mocno oddziałujących na organizm człowieka. Substancjami warunkującymi farmakologiczne działanie surowca są przede wszystkim alkaloidy purynowe oraz związki polifenolowe. Występują tu również aminy, aminokwasy, składniki aromatyzujące, witaminy (B₁, B₂, B₅, C, K, PP) oraz związki mineralne, głównie Ca, Mg, Fe, Na, P, Cu, F, Mn, Si. Zawartość związków chemicznych w herbacie jest ściśle uzależniona od odmiany, klimatu i warunków upraw, wieku oraz umiejscowienia liści na krzewie (liście z górnych partii odznaczają się większą różnorodnością substancji chemicznych).

W zależności od sposobu otrzymywania wyróżnia się zasadniczo trzy rodzaje surowca handlowego:

- **herbata zielona (niefermentowana)** – to liście krzewów herbacianych stabilizowane suchym, gorącym powietrzem lub parą i następnie szybko wysuszone. W takich warunkach inaktywacji ulega oksydaza polifenolowa, co zapobiega utlenieniu związków polifenolowych. Dzięki temu herbata jest bogata we flawonole w tym katechiny, epikatechiny i epigalokatechiny oraz proste kwasy fenolowe.
- **herbata czarna i pu – erh (fermentowana)** – produkowana jest ze świeżych liści poddanych wędnięciu przez 20 godzin, rolowanych, fermentowanych w dużej wilgotności i następnie suszonych, gorącym, suchym powietrzem. W wyniku tego procesu proste polifenole zawarte w liściach ulegają enzymatycznej kondensacji, tworząc złożone, skondensowane związki, takie jak flobafeny, których masy

cząsteczkowe zawarte są w przedziale 1000 – 40000 D. Herbacie pu – erh pozwala się dojrzewać bardzo długo w odpowiednich warunkach. Najwartościowsze herbaty pu – erh mają po 60 lat

- **herbata oolong (półfermentowana)** – to liście herbaciane fermentowane tylko częściowo. Po oberwaniu liści nie pozostawia się ich do wędnięcia lecz od razu mocno podgrzewa, następnie walcuje i opala tak samo jak czarną.

W Chinach i na Sri Lance produkuje się również na bardzo ograniczoną skalę **herbatę białą**. Młode pączki zrywane są przed otwarciem, poddawane procesowi wędnięcia i suszenia.

Do alkaloidów purynowych zawartych w liściach herbaty należy występująca w znacznych ilościach kofeina. Jej zawartość w zależności od warunków upraw waha się w granicach od 23 to 30 mg/g dla herbaty zielonej, od 15 to 30 mg/g dla herbaty oolong, od 18 to 30 mg/g dla herbaty pu-erh i około 30 mg/g dla herbaty czarnej [101,102,104]. Ponadto w herbacie obecne są także niewielkie ilości teobrominy (od 0,02 do 0,04%) i teofiliny (ok. 0,02%). Zawartość polifenoli w liściach herbaty waha się w granicach 25 – 35% suchej masy. Wśród związków polifenolowych występujących w zielonej herbacie wyróżnić można: procyanidyny, garbniki, flawonoidy (flawanole, flawonole i flawony), fenolokwasy (kwas galusowy) i ich połączenia depsydowe. Substancje te mogą występować zarówno w postaci wolnej, jak i w postaci glikozydów w połączeniach z glukozą czy innymi cukrami.

Napar z zielonej herbaty działa silnie ściągająco na błonę śluzową jamy ustnej i przewodu pokarmowego, także przeciwbakteryjnie, przeciwwirusowo, przeciwgrzybiczo, przeciwzapalnie, hamuje mikrókrwawienia z uszkodzonych naczyń włosowatych. Po resorpcji rozpuszczalnych katechin uwidacznia się działanie wzmacniające na nabłonki naczyń włosowatych oraz ogólnie odtruwające. Działanie przeciwnowotworowe herbaty polega na prowadzeniu do znacznego wzrostu w wątrobie i jelicie GSH-transferazy (czynnika obronnego przed wieloma związkami szkodliwymi i rakotwórczymi). Napar z zielonej herbaty, pity w dużej ilości, osłabia skutki napromieniowania znaczną dawką strontu⁹⁰. Kompresy z naparu łagodzą stany zapalne po oparzeniach słonecznych. Najistotniejsze jednak jest działanie profilaktyczne popularnego naparu z liści krzewu herbacianego. Badania epidemiologiczne wykazały, że w tych rejonach świata, gdzie mieszkańcy piją dużo herbaty, znacznie rzadziej występują choroby cywilizacyjne – choroba niedokrwienna serca, miażdżyca i niektóre rodzaje nowotworów [8,14,101-105,111,171,229-232].

Paullinia cupana – osmęta beczkowata – guarana

Osmęta beczkowata – *Paullinia cupana* jest gatunkiem zawierającym najwięcej kofeiny z dotychczas poznanych roślin. Jest to jednoroczna liana, występująca w Ameryce Południowej (Brazylia, Wenezuela). Owocem jest gruszkowata torebka z jednym nasieniem. Zawartość kofeiny w nasionach guarany wynosi od 3 – 6% (tj. około 3 razy więcej niż w nasionach kawy). Oprócz kofeiny w nasionach guarany występują: garbniki (głównie tanina) – 8-12%, tłuszcze – 11%, substancje żywicopochodne – 8,8%, skrobia – 8,3%, białko – 3%, oleje 2 – 3 %, do 3% soli mineralnych, ślady saponin – 0,06% i około 50 % włókniaka [12]. Nasiona te po oczyszczeniu z osłonki suszy się, miele i dodając wodę zagniata gęstą masę, z której formuje się niewielkie kulki lub laseczki, a następnie suszy się je lub wędzi w dymie. Przygotowany w ten sposób surowiec, nosi nazwę *pasta guarana* i jest przedmiotem handlu międzynarodowego [13]. Guarana figuruje w wielu farmakopeach i wykazach środków leczniczych dotyczących terapii ziołowej i homeopatii. Jest ceniona i stosowana w farmacji jako przeciwbólowy lek kofeinowy.

Chociaż duża ilość kofeiny, która zawarta jest w guaranie wywołuje podobne efekty farmakologiczne do alkaloidów kawy i herbaty, jej działanie jest łagodniejsze dzięki obecności niewielkiej ilości saponin, które powodują stopniowe uwalnianie kofeiny w organizmie [12].

Yerba Mate

Mate to wiecznie zielony przedstawiciel rodziny ostrokrzewów (*Ilex paragnaiensis*), które rosną w południowych stanach Brazylii, Paragwaju i północnej Argentynie. Po zbiorze liście mate ogrzewa się na otwartym ogniu, aby nie ściemniały (inaktywacja enzymów) a następnie dosusza w temperaturze 80 – 100 °C za pomocą gorącego powietrza. Zawartość kofeiny zależy od wieku liści. Młode, jednoroczne zawierają od 2 do 2,2%, z wiekiem zawartość spada do 0,7%. Mate zawiera liczne witaminy (A, C, E, B₁, B₂) i minerały (magnez, wapń, żelazo, sód, potas, krzem, siarkę).

Yerba mate jest przede wszystkim napojem stymulującym, który likwiduje zmęczenie oraz stymuluje zdolności psychiczne i fizyczne organizmu. Korzystnie wpływa na układ nerwowy i mięśnie. Zwiększa także wydajność pracy umysłowej. Badania wykazują, że mate zwiększa także zdolność odpornościową organizmu [14,15]

2.3. Wyodrębnianie alkaloidów z materiałów roślinnych, ich rozdzielanie i oczyszczanie

Roślinę uważa się za alkaloidową, gdy zawiera (przynajmniej w którymś z jej organów) powyżej 0,01% alkaloidu w przeliczeniu na suchą masę. Znane są jednak przypadki znacznie większej zawartości alkaloidów. Na przykład w korze hodowanych drzew chinowych zawartość chininy osiąga 7 – 10% [11,33].

Różnice w budowie poszczególnych alkaloidów zawartych w danym surowcu są zwykle niewielkie i ograniczają się do obecności lub braku pewnych grup charakterystycznych, jak $-\text{CH}_3$, $-\text{OCH}_3$, $-\text{OH}$, liczby wiązań podwójnych itp. Przy dużym ciężarze cząsteczkowym alkaloidów mają one mały wpływ na właściwości fizyczne tych związków. Dlatego rozdział poszczególnych alkaloidów wydobytych z surowca i otrzymanie ich w stanie chemicznie czystym napotykać często na duże trudności, brak bowiem różnic w rozpuszczalności lub temperaturach wrzenia, które zwykle wykorzystuje się w celu rozdzielania i oczyszczania związków organicznych. Opracowanie odpowiedniej metody ekstrakcji i oczyszczania ma duże znaczenie, gdyż większość alkaloidów otrzymuje się jedynie na drodze wyodrębniania z surowców roślinnych. Tylko nieliczne z nich otrzymuje się syntetycznie [28,232].

W celu wyodrębnienia alkaloidów z surowca roślinnego, złożonego głównie z węglowodanów, białek, substancji garbnikowych, żywic itd., stosuje się różne sposoby. W niektórych przypadkach drobno zmielony surowiec roślinny poddaje się działaniu zasad, zwilżając go roztworami amoniaku, NaOH lub sody, albo też mieszając z wapnem gaszonym. Wydzielone w ten sposób wolne alkaloidy – zasady – ekstrahuje się nie mieszającymi się z wodą rozpuszczalnikami, np. chloroformem, dichloroetanem, benzenem, naftą, eterem dietylowym itp. Przepuszczając rozpuszczalnik kolejno przez szereg ekstraktorów można otrzymać roztwór bogaty w alkaloidy nawet wtedy, gdy zawartość ich w surowcu wyjściowym wynosi tylko część procentu. Następnie mieszaninę alkaloidów ekstrahuje się wodnymi roztworami HCl lub H_2SO_4 , oczyszcza i wydziela poszczególne alkaloidy przez frakcjonowaną krystalizację z odpowiednich rozpuszczalników w postaci wolnej lub jako sole. Inna metoda wydzielania alkaloidów z surowca roślinnego polega na ekstrahowaniu ich rozcieńczonymi kwasami lub alkoholami (metylowym, etylowym, izopropylowym) zakwaszonymi HCl, a niekiedy kwasami organicznymi. W tych przypadkach alkaloidy ekstrahuje się jako sole tych

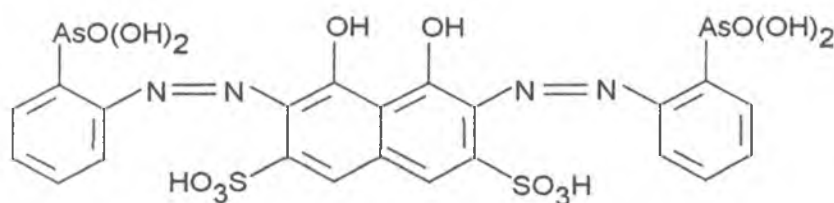
kwasów. Alkaloidy trudno rozpuszczalne w wodzie można strącić z otrzymanych kwaśnych roztworów zasadami, a łatwo rozpuszczalne – wyekstrahować (po dodaniu zasady) organicznym rozpuszczalnikiem. Niekiedy kwaśne, wodne roztwory traktuje się wstępnie rozpuszczalnikami w celu usunięcia różnych substancji balastowych, a dopiero potem zadaje się zasadami.

Oczyszczanie wyciągu alkaloidowego odbywa się przez kilkakrotną alkalizację i zakwaszanie oraz rozdział między fazy nie mieszających się rozpuszczalników, np. chloroform i wodę lub benzen i wodę. Otrzymane kompleksy alkaloidowe są rozdzielane zazwyczaj chromatograficznie na kolumnach z aktywowanym tlenkiem glinu lub żelazem krzemionkowym, co prowadzi do otrzymania jednorodnych związków. W niektórych przypadkach w celu rozdzielenia zbliżonych budową izomerów stosowana jest metoda ekstrakcji przeciwprądowej, a także metoda chromatografii cieczowej wysokociśnieniowej (HPLC). Podanie ogólnego schematu ostatecznego oczyszczania i rozdzielania mieszaniny alkaloidów jest niemożliwe, a dla każdego rodzaju surowca roślinnego należy stosować kombinację różnych sposobów postępowania [11,27,28,31,232].

3. Charakterystyka kompleksu ceru (III) z arsenazo III

Cer jest jednym z pierwiastków ziem rzadkich. W związkach może występować jako trój- i czterowartościowy. Sole Ce^{4+} są silnymi utleniaczami $E^\circ \text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+} \approx 1,5 \text{ V}$, stąd też zastosowano je w analizie redoksometrycznej – cerometrii. Potencjał redoks układu $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ zależy od kwasowości i obecności w roztworach anionów (w 1M H_2SO_4 potencjał formalny układu $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ wynosi 1,44V). Jony Ce^{4+} i Ce^{3+} wykazują zdolności kompleksotwórcze. Znane są kompleksy Ce^{3+} z jonami octanowymi, szczawianowymi, arsenazo I i arsenazo III [233 – 236].

Arsenazo III, zaproponowany przez Sawwina w 1959 roku, okazał się bardzo cennym odczynnikiem do spektrofotometrycznego oznaczania szeregu pierwiastków, szczególnie zaś pierwiastków ziem rzadkich [237,238].

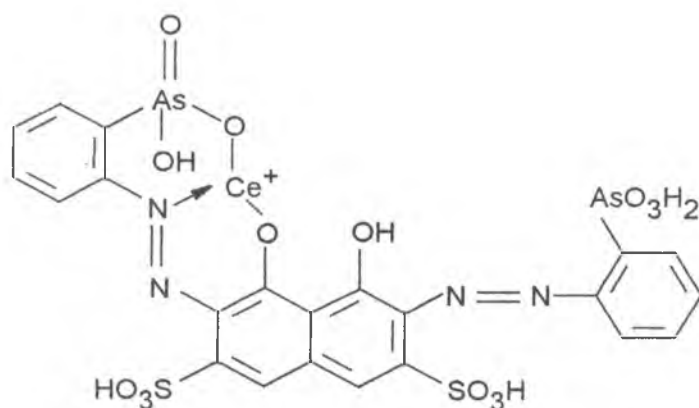


arsenazo III

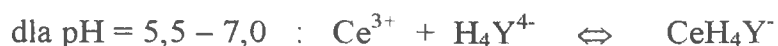
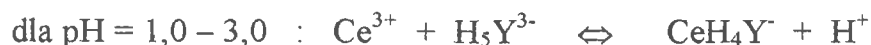
Arsenazo III jest barwnikiem białym na bazie kwasu chromotropowego i kwasu o-aminofenyloarsonowego. Słabo rozpuszcza się w roztworach obojętnych i kwaśnych, natomiast dobrze w roztworach słabo alkalicznych. Jest odczynnikiem w postaci stałej a jego roztwory wodne są trwałe. Utleniacze i reduktory powodują rozkład odczynnika. W roztworach kwaśnych ($\text{pH} = 4 - 10 \text{ M HCl}$), tj. w zakresie kwasowości stosowanym przy oznaczaniu pierwiastków, arsenazo III przybiera barwę różową lub czerwonomalinową, w zależności od stężenia odczynnika [239,240]. Ze wzoru strukturalnego wynika, że odczynnik ten może być traktowany jako ośmiowartościowy kwas H_8Y [241].

Dysocjacja tego kwasu zachodzi stopniowo wraz ze zmianą pH środowiska. Zakresom $\text{pH} = 2,4 - 2,5$ i $\text{pH} = 3,5 - 4,0$ odpowiadają następujące formy reagenta: H_5Y^{3-} i H_4Y^{4-} [242].

Trójwartościowe jony ceru tworzą z arsenazo III barwny kompleks, w budowie którego bierze udział jedna strona symetrycznej cząsteczki arsenazo III. Porównanie krzywych absorpcji arsenazo III i jego kompleksu z Ce^{3+} pozwala stwierdzić, że układ barwny odczynnika i kompleksu jest bardzo korzystny, gdyż przy długości fali λ_{max} kompleksu równej 655 nm sam odczynnik nie absorbuje ($\lambda_{max} = 520 - 530$ nm) [237].



Ce^{3+} tworzy z arsenazo III jednordzeniowy kompleks, w stosunku M:R (1:1). Równowaga reakcji jest osiągana szybko, a sam kompleks jest trwały [239,243]. Środowisko kwaśne (pH = 2,5 – 5,5) uważa się za najbardziej korzystne dla powstawania kompleksu metalu z odczynnikiem [233,244,245]. K. Barissova i E. Mitropolitska zaproponowały następujące schematy reakcji tworzenia kompleksu Ce^{3+} z arsenazo III w różnych zakresach pH [243]:



Pogłębianie barwy odczynnika w wyniku kompleksowania związane jest z naprowadzeniem pewnej ilości dodatniego ładunku (Ce^{3+}) na chromoforowe centrum cząsteczki ligandu (grupę azową) i określonej ilości ujemnego ładunku na pozostałość grupy hydroksylowej pierścienia naftalenowego. W ten sposób kation ceru pełni rolę silnie dodatniej grupy auksochromowej. Rezultatem reakcji kompleksowania jest utworzenie dwóch sześcioczłonowych pierścieni, czym tłumaczy się trwałość powstającego kompleksu [239].

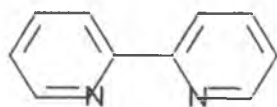
Tworzenie się kompleksu prowadzi do obniżenia gęstości π elektronowej na sąsiadującym z pierścieniem benzenowym atomie azotu wolnej grupy azowej. To tłumaczy przyczynę obniżania zdolności kompleksujących drugiej grupy azowej. W cząsteczce arsenazo III atom azotu biorący udział w wiązaniu z metalem ma większą gęstość π elektronową w porównaniu z atomem tlenu. Wynika z tego, że grupa azowa posiada właściwości zasadowe, natomiast grupa hydroksylowa właściwości kwasowe. W ten sposób można wytłumaczyć tendencję arsenazo III do tworzenia kompleksu w środowisku kwaśnym [233].

Barwny kompleks Ce^{3+} z arsenazo III został wykorzystany w spektrofotometrii do oznaczania śladów ceru. Wartości molowych współczynników absorpcji zawierają się w granicach od $4,7 \cdot 10^4$ do $6,3 \cdot 10^4$ l/mol $\cdot$ cm. Dolna granica oznaczalności dla śladów ceru wynosi 0,01 mg/ml [233,237,239].

Ponadto, powstawanie tego kompleksu w sprzężonych układach redoksowo – kompleksowych było podstawą opracowania szeregu czułych spektrofotometrycznych metod analizy reduktorów farmakologicznie i fizjologicznie czynnych, np.: z grupy fenylopirazolin-5-onu [18], hydrochinonu [21], kwasu foliowego [22], ampicyliny i amoksycyliny [23], alkaloidów indolowych [246] oraz środków bakteriostatycznych i konserwujących, jak np. HN_3 [247].

4. Charakterystyka kompleksu żelaza(II) z 2,2'-bipirydylem

2,2'-bipirydydyl zalicza się do amin heterocyklicznych, które mają szerokie zastosowanie w chemii analitycznej, ze względu na możliwość tworzenia kompleksów z wieloma metalami. Kompleksy te wykazują dużą trwałość a obecność sprzężonych podwójnych wiązań w ich cząsteczkach pozwala na powstawanie barwnych połączeń.



2,2'-bipirydydyl

Jego kompleks z Fe^{2+} o składzie $Fe(2,2'-bip)_3^{2+}$ wykazuje maksymalną absorbancję przy długości fali $\lambda_{max} = 522$ nm. Molowy współczynnik absorpcji wynosi

$\varepsilon = 8,65 \cdot 10^3 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ [248]. Wykładnik stałej trwałości omawianego kompleksu wynosi $\lg \beta = 17,45$ [249,250].

Omówiony wyżej kompleks chelatowy ma trwałość w zakresie pH od 2,5 do 9,0 a zmiany temperatury w granicach od 15 do 25°C nie wpływają na intensywność zabarwienia [237]. Barwę tego kompleksu tłumaczy się możliwością przejść d-d albo przeniesieniem ładunku od ligandu do metalu.

Kompleks Fe(II) z 2,2'-bipirydylem ulega reakcji redoks, która zachodzi pod wpływem utleniaczy, np. nadmanganianów, chromianów i Ce(IV) a można zapisać ją za pomocą równania:



Podczas przebiegu tego procesu nie dochodzi do zmiany składu kompleksu. Dzięki niedużej różnicy w rozmiarach zredukowanych i utlenionych kationów oraz niewielkim nakładom energetycznym na przebudowę sfery solwatacyjnej, szybkość przenoszenia elektronów w omawianym związku kompleksowym znacznie przewyższa szybkość tworzenia tych połączeń.

Związki kompleksowe żelaza(II) cechuje większa trwałość termodynamiczna od analogów żelazowych. Fakt ten, zgodnie ze wzorem Nernsta warunkuje wzrost potencjału formalnego redoks układu: $\text{Fe(L)}_3^{3+} / \text{Fe(L)}_3^{2+}$. Istotny wpływ na omawiane wielkości mają warunki pH.

Tworzenie się kompleksu Fe (II) z 2,2'-bipirydylem w sprzężonych układach redoksowo – kompleksowych było podstawą opracowania szeregu czułych spektrofotometrycznych metod analizy reduktorów farmakologicznie i fizjologicznie czynnych, np.: z grupy fenylopirazolin-5-onu [20]. Ten układ odczynników stosowano także jako wywoływacz w chromatografii planarnej [19, 251].

×

III

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Aparatura

1. Pehametr – typ N 517 Mera Tronik z elektrodą typu EsAgP – 309 W,
Hydromet Gliwice
2. Spektrofotometr UV i VIS „Jasco V 530”
3. Spektrofotometr „helios ε” Unicam
4. Kuwety o grubości warstwy 1 cm
5. Zestaw chromatograficzny firmy Camag
6. Densytometr CD 60 Desaga
7. System SPE – 12 G firmy J. T. Baker

2. Odczynniki

Kwas salicylowy	cz.d.a.	I.E.L., Berkshire
Kwas galusowy	cz.d.a.	Aldrich, Steinheim
Kofeina	cz.d.a.	Aldrich, Steinheim
Teofilina	cz.d.a.	Aldrich, Steinheim
(+) – Katechina	cz.d.a.	Aldrich, Steinheim
Kwas taninowy	cz.d.a.	Merck, Darmstadt
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Arsenazo III	cz.d.a.	Reachim, ZSRR
$\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
2,2'-bipirydył	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
NaOH	cz.d.a.	P.P.H. „Standard“, Lublin
Amoniak 25%	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Kwasy: solny, siarkowy (VI), mrówkowy, octowy	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Metanol	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Etanol	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
n-Propanol	cz.d.a.	Ł.Z.P.S., Łódź
n-Butanol	cz.d.a.	Reanal, Budapest
Izopropanol	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Izobutanol	cz.d.a.	Ł.Z.P.S., Łódź
Mrówczan etylu	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Octan etylu	cz.d.a.	Chempur, Piekary Śl.
Octan butylu	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Benzen	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Toluen	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Dioksan	cz.d.a.	„Xenon“, Łódź
Chloroform	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
Kwas propionowy	cz.d.a.	Riedel – de Haën, Niemcy
Kwas trichlorooctowy	cz.d.a.	Reanal, Budapeszt
Fenol	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
KJ	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice
J ₂	cz.d.a.	P.O.CH., Gliwice

3. Roztwory

Roztwór wzorcowy kwasu salicylowego o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml wody redestylowanej

Roztwór roboczy kwasu salicylowego o stężeniu 100 µg/ml i 10 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy kwasu galusowego o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml wody redestylowanej

Roztwór roboczy kwasu galusowego o stężeniu 100 µg/ml i 10 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy (+)-katechiny o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml wody redestylowanej

Roztwór roboczy (+)-katechiny o stężeniu 100 µg/ml i 10 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy kwasu taninowego o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml wody redestylowanej

Roztwór roboczy kwasu taninowego o stężeniu 100 µg/ml i 10 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy kofeiny o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml gorącej wody redestylowanej

Roztwór roboczy kofeiny o stężeniu 100 µg/ml i 10 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy teofiliny o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,05 g związku w 50 ml gorącej wody redestylowanej

Roztwór roboczy teofiliny o stężeniu 100 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego wodą redestylowaną

Roztwór wzorcowy Ce(IV) o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 0,1444 g $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ w 50 ml H_2SO_4 (1 mol/dm³)

Roztwór roboczy Ce(IV) o stężeniu 100 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego H_2SO_4 (0,1 mol/dm³)

Roztwór arsenazo III o stężeniu 0,05% otrzymano rozpuszczając 0,1 g związku w 200 ml wody redestylowanej

Roztwór wzorcowy Fe(III) o stężeniu 1 mg/ml przygotowano rozpuszczając 8,6350 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ w wodzie redestylowanej z dodatkiem 5 ml stężonego H_2SO_4 i uzupełniono wodą redestylowaną do 1000 ml

Roztwór roboczy Fe(III) o stężeniu 100 µg/ml przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie roztworu wzorcowego H_2SO_4 (0,01 mol/dm³)

Roztwór 2,2'-dipirydyłu o stężeniu 0,5% otrzymano rozpuszczając 1 g związku w 200 ml HCl (0,2 mol/dm³)

Roztwór NaOH o stężeniu 1 mol/dm³ przygotowano rozpuszczając 4g związku w 100 ml wody redestylowanej

Roztwór H_2SO_4 o stężeniu 1 mol/dm³ przygotowano przez odpowiednie rozcieńczenie stężonego kwasu siarkowego (VI) wodą redestylowaną

Odczynnik jodu z jodkiem potasu w 25 % HCl

- 1 g KJ i 2 g J_2 rozpuszczono w 100 ml 95 % etanolu
- 10 ml 25 % HCl zmieszano z 10 ml 95 % etanolu

4. Badania spektrofotometryczne.

4.1. Zastosowanie układu odczynników: Ce(IV) - arsenazo III do oznaczania kwasu salicylowego, kwasu galusowego, kwasu taninowego, (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny.

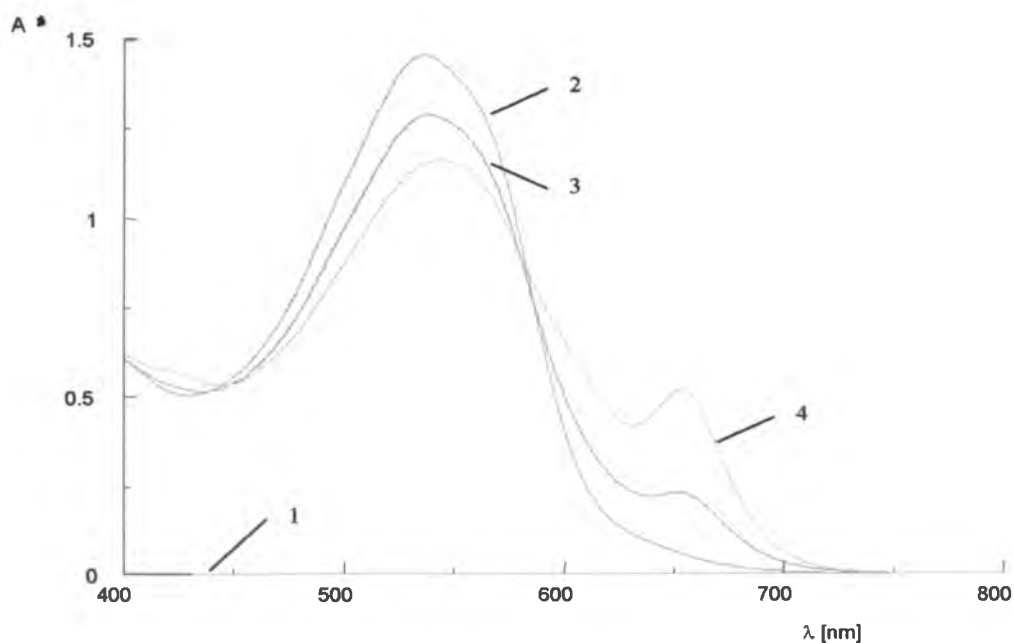
4.1.1. Badania wstępne.

W celu ustalenia analitycznych warunków oznaczania wybranych reduktorów wykreślono krzywe spektrofotometryczne dla prób o składzie:

1. 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$, analit
2. 2,3 cm^3 arsenazo III (0,05 mol/dm^3)
3. 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$, 2,3 cm^3 arsenazo III (0,05 mol/dm^3)
4. 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$, analit, 2,3 cm^3 arsenazo III (0,05 mol/dm^3)

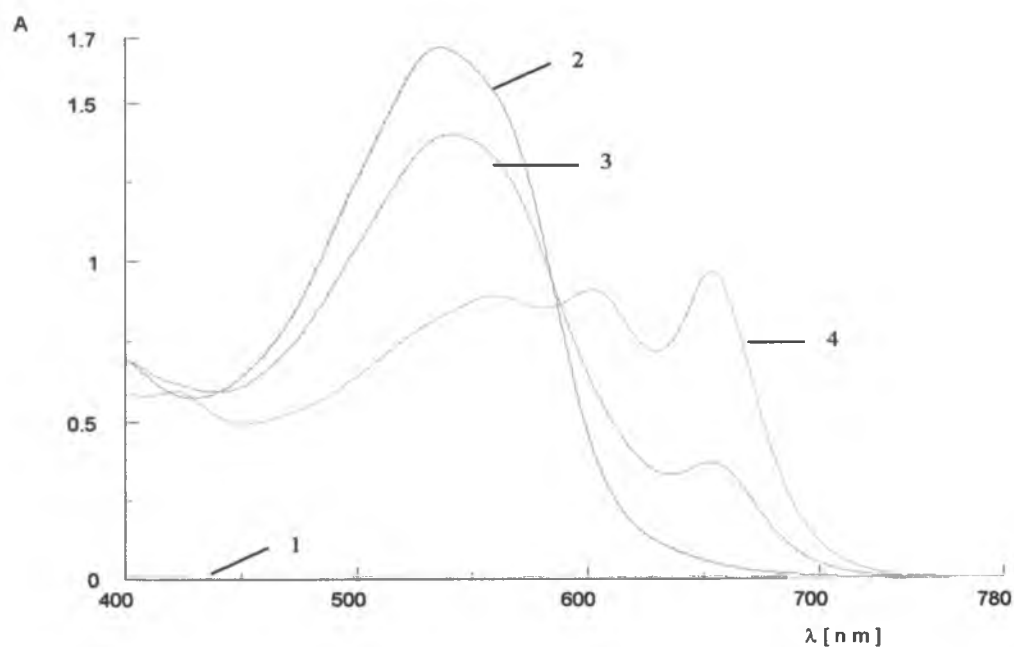
Objętość wszystkich prób była równa 25 ml, pH ustalono na około 3 roztworem NaOH (1 mol/dm^3). Zależność absorbancji roztworów badanych substancji od długości fali światła, rejestrowano w zakresie 350 – 780 nm. Charakterystyki widmowe sporządzonych prób przedstawiają rysunki 1 - 6.

Na podstawie analizy uzyskanych krzywych spektrofotometrycznych stwierdzono, iż proponowany układ odczynników, Ce(IV) - arsenazo III, stwarza korzystne warunki do opracowania metod oznaczania wybranych reduktorów. W próbach o składzie: Ce(IV) - analit – arsenazo III, stwierdzono obecność kompleksu $[\text{Ce(A)}]^+$, co dowodzi, że badane związki (anality) redukują jony Ce^{4+} do Ce^{3+} . Obserwowany efekt analityczny zależy od wartości molowego współczynnika absorpcji samego kompleksu $[\text{Ce(A)}]^+$ ($\epsilon = 5,6 \times 10^4 \text{ l/mol}\cdot\text{cm}$) oraz od liczby elektronów przekazywanych utleniaczowi przez cząsteczkę reduktora. W badanych przypadkach utleniona postać analitu (próba 1) jest bezbarwna, o mierzonym efekcie analitycznym decyduje więc jedynie zabarwienie powstającego związku kompleksowego. Pomiar absorbancji kompleksu przy $\lambda_{\text{max}} = 655 \text{ nm}$ stanowi podstawę oznaczeń spektrofotometrycznych. Porównanie krzywych absorpcji arsenazo III i jego kompleksu z Ce(III) dowodzi, że układ barwny odczynnika i kompleksu jest bardzo korzystny, gdyż przy λ_{max} kompleksu sam odczynnik nie absorbuje.



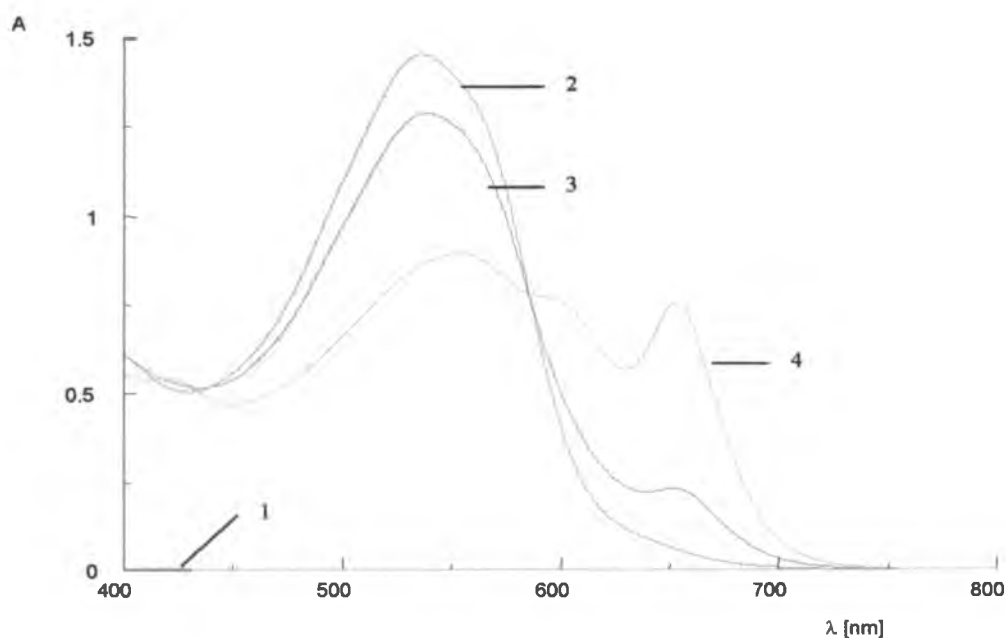
Rysunek 1. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 5 μg kwasu salicylowego;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 5 μg kwasu salicylowego – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III.



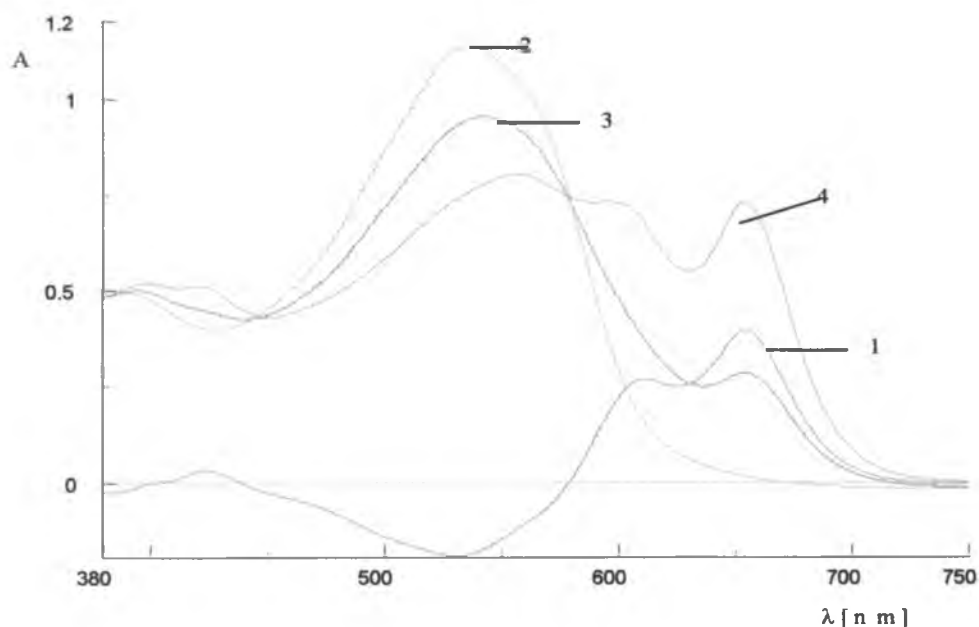
Rysunek 2. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 5 μg kwasu galusowego;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 $\mu\text{g Ce}^{4+}$ – 5 μg kwasu galusowego – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III.



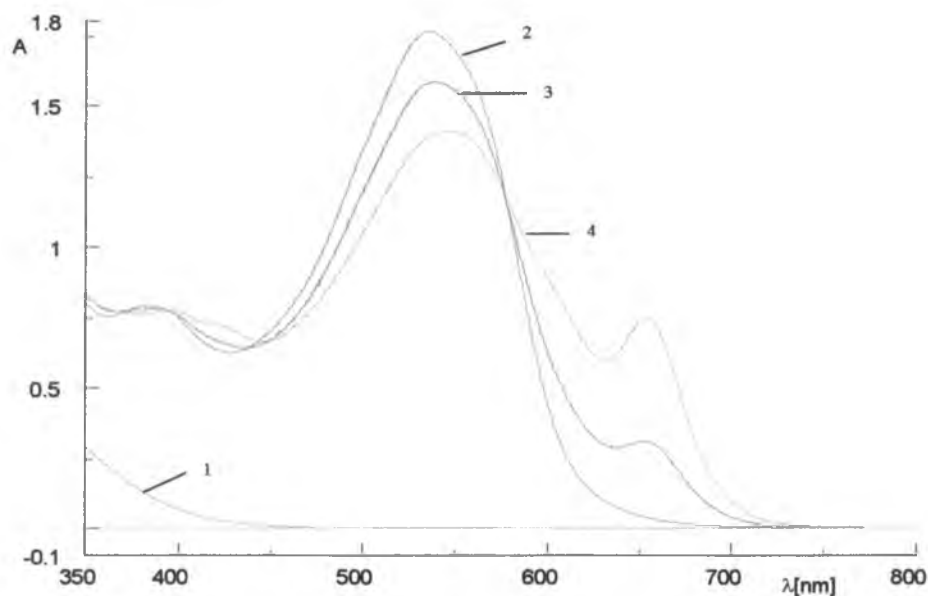
Rysunek 3. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 μg Ce⁴⁺ – 5 μg kwasu taninowego;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 μg Ce⁴⁺ – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 μg Ce⁴⁺ – 5 μg kwasu taninowego – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III.



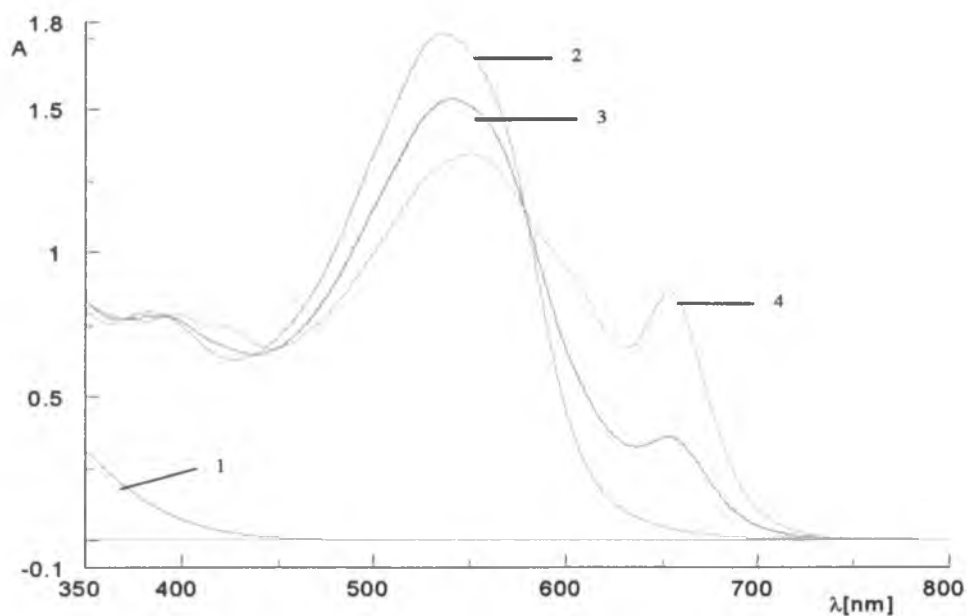
Rysunek 4. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 μg Ce⁴⁺ – 5 μg (+)-katechiny;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 μg Ce⁴⁺ – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 μg Ce⁴⁺ – 5 μg (+)-katechiny – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III.



Rysunek 5. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 μg Ce^{4+} – 10 μg kofeiny;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 μg Ce^{4+} – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 μg Ce^{4+} – 10 μg kofeiny – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III



Rysunek 6. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 μg Ce^{4+} – 10 μg teofiliny;
- 2) 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 3) 100 μg Ce^{4+} – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III;
- 4) 100 μg Ce^{4+} – 10 μg teofiliny – 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III

Absorbancja roztworów barwnych zawierających Ce(IV), analit i arsenazo III rośnie wraz z upływem czasu. W podobny sposób rośnie również absorbancja ślepej próby, zawierającej Ce(IV) i arsenazo III. Umożliwia to wykonanie oznaczenia spektrofotometrycznego w przypadku, gdy dla każdego oznaczanego roztworu, równolegle w tym samym czasie przygotowywana jest ślepa próba. Uzyskane wyniki są przedstawione się jako różnica absorbancji badanej próby i próby ślepej mierzonej względem wody jako roztworu odniesienia. Średnia wartość absorbancji dla ślepej próby wynosi $A_{655} = 0,230$.

4.1.2. Wpływ czasu i temperatury reakcji redoks na wyniki oznaczeń badanych reduktorów

W celu ustalenia optymalnego czasu przeprowadzenia reakcji utleniania i redukcji na wyniki oznaczeń wybranych reduktorów, przygotowano serie prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono $100\ \mu\text{g Ce}^{4+}$ i odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w temperaturze pokojowej, w określonym czasie.
3. Ustalono pH na około 3 i roztwór przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej.
4. Wprowadzono 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego, w kuwetach o grubości $l = 1\ \text{cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki, będące różnicą absorbancji między badaną próbą a ślepą próbą, przedstawiono w tabelach 19 – 24.

Tabela 19. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej, dla $5\ \mu\text{g}$ kwasu salicylowego, $n = 3$.

Czas [min]	5	15	30	45	60	90	120
$A_{\text{śr}}$	0,489	0,525	0,599	0,601	0,612	0,636	0,677

Tabela 20. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 5 μg kwasu galusowego, $n = 3$.

Czas [min]	5	15	30	45	60	90	120
$A_{\text{śr}}$	0,663	0,669	0,678	0,707	0,738	0,768	0,779

Tabela 21. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 5 μg kwasu taninowego, $n = 3$.

Czas [min]	5	10	20	30	45	60	90
$A_{\text{śr}}$	0,439	0,441	0,442	0,450	0,470	0,483	0,499

Tabela 22. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 5 μg (+)-katechiny, $n = 3$.

Czas [min]	15	30	45	60	75	100
$A_{\text{śr}}$	0,579	0,587	0,593	0,595	0,599	0,603

Tabela 23. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 10 μg kofeiny.

Czas [min]	5	10	15	30	45	60
$A_{\text{śr}}$	0,282	0,359	0,433	0,546	0,594	0,601

Tabela 24. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 10 µg teofiliny, n = 3.

Czas [min]	5	10	15	20	30	45	160
A_{sr}	0,329	0,395	0,442	0,460	0,482	0,502	0,504

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że w temperaturze pokojowej absorbancja osiąga stały poziom jeśli reakcja redoks jest prowadzona w czasie

- a) od 30 do 60 minut dla kwasu salicylowego
- b) do 30 minut dla kwasu galusowego
- c) do 30 minut dla kwasu taninowego
- d) od 15 minut dla (+)-katechiny
- e) od 5 do 60 minut absorbancja prób zawierających kofeinę postępująco rośnie
- f) od 30 minut dla teofiliny

W przypadku kofeiny nie było możliwe ustalenie optymalnego czasu prowadzenia reakcji redoks w temperaturze pokojowej. Z tego względu postanowiono zbadać zależność absorbancji od czasu prowadzenia reakcji utleniania i redukcji w podwyższonej temperaturze (60 °C). W tym celu przygotowano serie prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono 100 µg Ce^{4+} i odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w określonym czasie, równocześnie ogrzewając próby w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C.
3. Po ochłodzeniu ustalano pH na około 3 i roztwór przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej.
4. Wprowadzono 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego, w kuwetach o grubości $l = 1\text{ cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki, będące różnicą między absorbancją badanej próby i roztworu odniesienia, przedstawiono w tabeli 25 .

Tabela 25. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze 60 °C dla 10 µg kofeiny, n = 3.

Czas [min]	5	10	15	30	45	60
A _{śr}	0,487	0,608	0,668	0,743	0,746	0,749

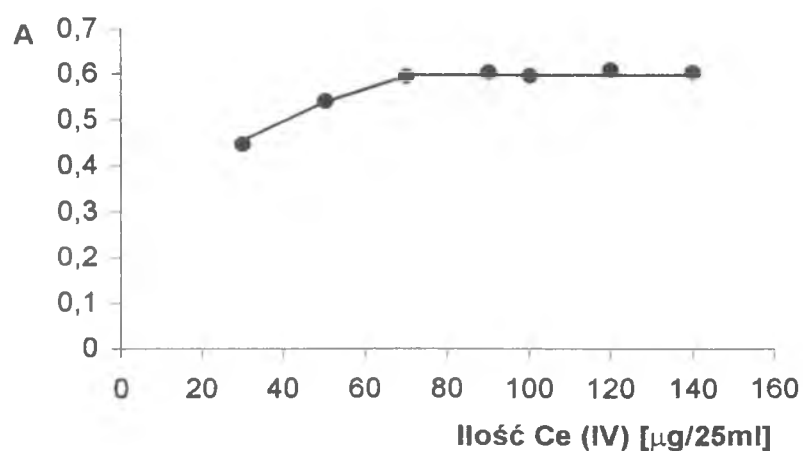
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że absorbancja prób uzyskuje stałą wartość jeżeli reakcja redoks prowadzona jest w temperaturze 60 °C dłużej niż 30 minut.

4.1.3. Wpływ zmiennych ilości jonów Ce(IV) na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.

W celu ustalenia wpływu ilości jonów Ce^{4+} na wyniki oznaczeń badanych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono zmienne ilości jonów Ce^{4+} oraz odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono pH roztworów na około 3 i ilościowo przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1$ cm, względem wody jako roztworu odniesienia.

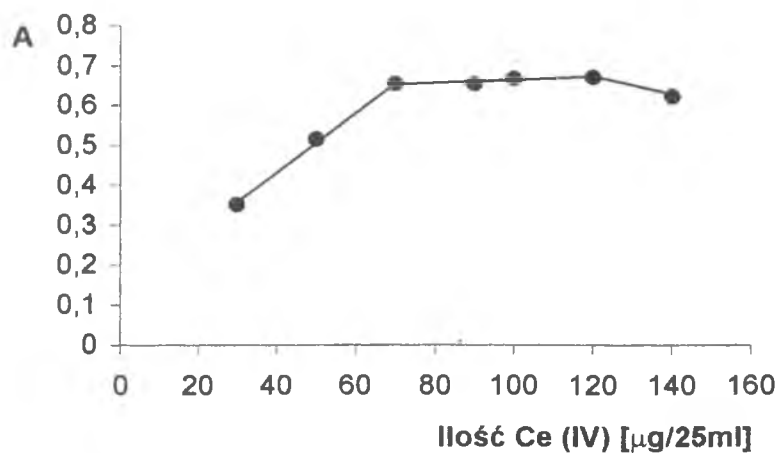
Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 7 do 12 i w tabelach od 26 do 31.



Ilość Ce ⁴⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
30	0,447
50	0,541
70	0,595
90	0,603
100	0,596
120	0,610
140	0,603

Rysunek 7. i Tabela 26.

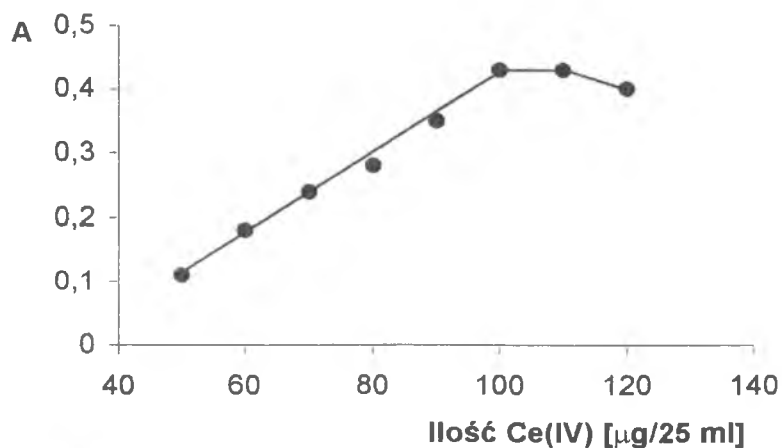
Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 5 μg kwasu salicylowego, n = 3.



Ilość Ce ⁴⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
30	0,350
50	0,515
70	0,653
90	0,654
100	0,668
120	0,671
140	0,622

Rysunek 8. i Tabela 27.

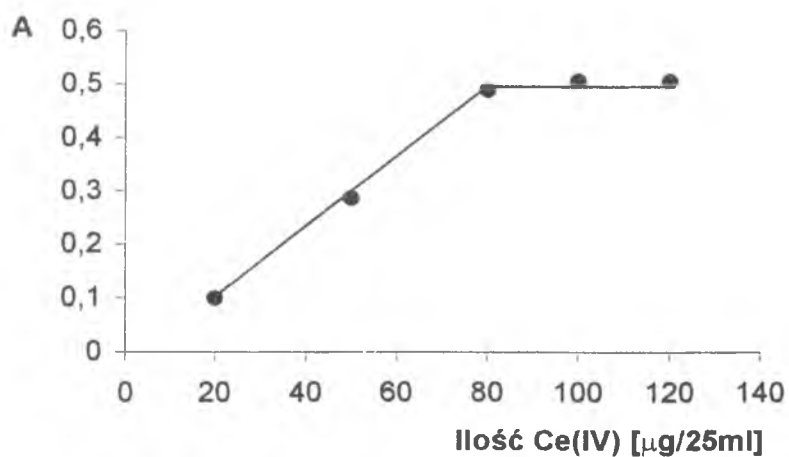
Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 5 μg kwasu galusowego, n = 3



Ilość Ce ⁴⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
50	0,110
60	0,180
70	0,240
80	0,280
90	0,350
100	0,430
110	0,430
120	0,400

Rysunek 9 i Tabela 28.

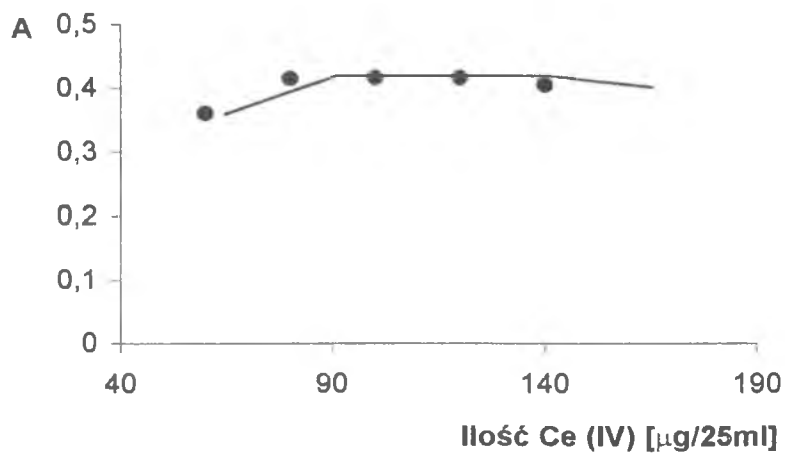
Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 5 μg kwasu taninowego, n = 3.



Ilość Ce ⁴⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
20	0,098
50	0,285
80	0,488
100	0,506
120	0,505

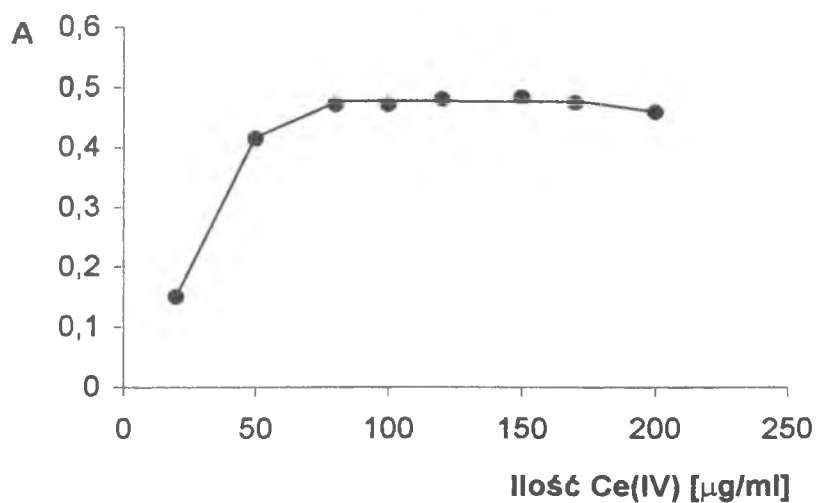
Rysunek 10. i Tabela 29.

Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 5 μg (+)-katechiny, n = 3.



Ilość Ce^{4+} [μg / 25 ml]	$A_{\text{śr}}$
60	0,360
80	0,415
100	0,416
120	0,416
140	0,404

Rysunek 11. i Tabela 30.
Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 10 μg kofeiny, $n = 3$.



Ilość Ce^{4+} [μg / 25 ml]	$A_{\text{śr}}$
20	0,150
50	0,414
80	0,471
100	0,471
120	0,480
150	0,483
170	0,474
200	0,458

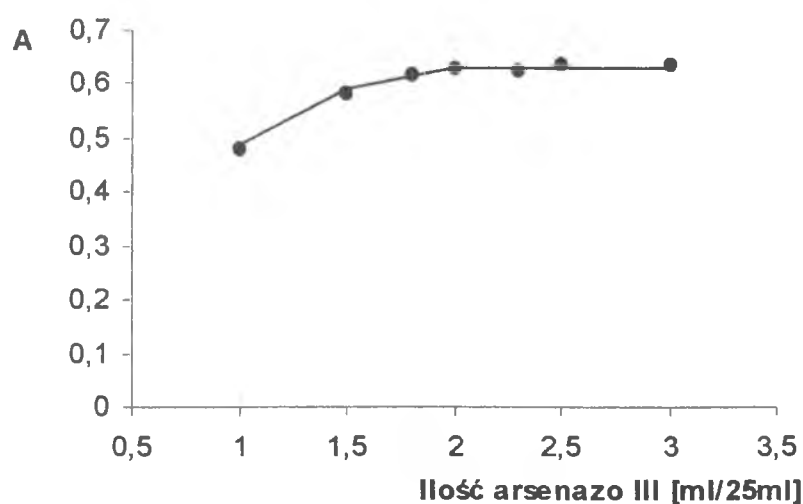
Rysunek 12. i Tabela 31.
Zależność absorbancji od stężenia Ce(IV) dla prób zawierających 10 μg teofiliny, $n = 3$.

4.1.4. Wpływ zmiennych ilości arsenazo III na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.

W celu zbadania wpływu ilości arsenazo III na wyniki oznaczeń badanych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

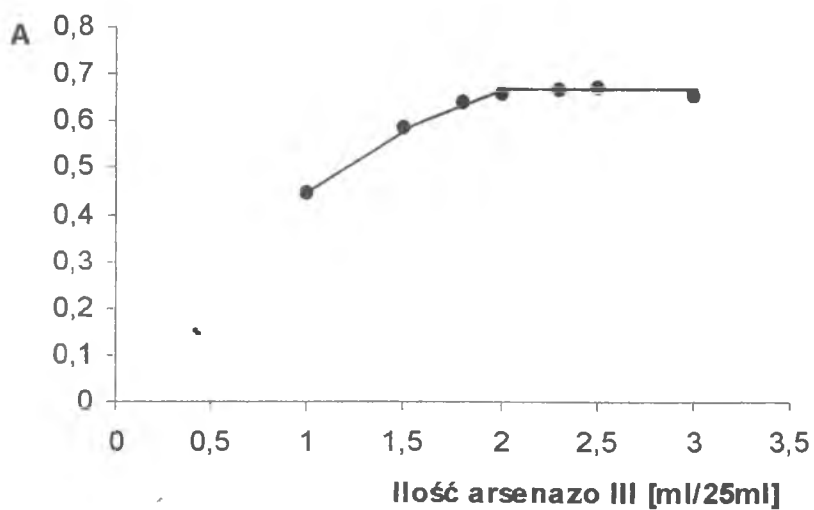
1. Do zlewki wprowadzono 100 μg jonów Ce^{4+} (a w przypadku kwasu taninowego 110 μg) oraz odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcje redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono pH roztworów na około 3 i ilościowo przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono zmienne ilości 0,05% roztworu arsenazo III i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1 \text{ cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 13 do 18 i w tabelach od 32 do 37.



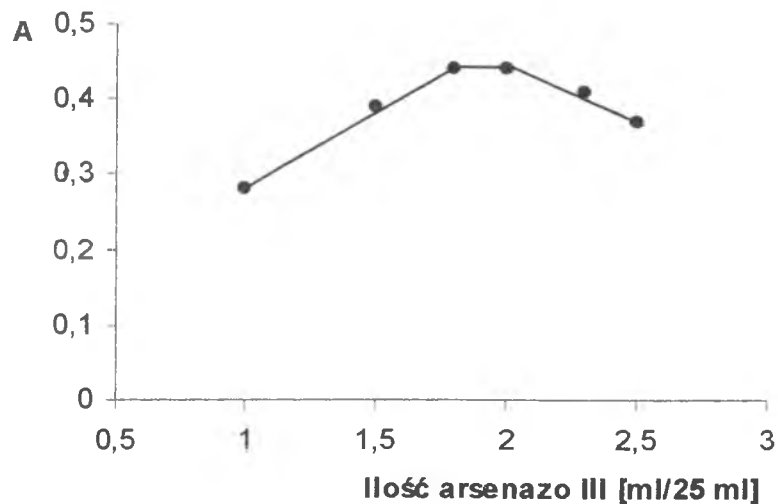
Ilość arsenazo III [ml /25 ml]	A _{sr}
1	0,478
1,5	0,582
1,8	0,618
2	0,630
2,3	0,627
2,5	0,636
3	0,639

Rysunek 13. i Tabela 32.
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 5 μg kwasu salicylowego, $n = 3$.



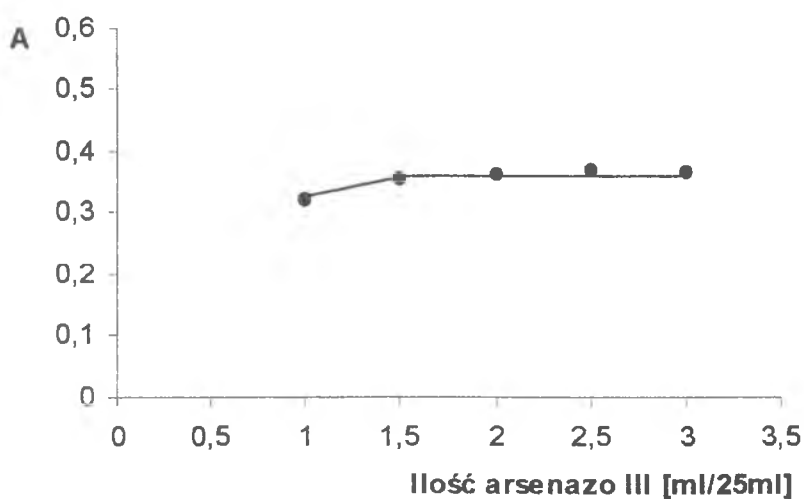
Ilość arsenazo III [ml / 25 ml]	A _{śr}
1	0,446
1,5	0,589
1,8	0,644
2	0,662
2,3	0,668
2,5	0,672
3	0,654

Rysunek 14. i Tabela 33.
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 5 µg kwasu galusowego, n = 3.



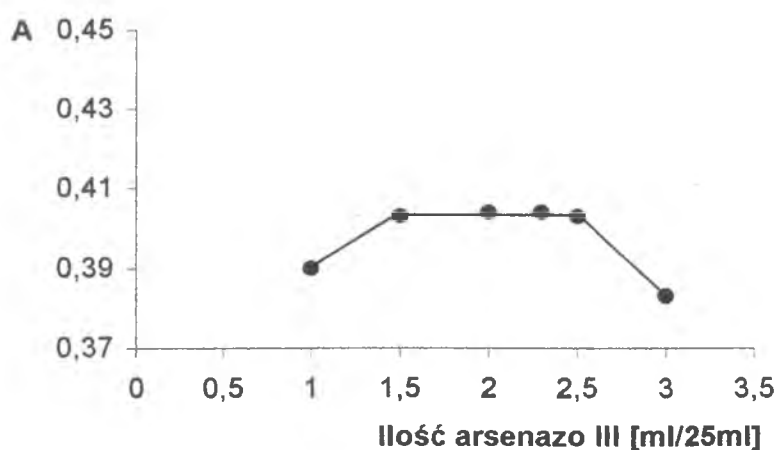
Ilość arsenazo III [ml / 25 ml]	A _{śr}
1	0,280
1,5	0,390
1,8	0,440
2	0,440
2,3	0,410
2,5	0,370

Rysunek 15. i Tabela 34.
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 5 µg kwasu taninowego, n = 3.



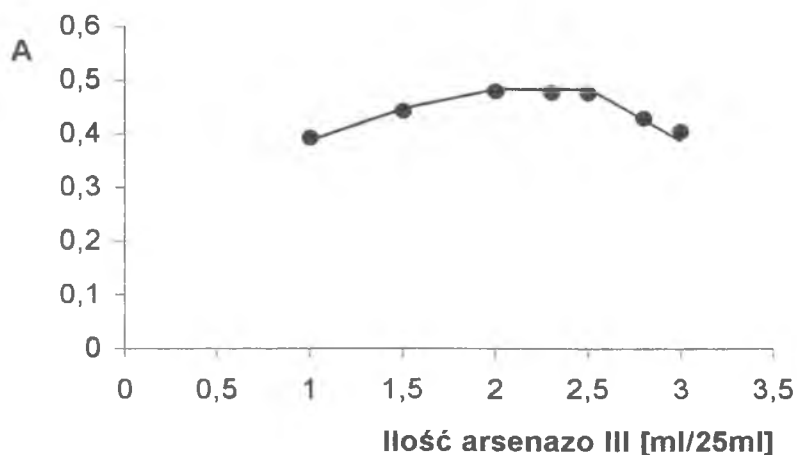
Ilość arsenazo III [ml / 25 ml]	A _{śr}
1	0,322
1,5	0,357
2	0,364
2,5	0,368
3,0	0,366

Rysunek 16. i Tabela 35.
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 5 µg (+)-katechiny, n = 3.



Ilość arsenazo III [ml / 25 ml]	A _{śr}
1	0,390
1,5	0,403
2,0	0,404
2,3	0,404
2,5	0,403
3,0	0,383

Rysunek 17. i Tabela 36.
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 10 µg kofeiny, n = 3.



Ilość arsenazo III [ml / 25 ml]	A _{śr}
1	0,392
1,5	0,441
2,0	0,478
2,3	0,476
2,5	0,475
2,8	0,428
3,0	0,404

Rysunek 18. i Tabela 37.

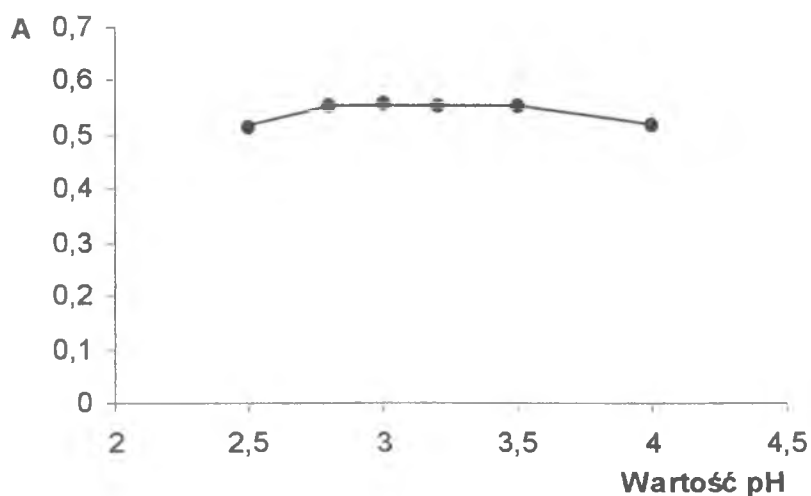
Zależność absorbancji od ilości arsenazo III dla prób zawierających 10 µg teofiliny, n = 3.

4.1.5. Wpływ pH na wyniki oznaczeń badanych reduktorów.

W celu określenia wpływu pH na wyniki oznaczeń badanych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

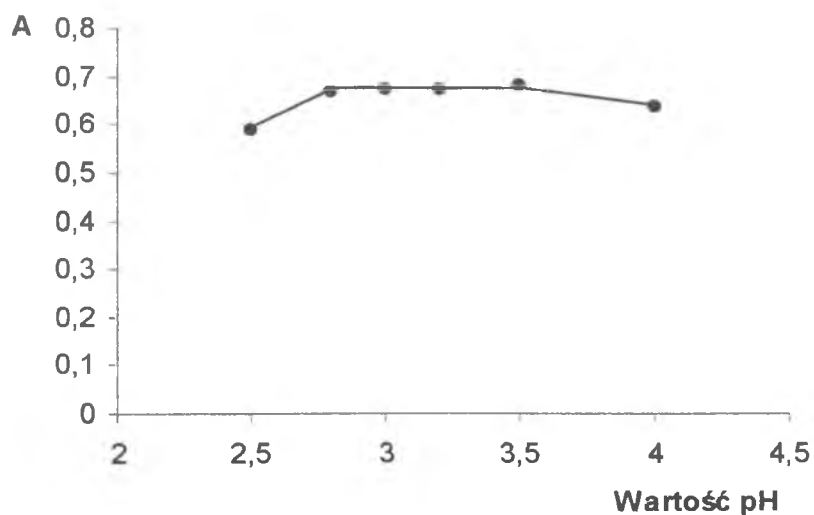
1. Do zlewki wprowadzono 100 µg Ce^{4+} (a w przypadku kwasu taninowego 110 µg) oraz odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcje redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono odpowiednie pH prób za pomocą roztworów NaOH (1; 0,1; 0,01 mol/ dm³), po czym przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III (a w przypadku kwasu taninowego 2 ml) i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1$ cm, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 19 do 24 i w tabelach od 38 do 43.



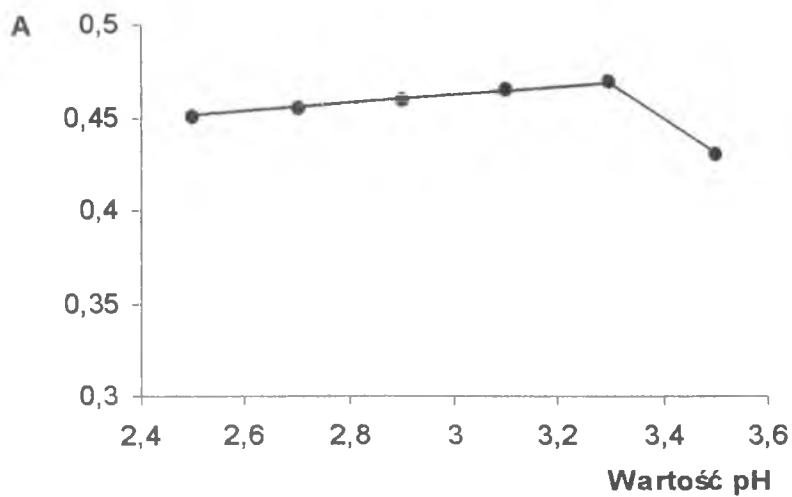
pH próby	$A_{\text{śr}}$
2,5	0,515
2,8	0,555
3,0	0,558
3,2	0,553
3,5	0,554
4,0	0,518

Rysunek 19. i Tabela 38.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 5 μg kwasu salicylowego, $n = 3$.



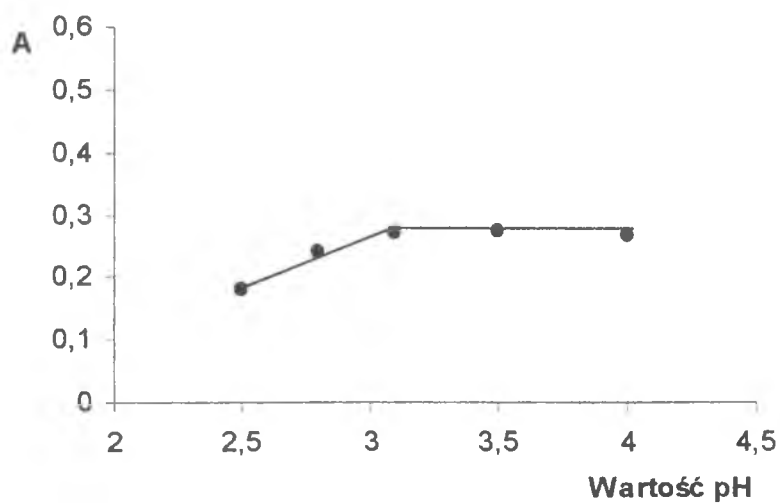
pH próby	$A_{\text{śr}}$
2,5	0,586
2,8	0,668
3,0	0,670
3,2	0,673
3,5	0,680
4,0	0,636

Rysunek 20. i Tabela 39.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 5 μg kwasu galusowego, $n = 3$.



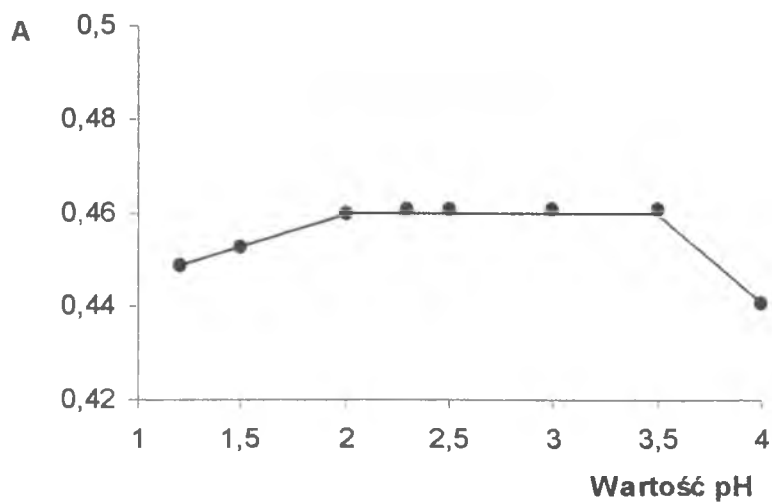
pH próby	$A_{\text{śr}}$
2,5	0,450
2,7	0,455
2,9	0,460
3,1	0,465
3,3	0,470
3,5	0,430

Rysunek 21. i Tabela 40.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 5 μg kwasu taninowego, $n = 3$.



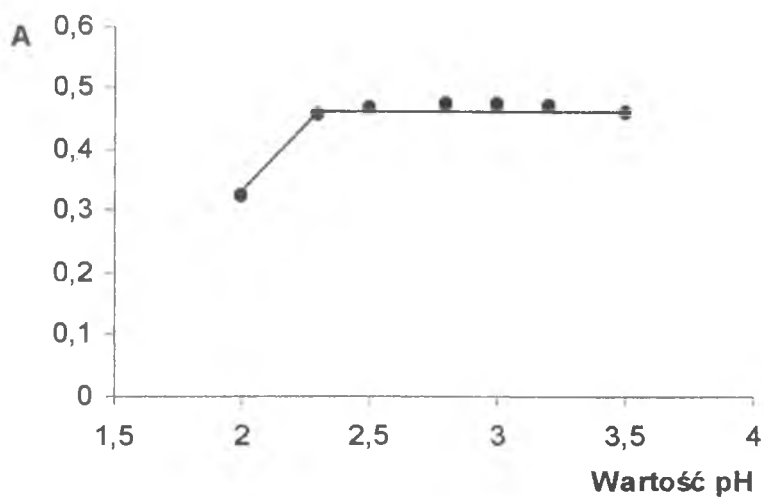
pH próby	$A_{\text{śr}}$
2,5	0,181
2,8	0,243
3,1	0,273
3,5	0,275
4,0	0,269

Rysunek 22. i Tabela 41.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 5 μg (+)-katechiny, $n = 3$.



pH próby	$A_{\text{śr}}$
1,2	0,449
1,5	0,453
2,0	0,460
2,3	0,461
2,5	0,461
3,0	0,461
3,5	0,461
4,0	0,441

Rysunek 23. i Tabela 42.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 10 μg kofeiny, $n = 3$.



pH próby	$A_{\text{śr}}$
2,0	0,324
2,3	0,458
2,5	0,468
2,8	0,476
3,0	0,474
3,2	0,472
3,5	0,462

Rysunek 24. i Tabela 43.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 10 μg teofiliny, $n = 3$.

Wyniki badań przeprowadzonych nad optymalizacją warunków oznaczania badanych reduktorów zebrano w tabeli 44.

Tabela 44. Optymalne warunki oznaczania badanych reduktorów z zastosowaniem układu odczynników: jony Ce^{4+} , arsenazo III.

Analit	Ilość jonów Ce^{4+} [μg / 25 ml]	Warunki reakcji redoks			Ilość 0,05% roztworu arsenazo III [ml / 25 ml]
		pH	Czas [min]	Temperatura $^{\circ}C$	
Kwas salicyłowy	70 – 140	2,8 – 3,5	30	22 ± 2	2,0 – 3,0
Kwas galusowy	70 – 120	2,8 – 3,5	15	22 ± 2	2,0 – 2,5
Kwas taninowy	100 – 120	2,7 – 3,3	15	22 ± 2	1,8 – 2,0
(+)Katechina	80 – 120	3,1 – 4,0	15	22 ± 2	1,5 – 3,0
Kofeina	80 – 120	2,5 – 3,5	30	60 ± 2	1,5 – 2,5
Teofilina	80 – 170	2,5 – 3,5	30	22 ± 2	2,0 – 2,5

4.1.6. Krzywe wzorcowe do oznaczania badanych reduktorów.

Dla optymalnych warunków przeprowadzenia reakcji redoks i kompleksowania wykreślono krzywe wzorcowe, które przedstawiono na rysunkach od 25 do 30. Absorbancję badanych prób (A) mierzono na spektrofotometrze „helios”, w kuwetach o grubości warstwy absorbującej $l = 1$ cm.

Dla krzywych wzorcowych obliczono współczynniki a i b z równania regresji oraz współczynnik korelacji. Równanie ma postać:

$$y = ax + b, \quad \text{gdzie:}$$

x – zmienna niezależna, stężenie analitu [$\mu g/ml$]

y – zmienna zależna A

Na podstawie zależności: $A_{sr} = \varepsilon \cdot l \cdot c$, gdzie:

A_{sr} – średnia wartość absorpcji z sześciu serii pomiarowych

l – grubość warstwy absorbującej [cm]

c – stężenie analitu [mol/l]

ε – molowy współczynnik absorpcji [l/mol·cm]

wyznaczono, w przypadku badanych układów złożonych, sumaryczne molowe współczynniki absorpcji (ε^s).

Próby i roztwory odniesienia do wykreślenia krzywych wzorcowych przygotowywano postępując zgodnie ze schematem 1.

Schemat 1. Sposób postępowania przy oznaczaniu reduktorów za pomocą układu odczynników: jony Ce^{4+} , arsenazo III.

Do małej zlewki wprowadzono:

1. Odpowiednią ilość jonów Ce^{4+} i zmienne ilości analitu (reduktora)

↓ przeprowadzono reakcję redoks w określonym czasie i temperaturze

2. Ustalono pH roztworami NaOH (1; 0,1; 0,01 mol/dm³)

↓ przeniesiono ilościowo do kolbki o pojemności 25 ml

3. Wprowadzono odpowiednią ilość 0,05% roztworu arsenazo III

↓ dopełniono wodą redestylowaną do kreski

4. Pomiary absorbancji wykonywano po 15 minutach od wywołania reakcji barwnej przy $\lambda = 655$ nm, względem wody jako roztworu odniesienia

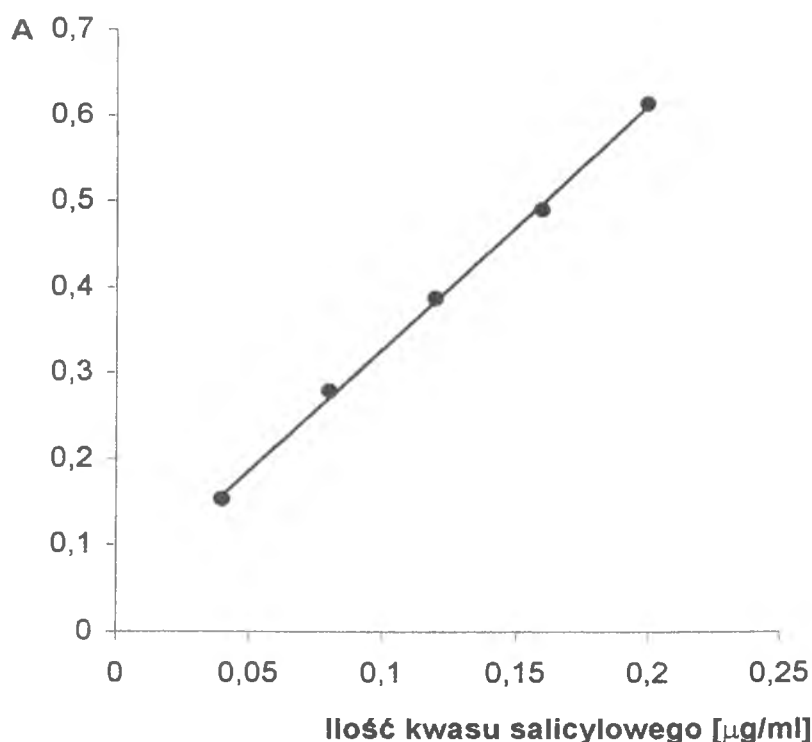
Dokonano również statystycznej oceny opracowanych metod wyznaczając:

➤ odchylenie standardowe:
$$S = \sqrt{\frac{\sum |\bar{X} - X_i|^2}{n-1}}$$

➤ względne odchylenie standardowe:
$$S_r \% = \frac{S \cdot 100\%}{\bar{X}}$$

➤ przedział ufności:
$$\mu = \pm t_{0,95} \cdot \bar{S}; \text{ gdzie } \bar{S} = \frac{S}{\sqrt{n}}; \quad t_{0,95} = 2,571$$

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabelach od 45 do 50.



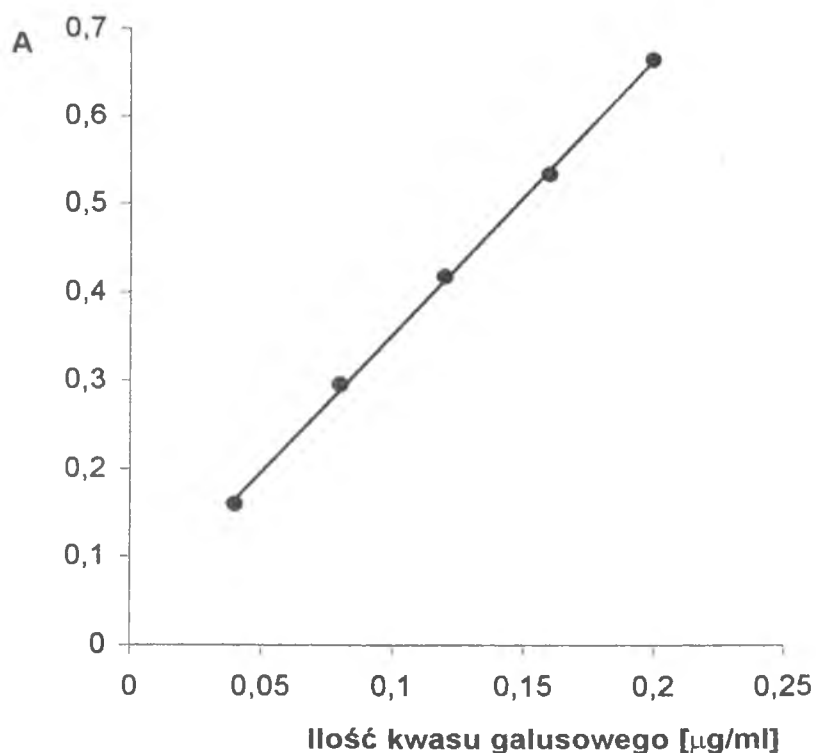
Rysunek 25.

**Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu salicylowego w układzie:
Ce(IV), arsenazo III**

Tabela 45. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej

Ilość kwasu salicylowego [µg/ml]	ABSORBANCJA; oznaczano n = 6			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,04	0,153	0,010	6,54	0,010
0,08	0,279	0,011	3,94	0,012
0,12	0,387	0,006	1,55	0,006
0,16	0,490	0,003	0,61	0,003
0,20	0,613	0,007	1,14	0,007

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu salicylowego 0,04 – 0,20 µg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KS} + b$ przyjmują wartość: $a = 2,8275$; $b = 0,0451$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9994. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 5,66 \cdot 10^5$ l/mol · cm i jest około jedenastokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.



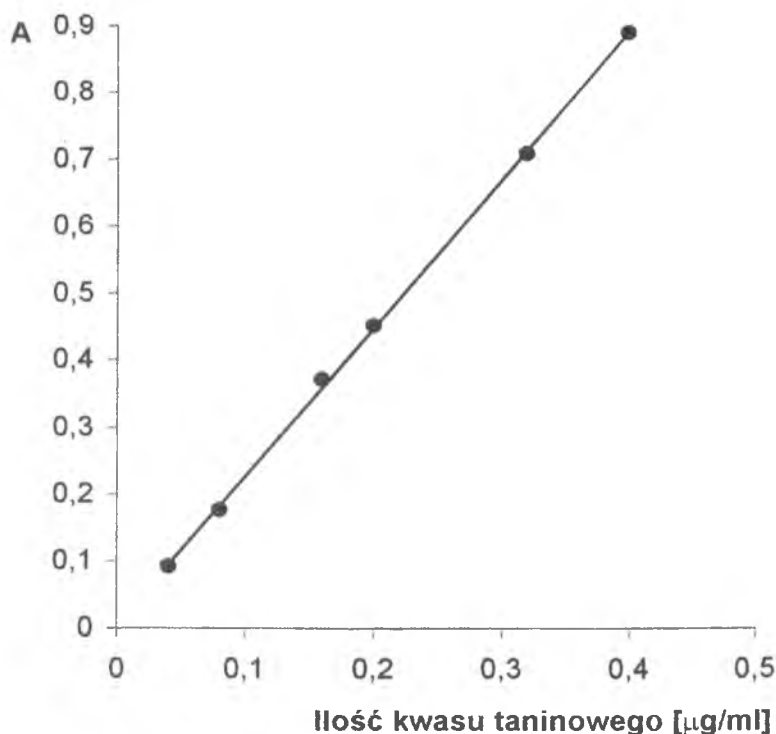
Rysunek 26.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego w układzie:
Ce(IV), arsenazo III.

Tabela 46. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kwasu galusowego [$\mu\text{g/ml}$]	ABSORBANCJA; oznaczono $n = 6$			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,04	0,160	0,005	3,12	0,005
0,08	0,296	0,008	2,70	0,008
0,12	0,418	0,005	1,20	0,005
0,16	0,534	0,006	1,12	0,005
0,20	0,664	0,006	0,90	0,005

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu galusowego 0,04 – 0,20 $\mu\text{g/ml}$. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KG} + b$ przyjmują wartość: $a = 3,1150$; $b = 0,0406$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9996. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 6,06 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ i jest około dwunastokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.



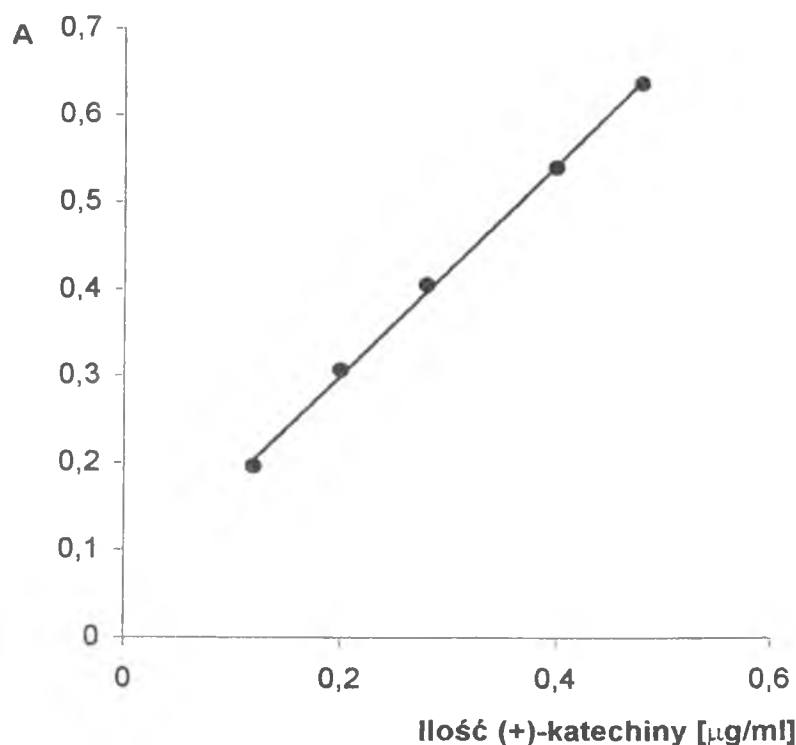
Rysunek 27.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu taninowego w układzie:
Ce(IV) i arsenazo III.

Tabela 47. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kwasu taninowego [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,04	0,092	0,004	4,35	0,004
0,08	0,176	0,003	1,70	0,003
0,16	0,372	0,004	1,08	0,004
0,20	0,453	0,005	1,10	0,005
0,32	0,709	0,004	0,56	0,004
0,40	0,890	0,003	0,34	0,003

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu galusowego 0,04 – 0,40 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KT} + b$ przyjmują wartość: $a = 2,2121$; $b = 0,0063$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9996. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 3,84 \cdot 10^6$ l/mol·cm i jest około sześćdziesięcioośmiokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.



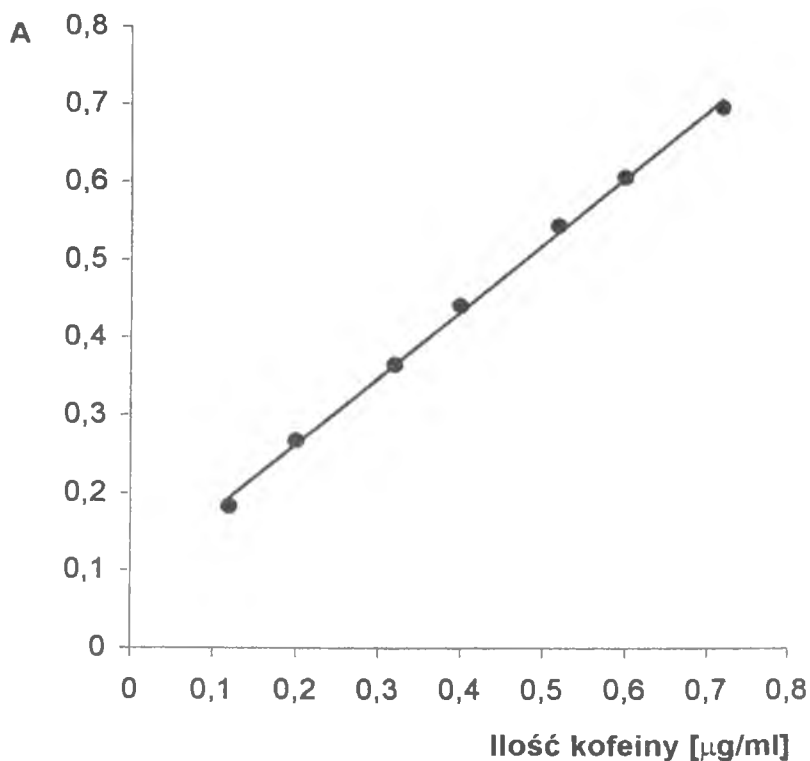
Rysunek 28.

Krzywa wzorcowa do oznaczania (+)-katechiny w układzie: Ce(IV) i arsenazo III.

Tabela 48. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej

Ilość katechiny [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,12	0,196	0,008	4,10	0,008
0,20	0,307	0,004	1,30	0,004
0,28	0,405	0,004	0,99	0,004
0,40	0,540	0,017	3,15	0,017
0,48	0,636	0,005	0,79	0,005

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu galusowego 0,12 – 0,48 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KAT} + b$ przyjmują wartość: $a = 1,2052$; $b = 0,0603$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9986. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 4,26 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ i jest około ośmiokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.



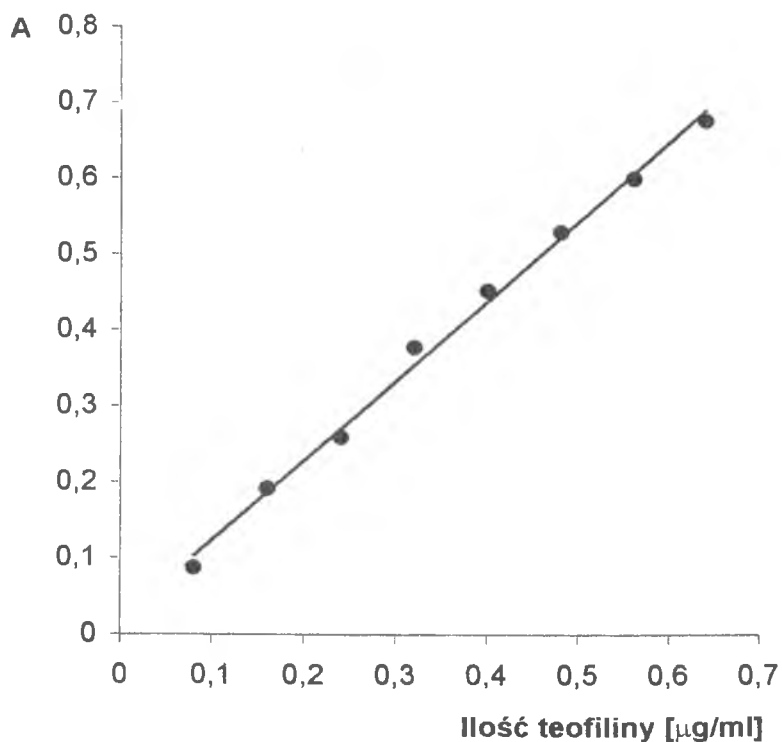
Rysunek 29.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kofeiny w układzie: Ce(IV) i arsenazo III.

Tabela 49. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kofeiny [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,12	0,183	0,002	1,23	0,002
0,20	0,267	0,005	2,00	0,006
0,32	0,365	0,004	1,09	0,005
0,40	0,441	0,009	2,09	0,009
0,52	0,543	0,002	0,32	0,002
0,60	0,606	0,008	1,35	0,008
0,72	0,696	0,005	0,72	0,005

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu galusowego 0,12 – 0,72 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{\text{KOF}} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,8539$; $b = 0,0915$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9983. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\varepsilon_{655}^S = 2,25 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ i jest około czterokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.



Rysunek 30.

Krzywa wzorcowa do oznaczania teofiliny w układzie: Ce(IV) i arsenazo III.

Tabela 50. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość teofiliny [µg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S_r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,16	0,192	0,005	2,60	0,005
0,24	0,259	0,005	1,93	0,005
0,32	0,378	0,004	1,06	0,004
0,40	0,452	0,004	0,88	0,004
0,48	0,529	0,005	0,94	0,005
0,56	0,600	0,004	0,67	0,004
0,64	0,676	0,006	0,89	0,006

Badany układ spełnia prawo Beera w granicach stężeń kwasu galusowego 0,16 – 0,64 µg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{\text{TEOF}} + b$ przyjmują wartość: $a = 1,0476$; $b = 0,0196$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9976. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 2,07 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ i jest około czterokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III.

4.2. Zastosowanie układu odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli do oznaczania kwasu galusowego, kwasu taninowego i (+)-katechiny.

4.2.1. Badania wstępne.

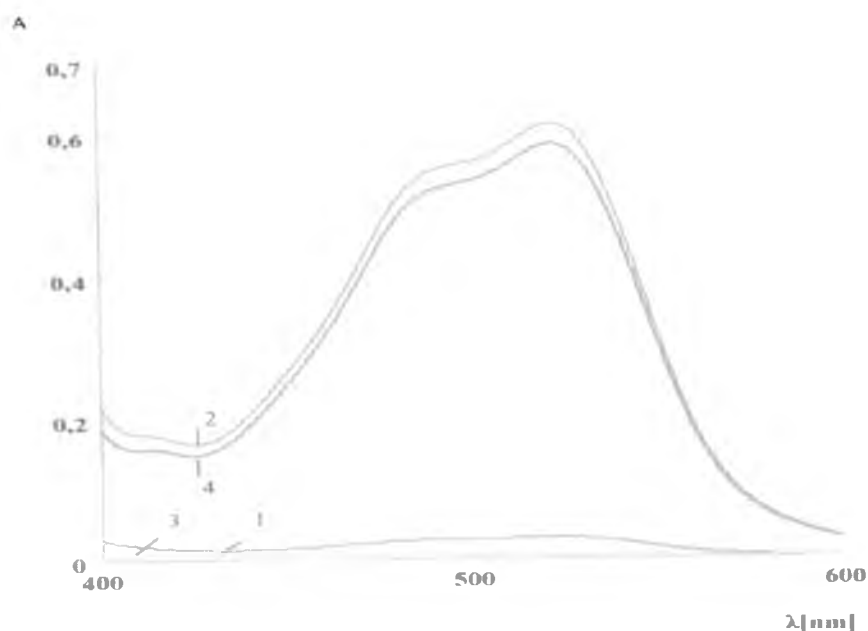
Przebieg sprzężonych reakcji redoksowo – kompleksowych w układzie: Fe(III) - reduktor – 2,2'-bipirydyli prowadzi do powstania barwnego związku kompleksowego $[\text{Fe}(2,2'\text{-bip})_3]^{2+}$, który wykazuje maksymalną absorpcję przy długości fali $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$. Powstający kompleks stanowi podstawę spektrofotometrycznych oznaczeń, a zwiększenie efektu barwnego zależy od liczby elektronów przekazywanych utleniaczowi przez cząsteczkę oznaczanego reduktora. Gdy różnica potencjałów normalnych badanych układów redoks $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ i $R_{\text{u}} / R_{\text{r}}$ jest niewielka proces utleniania zachodzi powoli i w niewielkim stopniu. Z tego względu nie można zastosować układu Fe(III) i 2,2'-bipirydyli do opracowania spektrofotometrycznych metod oznaczania kofeiny, teofiliny i kwasu salicylowego. Dla związków o silnych właściwościach redukujących tj. kwas galusowy, kwas taninowy oraz (+)-katechina reakcja utleniania za pomocą jonów Fe^{3+} przebiega szybko, a związanie powstających jonów Fe^{2+} w trwały kompleks przesuną potencjał redoks układu $\text{Fe}^{3+} / \text{Fe}^{2+}$ w stronę wyższych wartości, co warunkuje ilościowy przebieg reakcji utleniania badanych reduktorów

Dla ustalenia analitycznych warunków oznaczania wybranych reduktorów wykreślono krzywe spektrofotometryczne dla prób o składzie:

1. Fe(III), analit
2. 2,2'-bipirydyli
3. Fe(III), 2,2'-bipirydyli
4. Fe(III), analit, 2,2'-bipirydyli

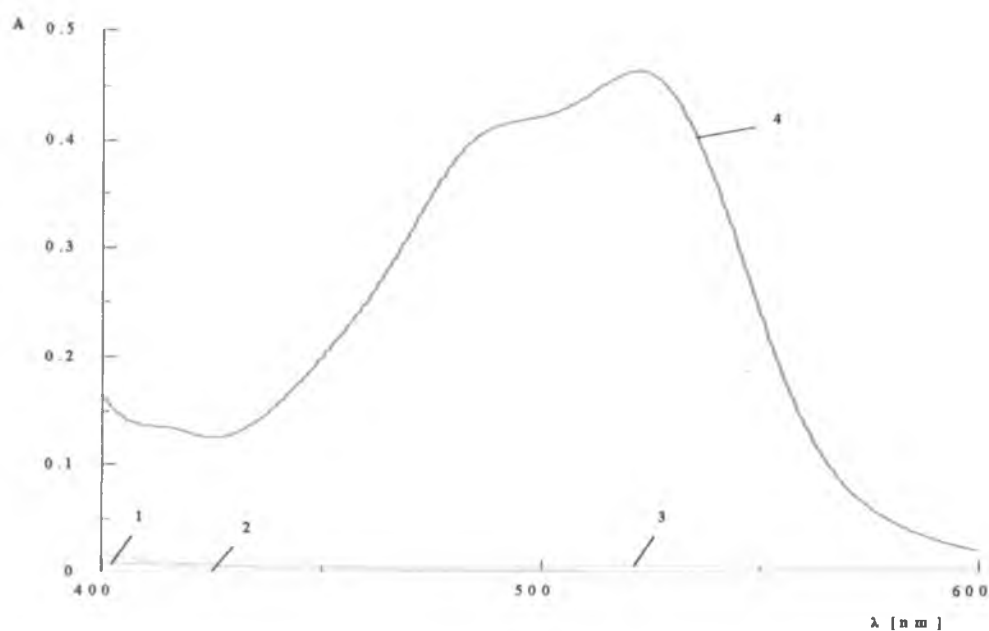
Objętość wszystkich prób była równa 25 ml, pH ustalono na około 2,4 roztworem NaOH ($1 \text{ mol} / \text{dm}^3$),

Zależność absorpcji badanych prób od długości fali światła rejestrowano w zakresie 400 – 600 nm. Charakterystyki widmowe sporządzonych prób przedstawiają rysunki od 31 do 33.



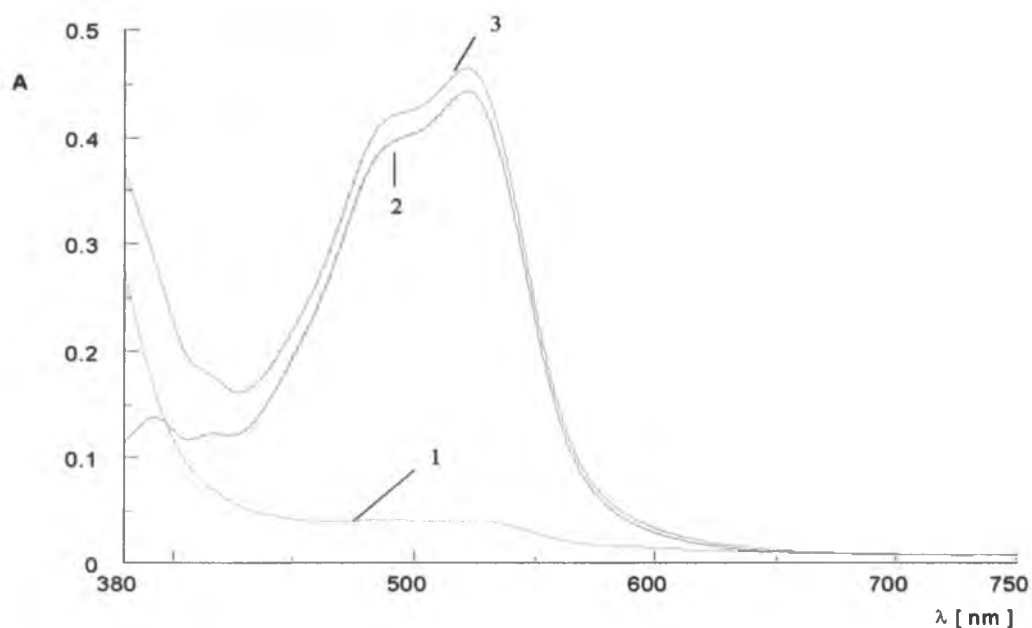
Rysunek 31. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 200 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydylu (względem wody)
- 2) 200 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 50 μg kwasu taninowego, 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydylu (względem wody)
- 3) 200 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 50 μg kwasu taninowego (względem wody)
- 4) 200 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 50 μg kwasu taninowego (względem roztworu odniesienia)



Rysunek 32. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 170 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 50 μg kwasu galusowego
- 2) 3 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydylu
- 3) 170 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 3 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydylu
- 4) 170 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 50 μg kwasu galusowego, 3 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydylu



Rysunek 33. Krzywe spektrofotometryczne dla prób:

- 1) 100 $\mu\text{g Fe}^{3+}$ i 5 ml 0,5 % roztworu 2,2' – bipirydyłu (względem wody)
- 2) 100 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 100 μg katechiny i 5 ml 0,5 % roztworu 2,2' – bipirydyłu (względem roztworu odniesienia)
- 3) 100 $\mu\text{g Fe}^{3+}$, 100 μg katechiny i 5 ml 0,5 % roztworu 2,2' – bipirydyłu (względem wody)

Przebieg krzywych spektrofotometrycznych dla oznaczanych reduktorów (kwas galusowy, kwas taninowy, (+)-katechina) wskazuje na obecność w roztworach badanych związku kompleksowego $[\text{Fe}(2,2'\text{-bip})_3]^{2+}$. Świadczy to o tym, że oznaczane reduktory, redukują jony Fe^{3+} do Fe^{2+} , które są następnie wiązane w kompleks z 2,2'-bipirydylem. Stąd też analityczną długością fali światła jest wartość charakterystyczna dla tego związku kompleksowego tzn. $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$. Powstające w badanych warunkach produkty utlenienia kwasu galusowego i taninowego oraz (+)-katechiny są bezbarwne, dlatego o mierzonym efekcie analitycznym decyduje jedynie zabarwienie powstającego kompleksu.

4.2.2. Wpływ czasu i temperatury reakcji redoks na wyniki oznaczeń badanych reduktorów

W celu ustalenia optymalnego czasu przeprowadzenia reakcji utleniania i redukcji dla oznaczenia badanych reduktorów, przygotowano serie prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono 200 μg jonów Fe^{3+} i odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w temperaturze pokojowej oraz w określonym czasie.
3. Ustalono pH na około 2,4 i roztwór przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej.
4. Wprowadzono 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydyli i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego, w kuwetach o grubości $l = 1$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki, będące różnicą absorbancji między badaną próbą a ślepą próbą, przedstawiono w tabelach od 51 do 53.

Tabela 51. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 50 μg kwasu galusowego, $n = 3$.

Czas [min]	15	30	45	60	90
A_{sr}	0,487	0,499	0,522	0,536	0,554

Tabela 52. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 50 μg kwasu taninowego, $n = 3$.

Czas [min]	15	30	45	60	90
A_{sr}	0,212	0,256	0,279	0,301	0,323

Tabela 53. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej dla 100 µg (+)-katechiny, n = 3.

Czas [min]	15	30	45	60	90
$A_{\text{śr}}$	0,509	0,529	0,536	0,542	0,545

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że absorbancja uzyskuje stałą wartość dla roztworów kwasu galusowego i (+)-katechiny jeśli proces redoks jest przeprowadzany nie dłużej niż trzydzieści minut w temperaturze pokojowej. W przypadku kwasu taninowego nie było możliwe ustalenie optymalnego czasu prowadzenia reakcji utleniania i redukcji w temperaturze pokojowej. Z tego względu postanowiono zbadać zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w podwyższonej temperaturze (60°C)

Próby do badań przygotowywano w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono 200 µg jonów Fe^{3+} i 50 µg kwasu taninowego.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w odpowiednim czasie, równocześnie ogrzewając próby w łaźni wodnej o temperaturze 60 °C.
3. Po ochłodzeniu roztworu, ustalono pH na około 2,4 i przeniesiono ilościowo do kolbki miarowej.
4. Wprowadzono 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydyli i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego, w kuwetach o grubości $l = 1$ cm, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki, będące różnicą między absorbancją badanej próby i roztworu odniesienia, przedstawiono w tabeli 54.

Tabela 54. Zależność absorbancji od czasu utleniania i redukcji w temperaturze 60 °C dla 50 µg kwasu taninowego, n = 3.

Czas [min]	15	30	45	60	90
$A_{\text{śr}}$	0,523	0,560	0,571	0,585	0,622

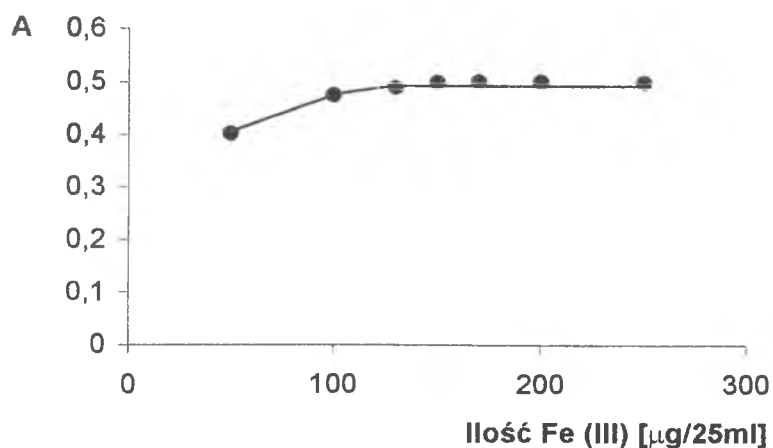
Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że absorbancja prób uzyskuje stałą wartość jeżeli proces redoks jest prowadzony w podwyższonej temperaturze w przedziale czasowym od 30 do 60 minut.

4.2.3. Wpływ zmiennych ilości Fe(III) na wyniki oznaczeń badanych reduktorów

W celu ustalenia wpływu ilości jonów Fe^{3+} na wyniki oznaczeń badanych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

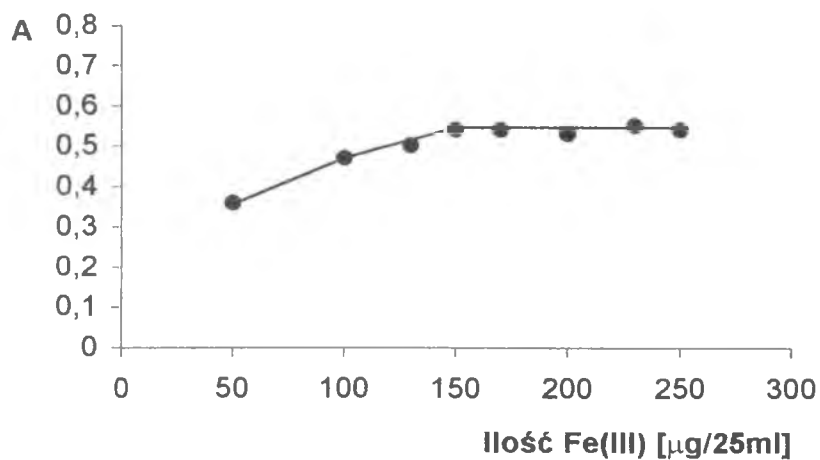
1. Do zlewki wprowadzono zmienne ilości jonów Fe^{3+} oraz odpowiednią ilość analitu.
2. Przeprowadzono reakcję redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono pH roztworów na około 2,4 i ilościowo przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydyli i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1 \text{ cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 34 do 36 i w tabelach od 55 do 57.



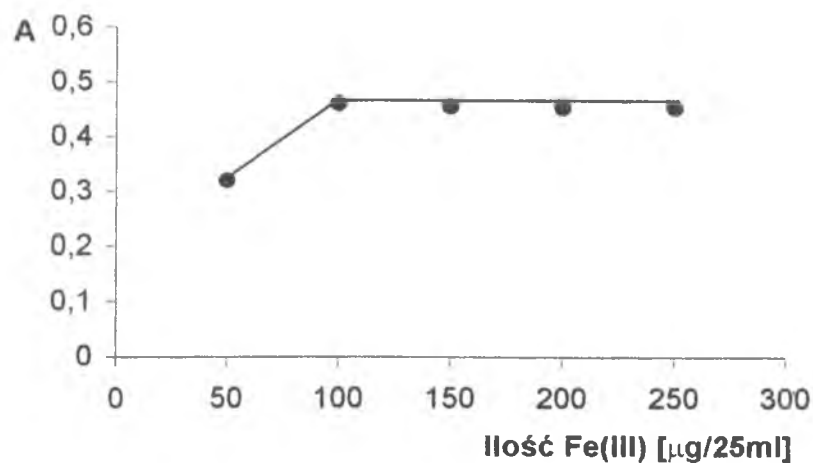
Ilość Fe^{3+} [$\mu\text{g} / 25 \text{ ml}$]	$A_{\text{śr}}$
50	0,401
100	0,474
130	0,489
150	0,499
170	0,500
200	0,500
250	0,499

Rysunek 34. i **Tabela 55.**
Zależność absorbancji od stężenia Fe(III) dla prób zawierających 50 μg kwasu galusowego, $n = 3$.



Ilość Fe ³⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
50	0,360
100	0,470
130	0,500
150	0,540
170	0,540
200	0,530
230	0,550
250	0,540

Rysunek 35. i Tabela 56.
Zależność absorbancji od stężenia Fe(III) dla prób zawierających 50 μg kwasu taninowego, n = 3.



Ilość Fe ³⁺ [μg / 25 ml]	A _{śr}
50	0,320
100	0,460
150	0,455
200	0,452
250	0,452

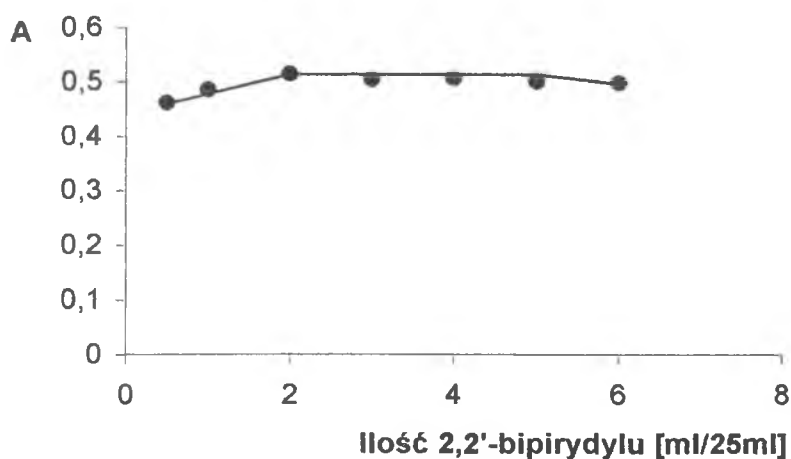
Rysunek 36. i Tabela 57.
Zależność absorbancji od stężenia Fe(III) dla prób zawierających 100 μg (+)-katechiny, n = 3.

4.2.4. Wpływ zmiennych ilości 2,2'-bipirydyłu na wyniki oznaczeń badanych reduktorów

W celu zbadania wpływu ilości 2,2'-bipirydyłu na wyniki oznaczeń badanych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

1. Do zlewki wprowadzono:
 - a) 170 μg jonów Fe^{3+} ; 50 μg kwasu galusowego;
 - b) 200 μg jonów Fe^{3+} ; 50 μg kwasu taninowego;
 - c) 100 μg jonów Fe^{3+} ; 100 μg (+)-katechiny;
2. Przeprowadzono reakcje redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono pH roztworów na około 2,4 i ilościowo przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono zmienne ilości 0,5% roztworu 2,2'bipirydyłu i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1 \text{ cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

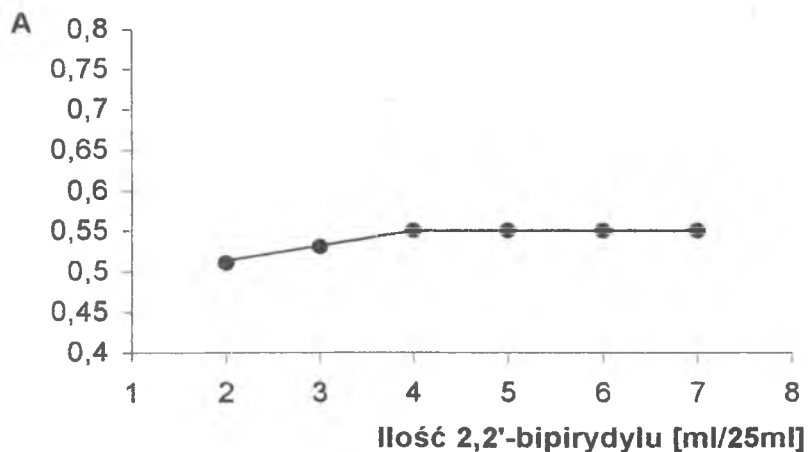
Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 37 do 39 i w tabelach od 58 do 60.



Ilość 2,2'-bipirydyłu [ml / 25 ml]	A _{śr}
0,5	0,461
1,0	0,485
2,0	0,513
3,0	0,503
4,0	0,506
5,0	0,500
6,0	0,497

Rysunek 37. i Tabela 58.

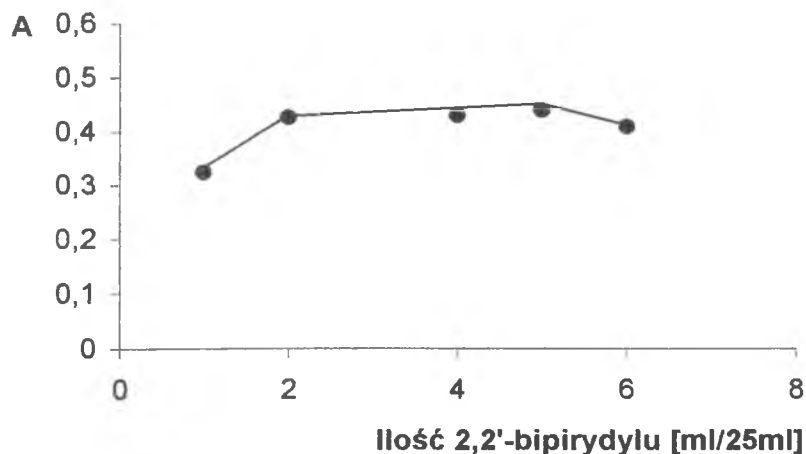
Zależność absorbancji od ilości 2,2'-bipirydyłu dla prób zawierających 50 μg kwasu galusowego, $n = 3$.



Ilość 2,2'-bipirydyłu [ml / 25 ml]	A _{śr}
2,0	0,510
3,0	0,530
4,0	0,550
5,0	0,550
6,0	0,550
7,0	0,550

Rysunek 38. i Tabela 59.

Zależność absorbancji od ilości 2,2'-bipirydyłu dla prób zawierających 50 µg kwasu taninowego, n = 3.



Ilość 2,2'-bipirydyłu [ml / 25 ml]	A _{śr}
1,0	0,325
2,0	0,426
4,0	0,430
5,0	0,440
6,0	0,410

Rysunek 39. i Tabela 60.

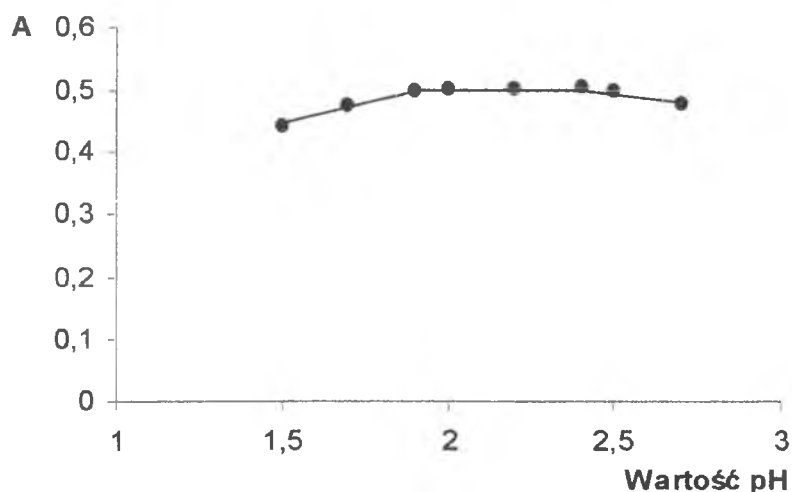
Zależność absorbancji od ilości 2,2'-bipirydyłu dla prób zawierających 100 µg (+)-katechiny, n = 3.

4.2.5. Wpływ pH na wyniki oznaczeń badanych reduktorów

W celu określenia wpływu pH na wyniki oznaczeń wybranych reduktorów, przygotowano serię prób i roztworów odniesienia w następujący sposób:

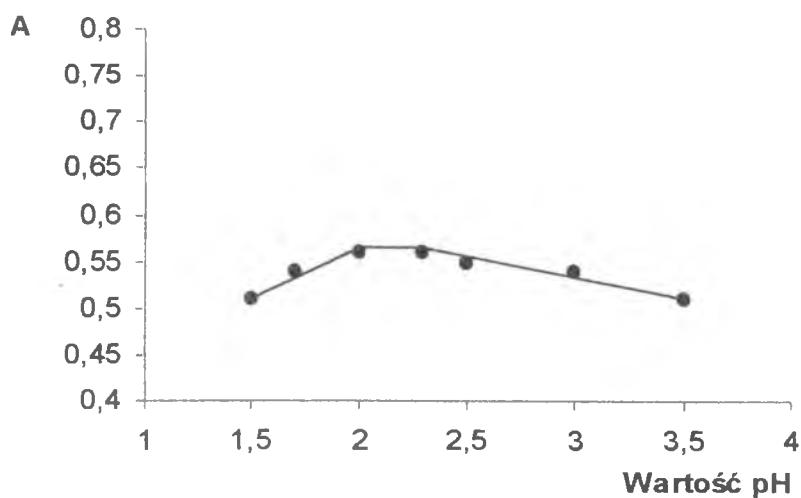
1. Do zlewki wprowadzono:
 - a) 170 μg jonów Fe^{3+} ; 50 μg kwasu galusowego;
 - a) 200 μg jonów Fe^{3+} ; 50 μg kwasu taninowego;
 - a) 100 μg jonów Fe^{3+} ; 100 μg (+)-katechiny;
2. Przeprowadzono reakcje redoks w optymalnych warunkach.
3. Ustalono odpowiednie pH prób za pomocą roztworów NaOH (1; 0,1; 0,01 mol/ dm^3), po czym przeniesiono je do kolbek miarowych.
4. Wprowadzono 5 ml 0,5% roztworu 2,2'-bipirydyli (a w przypadku kwasu galusowego 3 ml) i uzupełniono wodą redestylowaną do objętości 25 ml.
5. Dokonano pomiaru spektrofotometrycznego w kuwetach o grubości $l = 1 \text{ cm}$, względem wody jako roztworu odniesienia.

Uzyskane wyniki oznaczeń, będące różnicą między absorbancją próby i odpowiedniego roztworu odniesienia przedstawiono na rysunkach od 40 do 42 i w tabelach od 61 do 63.



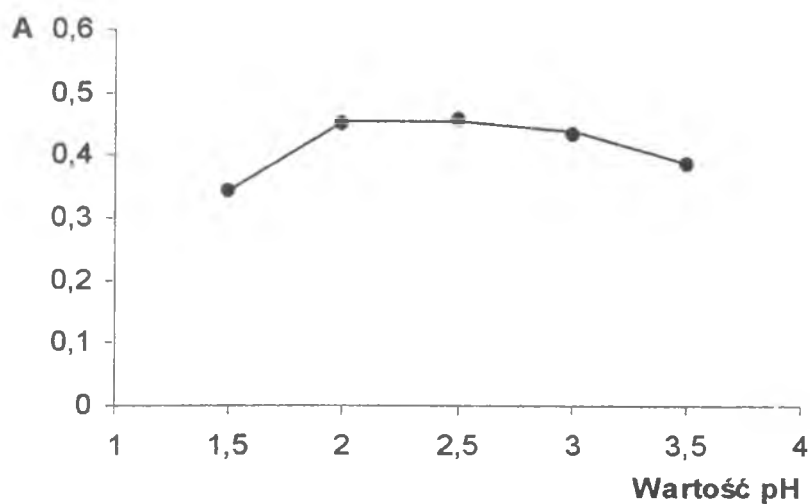
pH próby	A _{śr}
1,5	0,440
1,7	0,474
1,9	0,500
2,0	0,501
2,2	0,502
2,4	0,504
2,5	0,495
2,7	0,477

Rysunek 40. i Tabela 61.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 50 μg kwasu galusowego, $n = 3$.



pH próby	$A_{\text{śr}}$
1,5	0,510
1,7	0,540
2,0	0,560
2,3	0,560
2,5	0,550
3,0	0,540
3,5	0,510

Rysunek 41. i Tabela 62.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 50 µg kwasu taninowego, n = 3.



pH próby	$A_{\text{śr}}$
1,5	0,345
2,0	0,453
2,5	0,460
3,0	0,434
3,5	0,388

Rysunek 42. i Tabela 63.
Zależność absorbancji od pH dla prób zawierających 100 µg (+)-katechiny, n = 3.

Doświadczalnie ustalone, optymalne warunki dla przebiegu reakcji redoks i kompleksowania w układzie: Fe(III) - reduktor – 2,2'-dipirydył zebrano w tabeli 64.

Tabela 64. Wyniki badań nad optymalizacją warunków oznaczania badanych reduktorów z zastosowaniem układu odczynników: jony Fe^{3+} , 2,2'-bipirydyd.

Analit	Ilość jonów Fe^{3+} [μg / 25 ml]	Warunki reakcji redoks			Ilość 0,5% roztworu 2,2-bipirydydu [ml / 25 ml]
		pH	Czas [min]	Temperatura $^{\circ}\text{C}$	
Kwas galusowy	150 - 250	1,9 - 2,5	30	22 ± 2	2 - 6
Kwas taninowy	150 - 250	2,0 - 2,5	30	60 ± 2	4 - 7
(+)-Katechina	100 - 250	2,0 - 2,5	30	22 ± 2	2 - 5

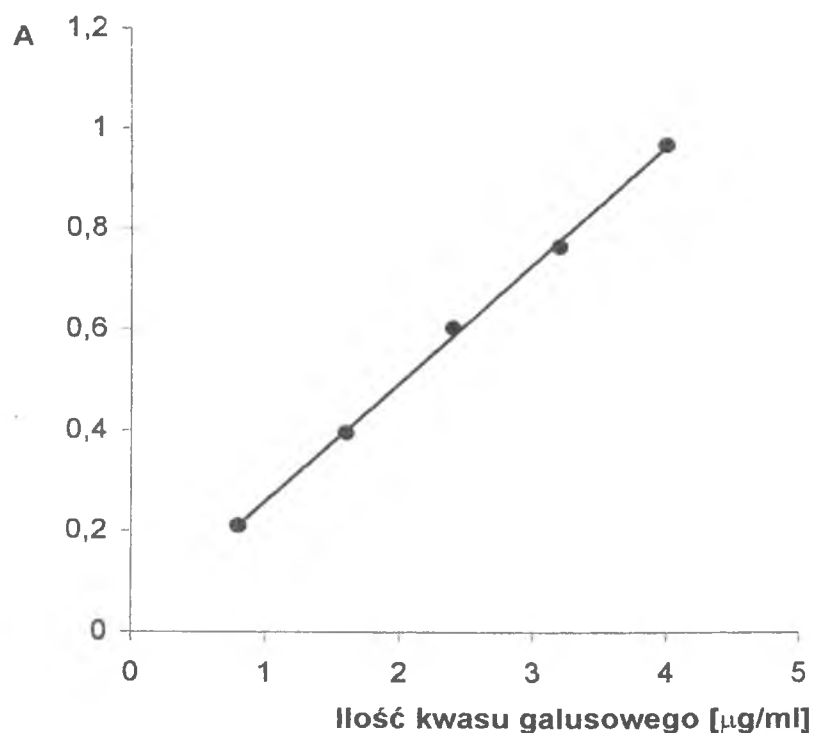
4.2.6. Krzywe wzorcowe do oznaczania badanych reduktorów.

Uwzględniając wyniki badań nad optymalizacją metody oznaczania badanych reduktorów wyznaczono krzywe wzorcowe, które przedstawiono na rysunkach 43 - 45. Ocenę statystyczną metod zawarto w tabelach od 65 do 67. Przygotowując próby do wyznaczenia krzywych wzorcowych postępowano zgodnie z schematem 2.

Schemat 2. Sposób postępowania przy oznaczaniu reduktorów za pomocą układu odczynników: jony Fe^{3+} , 2,2'-bipirydyd.

Do małej zlewki wprowadzono:

- 1. Odpowiednią ilość jonów Fe^{3+} i zmienne ilości analitu (reduktora)**
 ↓ przeprowadzono reakcję redoks w określonym czasie i temperaturze
- 2. Ustalono pH roztworami NaOH (1; 0,1; 0,01 mol/dm³)**
 ↓ przeniesiono ilościowo do kolbki o pojemności 25 ml
- 3. Wprowadzono odpowiednią ilość 0,5% roztworu 2,2'-bipirydydu**
 ↓ dopełniono wodą redestylowaną do kreski
- 4. Pomiary absorbancji wykonywano przy $\lambda = 522 \text{ nm}$.**



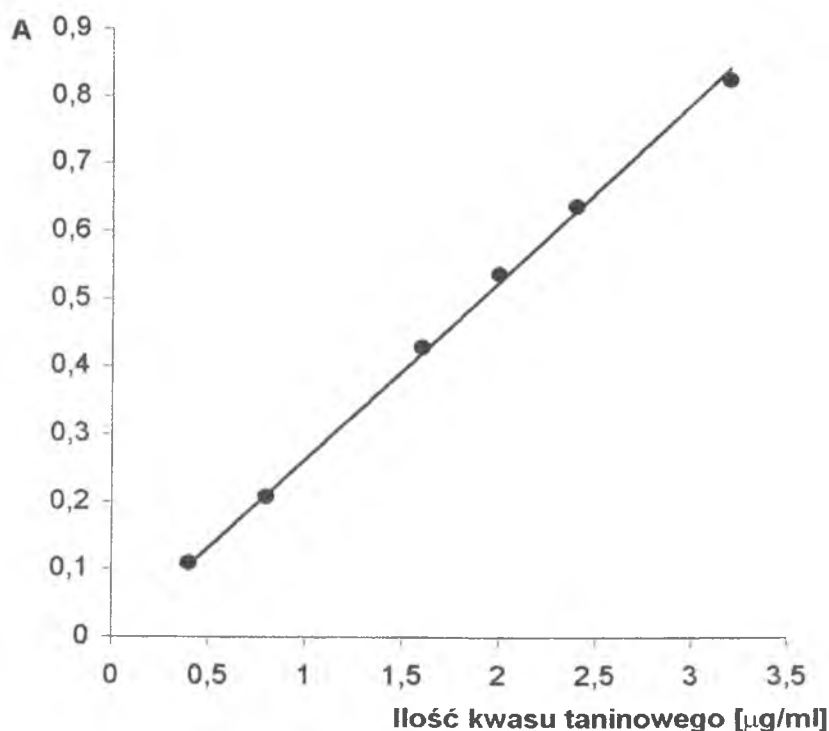
Rysunek 43.

**Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego w układzie:
Fe(III) i 2,2'-bipirydyli**

Tabela 65. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kwasu galusowego [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S _r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,8	0,211	0,002	0,95	0,002
1,6	0,396	0,002	0,51	0,002
2,4	0,604	0,002	0,33	0,002
3,2	0,764	0,002	0,26	0,002
4,0	0,968	0,002	0,21	0,002

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu galusowego 0,8-4,0 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KG} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,2353$; $b = 0,0240$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9994. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{522}^S = 4,23 \cdot 10^4$ l/mol·cm i jest około pięciokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Fe(II) za pomocą 2,2'-bipirydyli.



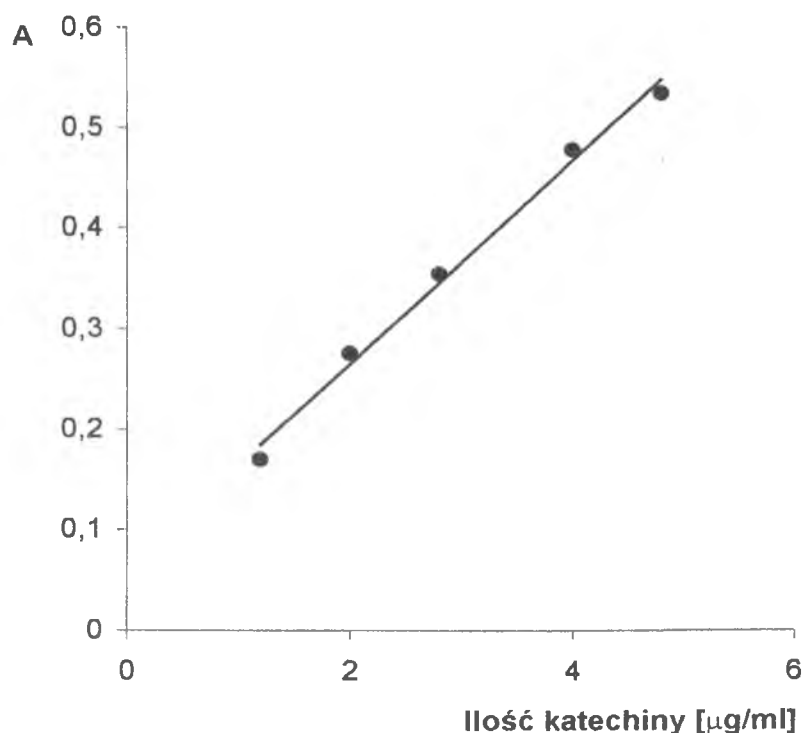
Rysunek 44.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu taninowego w układzie:
Fe(III) i 2,2'-bipirydyli

Tabela 66. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kwasu taninowego [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S _r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,4	0,109	0,005	4,59	0,005
0,8	0,208	0,005	2,40	0,005
1,6	0,429	0,005	1,17	0,005
2,0	0,536	0,006	1,12	0,005
2,4	0,637	0,005	0,78	0,005
3,2	0,824	0,006	0,73	0,006

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń kwasu taninowego 0,4-3,2 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KT} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,2587$; $b = 0,0088$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9988. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{522}^S = 4,51 \cdot 10^5$ l/mol·cm i jest około pięćdziesięciokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Fe(II) za pomocą 2,2'-bipirydyli.



Rysunek 45.

Krzywa wzorcowa do oznaczania (+)-katechiny w układzie: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli

Tabela 67. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość (+)-katechiny [μg/ml]	ABSORBANCJA, oznaczono n = 6			
	$\bar{X}$	S	S _r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
1,2	0,170	0,009	5,29	0,011
2,0	0,275	0,016	5,82	0,019
2,8	0,354	0,008	2,26	0,010
4,0	0,477	0,011	2,31	0,013
4,8	0,534	0,014	2,62	0,017

Badany układ spełnia prawo Beera w zakresie stężeń (+)-katechiny 1,2-4,8 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{\text{KAT}} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,1009$; $b = 0,0634$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9962. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\varepsilon_{522}^S = 3,72 \cdot 10^4 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$ i jest około czterokrotnie wyższy od molowego współczynnika absorpcji dla oznaczania Fe(II) za pomocą 2,2'-bipirydyli.

5. Badania chromatograficzne

5. 1. Warunki rozdzielania i oznaczania badanych substancji techniką chromatografii cienkowarstwowej.

Dobór fazy rozwijającej

Przeprowadzono szerokie badania nad doбором optymalnego układu rozwijającego dla rozdzielania badanych reduktorów. Na płytki chromatograficzne o wielkości 20 cm × 20 cm, oprócz wzorców badanych substancji наносzono również preparaty, które miały być przedmiotem dalszej analizy m.in. preparat farmaceutyczny Acifungin (w składzie: kwas taninowy, galusowy i salicylowy) oraz napar z różnych rodzajów herbaty (w składzie: kwas taninowy, galusowy, kofeina). Badania przeprowadzono na płytkach szklanych pokrytych 0,20 mm warstwą żelu krzemionkowego z wskaźnikiem fluorescencyjnym (Kieselgel 60 F₂₅₄ firmy Merck). Na fazę stacjonarną наносzono, za pomocą mikrostrzykawki po 5 µl roztworów wzorcowych badanych substancji, tak by plamka miała szerokość 3 mm. Na płytki наносzono po 12 plamek, 15 mm od brzegu i 15 mm od dołu. Rozwijanie chromatogramów, (w jednym kierunku) przeprowadzano w komorze wstępującej (firmy Camag), nasyconej parami składników fazy rozwijającej, w temperaturze pokojowej (22 ± 2°C). Chromatogramy rozwijano na długości 18 cm. W celu wywołania obrazów chromatograficznych płytki, po rozwinięciu chromatogramów i ich wysuszeniu w strumieniu zimnego powietrza, spryskiwano roztworem soli Fe(III), a następnie 2,2'-bipirydyli. Jako wywoływacz stosowano również światło UV o długości fali 254 nm. Przebadano szereg faz rozwijających. Wyniki tych badań zestawiono w tabeli 68, gdzie:

- „ – ” układ niezadowalający
- „ + ” układ zadowalający
- „ ++ ” układ dobry
- „ +++ ” układ bardzo dobry

Plamy alkaloidów na chromatogramach były widoczne tylko przy zastosowaniu światła UV. Związki polifenolowe w świetle widzialnym dają szaro – brunatne plamy. Po spryskaniu płytek roztworami Fe(III), a następnie 2,2'-bipirydyli plamy zmieniają barwę na czerwoną, co powoduje wzrost kontrastowości obrazów chromatograficznych oraz obniżenie granicy wykrywalności.

Tabela 68. Dobór fazy rozwijającej, dla rozdzielenia badanych substancji.

NR	UKŁAD ROZWIJAJĄCY	STOSUNEK OBJĘTOŚCIOWY	OCENA
1.	toluen – mrówczan etylu – kwas mrówkowy	5 : 4 : 1	+
2.	benzen – metanol – kwas octowy	45 : 8 : 4	+
3.	benzen – dioksan – kwas octowy	90 : 25 : 4	–
4.	chloroform – kwas octowy – woda	4 : 1 : 1	–
5.	octan butylu – kwas octowy – woda	10 : 2 : 1	–
6.	toluen – octan etylu – kwas octowy	4 : 5 : 2	+
7.	toluen – n-propanol – kwas mrówkowy – woda	15 : 18 : 10 : 5	+
8.	toluen – octan etylu – kwas mrówkowy	5 : 5 : 1	++
9.	octan etylu – kwas mrówkowy – kwas octowy – woda	100 : 11 : 11 : 27	–
10.	benzen – dioksan – lodowaty kwas octowy	40 : 60 : 4	–
11.	octan etylu – tolueu – kwas mrówkowy	18 : 10 : 2	++
12.	chloroform – octan butylu – kwas mrówkowy	4 : 5 : 1	+
13.	chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy	5 : 4 : 1	+++
14.	n-butanol – woda – benzen	1 : 1 : 1	-
15.	n-butanol – kwas octowy – woda	4 : 1 : 5	-
16.	fenol – kwas trichlorooctowy – woda	1 : 1 : 1	+
17.	kwas propionowy – kwas mrówkowy – kwas solny – woda	2 : 5 : 1 : 6	+
18.	5 % roztwór wodny kwasu octowego		++
19.	7 % roztwór wodny kwasu octowego		+

Sporządzono również mieszaniny dwuskładnikowe:

- a) kwas galusowy i salicylowy (fenolokwasy)
- b) kwas taninowy (garbnik hydrolizujący) i(+)-katechina (garbnik skondensowany)
- c) kofeina i teofilina (alkaloidy purynowe)

które nanoszono na płytki chromatograficzne, by sprawdzić, który układ rozwijający pozwoli najlepiej rozdzielić te substancje. Wyniki tych badań zebrano w tabeli 69.

Tabela 69. Optymalny skład fazy rozwijającej w celu rozdzielania badanych mieszanin dwuskładnikowych.

SKŁAD FAZY ROZWIJAJĄCEJ	STOSUNEK OBJĘTOSCIOWY
dla rozdzielenia kwasu galusowego i salicylowego	(5 : 4 : 1)
chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy	
toluen – octan etylu – kwas mrówkowy	(5 : 5 : 1) lub (10 : 18 : 2)
dla rozdzielania kwasu taninowego i katechiny	
5% i 7% roztwór kwasu octowego	
dla rozdzielania kofeiny i teofiliny	
octan etylu – metanol – amoniak (25%)	(8 : 2 : 1)
chloroform – metanol	(99 : 1)
chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy	(5 : 4 : 1)

W celu rozdzielania analizowanych substancji postanowiono stosować fazę rozwijającą o składzie: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy (5:4:1). Wybór ten został podyktowany regularnością kształtu plamek, wartościami R_F , czasem rozwijania chromatogramów oraz dobrym rozdzieleniem składników w materiałach złożonych, które w dalszej części pracy miały być przedmiotem analizy. W tabeli 70 przedstawiono wartości R_F badanych substancji dla wybranego układu rozwijającego.

Wyznaczenie wartości R_F dla badanych substancji

Tabela 70. Wartości R_F dla badanych substancji; faza stacjonarna: Kieselgel 60 F₂₅₄; faza rozwijająca: chloroform : octan etylu : kwas mrówkowy (5:4:1).

Badana substancja	Wartość R_F
kw. taninowy	0,04
kw. galusowy	0,35
kw. salicylowy	0,79
Kofeina	0,41
Teofilina	0,32
(+)-katechina	0,23

Ponieważ izolacja kwasu taninowego z materiałów złożonych w ustalonych warunkach nie daje dobrych rezultatów ($R_F = 0,04$), postanowiono zastosować chromatografowanie dwukierunkowe prostopadłe, które jest polecane w przypadku bardzo złożonych mieszanin. Technika ta polega na tym, iż w narożniku kwadratowej płytki nanosi się jedną próbkę analizowanej mieszaniny i rozwija chromatogram zwykłym sposobem. Po zakończeniu pierwszego rozwijania wyjmuje się płytkę z komory, suszy i po obrocie o 90° ponownie wkłada do komory z innym eluentem [252].

Najlepsze rezultaty uzyskano stosując jako fazy rozwijające:

- pierwsze rozwijanie: chloroform – octan etylu - kwas mrówkowy (5:4:1)
- drugie rozwijanie: 5% roztwór wodny kwasu octowego
($R_{F \text{ kwasu taninowego}} = 0,52$).
- jako wywoływacz stosowano układ odczynników Fe(III), i 2,2'-bipirydyli.

W ustalonych warunkach rozdzielania i wywoływania najmniejsza wykrywalna ilość **kwasu taninowego** wynosi 1 μg . Indeks wykrywalności, określający stosunek najmniejszej ilości mikrogramów substancji wykrytej przez zastosowany wywoływacz do powierzchni plamki chromatograficznej [253] przyjmuje wartość 0,10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$.

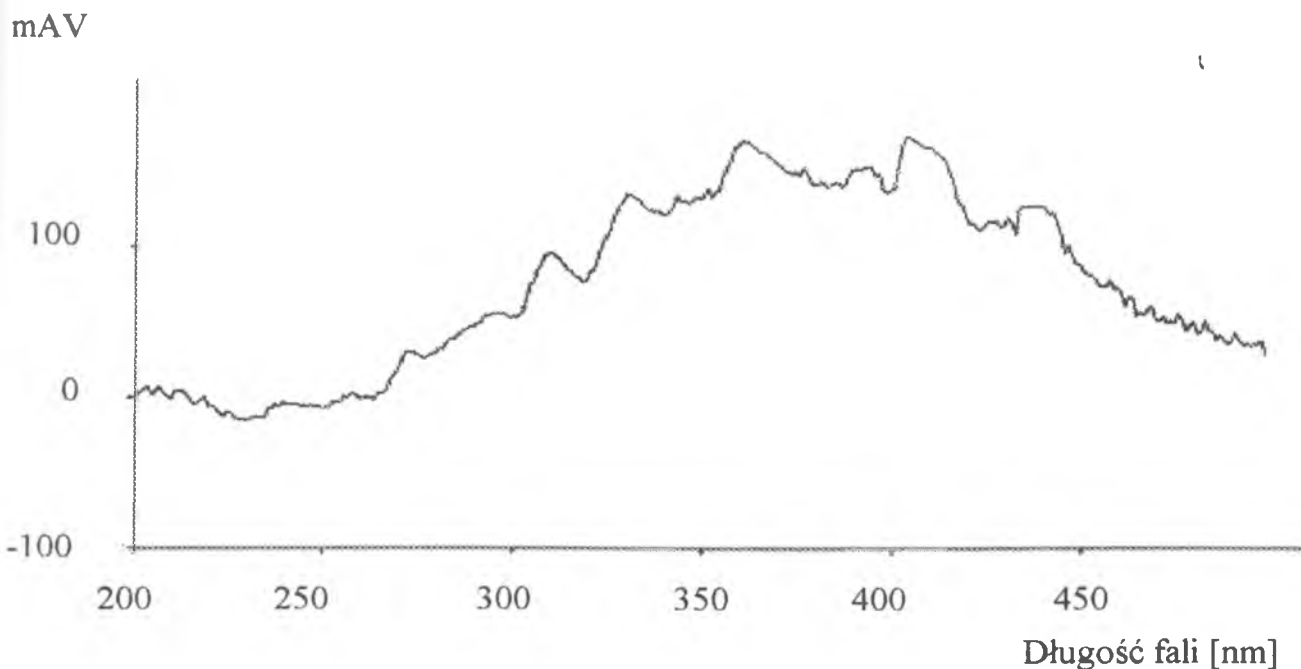
Warunki densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny

Celem badań było wyznaczenie optymalnej długości fali światła do oznaczania (+)-katechiny techniką chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną.

Proces chromatograficzny przeprowadzono w warunkach :

- faza stacjonarna: Kieselgel 60 F₂₅₄
- faza ruchoma: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy (5 : 4 : 1)
- detekcja densytometryczna

Dla ustalenia optymalnej długości fali na płytkę chromatograficzną naniesiono mikrostrzykawką 1 µg katechiny (5 µl roztworu katechiny o stężeniu 0,2 mg/ml). Chromatogram rozwijano w wybranej fazie ruchomej, a po skończonym procesie rozwijania suszono i poddano detekcji densytometrycznej. Uzyskane widmo zależności intensywności pików badanej substancji od długości fali światła w zakresie 200-450 nm przedstawiono na rysunku 46.



Rysunek 46.

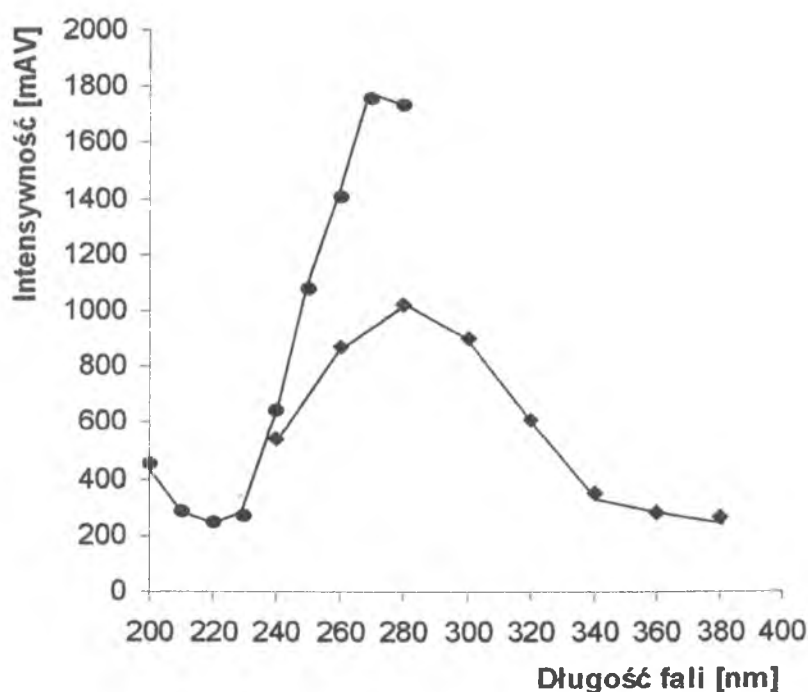
Spektrodensytogram przedstawiający zależność intensywności pików (+)-katechiny od długości fali światła.

Z przedstawionej zależności wynika, że (+)-katechinę najdogodniej jest oznaczać przy długości fali światła $\lambda_{\max} = 410 \text{ nm}$.

Warunki densytometrycznego oznaczania kofeiny i kwasu galusowego

Przeprowadzono badania nad możliwością jednoczesnego oznaczania kofeiny i kwasu galusowego po rozdzieleniu chromatograficznym na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego z zastosowaniem detekcji densytometrycznej w świetle UV.

Dla ustalenia optymalnej długości fali na płytkę chromatograficzną naniesiono mikrostrzykawką po 5 μl roztworów kofeiny i kwasu galusowego o stężeniu 1 mg/ml. Chromatogram rozwijano w wybranej fazie ruchomej, a następnie poddano detekcji densytometrycznej w świetle UV. Uzyskane zależności intensywności pików badanych substancji od długości fali światła przedstawiono na rysunku 47.



Rysunek 47.

Spektrodensytogram przedstawiający zależność intensywności pików od długości fali światła dla: kofeiny (●) i kwasu galusowego (◆).

Z przedstawionych zależności wynika, że największą intensywność dla kofeiny zarejestrowano przy $\lambda = 270$ nm, a dla kwasu galusowego przy $\lambda = 280$ nm. W dalszych badaniach postanowiono proces densytometrowania przeprowadzać przy $\lambda = 280$ nm. Dla tych warunków detekcji uzyskuje się nieznacznie niższe wyniki dla kofeiny, ale możliwość jednoczesnego oznaczania obu substancji przy tej samej długości fali światła znacznie skraca czas analizy.

Wyznaczenie indeksów wykrywalności dla badanych substancji

Celem dalszych badań było wyznaczenie najmniejszych wykrywalnych ilości badanych substancji po rozdzieleniu chromatograficznym w ustalonych warunkach:

- faza stacjonarna: podłoże Kieselgel 60 F₂₅₄
- faza ruchoma: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy (5:4:1)
- wywoływacz: światło UV lub układ odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyd

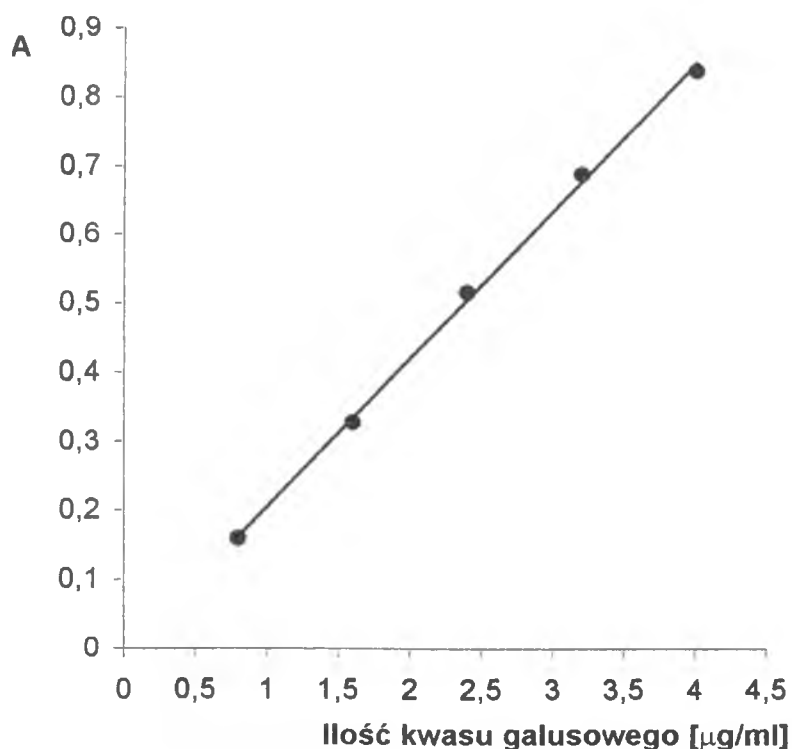
Na płytki chromatograficzne наносzono po 5 µl roztworów badanych substancji o różnym stężeniu. Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisanym sposobem. Dla sprawdzenia powtarzalności wyników czynność powtarzano trzykrotnie, a dla najniższych wykrywalnych i najwyższych niewykrywalnych stężeń sześciokrotnie. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 71.

Tabela 71. Indeksy wykrywalności dla badanych substancji.

Substancja wywoływana	Wywoływacz	Średnia powierzchnia plamki [mm ²]	Najmniejsza wykrywalna ilość [µg]	Indeks wykrywalności [µg/mm ²]
kwas galusowy	światło UV λ = 254 nm	59,4	0,10	0,002
	Fe(III), 2,2'-bipirydyd	2,0	0,08	0,040
kofeina	światło UV λ = 254 nm	11,0	0,50	0,045
teofilina	światło UV λ = 254 nm	13,0	0,50	0,038
(+) -katechina	światło o λ = 410 nm	33,0	0,20	0,006
	Fe(III), 2,2'-bipirydyd	6,0	0,2	0,030

5.1.1. Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną.

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną na płytki pokryte żelem krzemionkowym naniesiono odpowiednie ilości roztworu wzorcowego kwasu galusowego (od 20 do 100 μg). Chromatogramy rozwijano stosując układ: chloroform - octan etylu - kwas mrówkowy (5:4:1), a następnie suszono w celu usunięcia składników fazy rozwijającej. Z płytki zdejmowano plamki kwasu galusowego, przenoszono je do zlewki i eluowano ciepłą wodą redestylowaną (3 razy po 2 ml), po czym wprowadzano 170 μg Fe^{3+} i ustalano pH na około 2,4. Po 30 minutach całość przeniesiono ilościowo do kolbki o pojemności 25 ml, dodano 3 ml 0,5% roztworu 2,2'- bipirydyli i uzupełniono wodą redestylowaną do kreski (p. 4.2.6.). Pomiary absorbancji wykonywano po 15 minutach od wywołania reakcji barwnej przy $\lambda = 522 \text{ nm}$. Wyznaczoną krzywą wzorcową przedstawia rysunek 48, ocenę statystyczną precyzji metody zamieszczono w tabeli 72.



Rysunek 48.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną

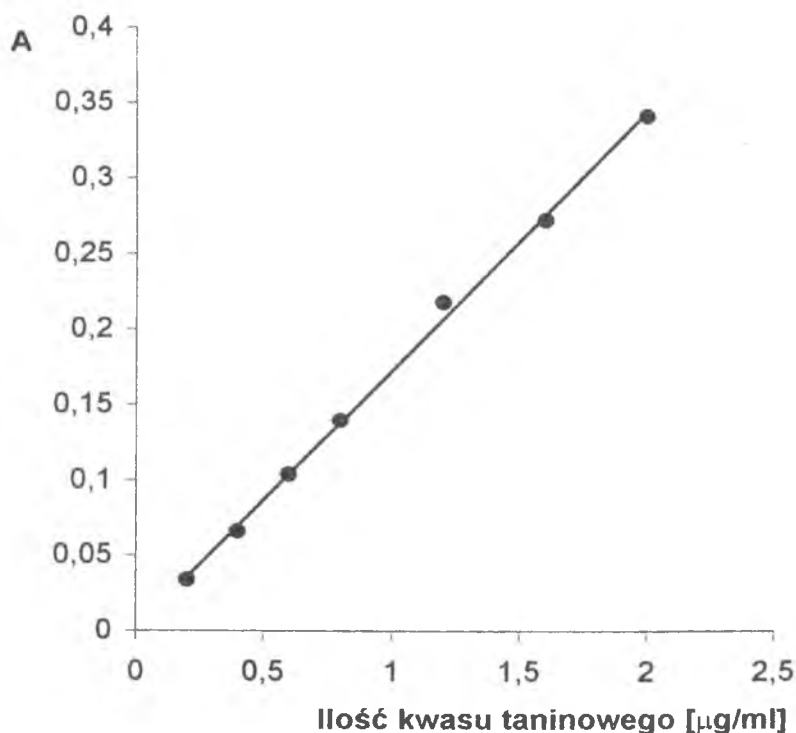
Tabela 72. Ocena statystyczna precyzji oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną

Ilość kwasu galusowego [µg/ml]	OZNACZONO n = 6			
	$\bar{X}$	S	$S_r\%$	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,8	0,159	0,007	4,40	0,007
1,6	0,328	0,008	2,44	0,008
2,4	0,516	0,008	1,55	0,008
3,2	0,688	0,005	0,73	0,005
4,0	0,838	0,004	0,48	0,004

Krzywa wzorcowa ma przebieg prostoliniowy w zakresie stężeń kwasu galusowego od 0,8 do 4,0 µg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KG} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,2148$; $b = -0,0096$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9993. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{522}^S = 3,55 \cdot 10^4 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$.

5.1.2. Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu taninowego metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną.

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do oznaczania kwasu taninowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną na płytki pokryte żelem krzemionkowym naniesiono różne ilości roztworu wzorcowego kwasu taninowego (5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 µg). Wykorzystano dwukierunkowe prostopadłe rozwijanie chromatogramów. Dla pierwszego rozwijania zastosowano układ odczynników: chloroform - octan etylu - kwas mrówkowy (5:4:1), zaś po wysuszeniu i obróceniu płytki o 90 °, rozwijanie przeprowadzano w 5% roztworze kwasu octowego. Z płytki zdejmowano plamki kwasu taninowego, przenoszono je do zlewki i eluowano ciepłą wodą redestylowaną (3 razy po 2 ml), po czym wprowadzano 200µg Fe^{3+} i ustalano pH na około 2,3 a następnie ogrzewano na łaźni wodnej o temperaturze 60 °C. Po 30 minutach całość przeniesiono ilościowo do kolbki o pojemności 25 ml, dodano 5 ml 0,5% roztworu 2,2'- bipirydyli i uzupełniono wodą redestylowaną do kreski. Pomiar absorpcji wykonywano po 15 minutach od wywołania reakcji barwnej przy $\lambda = 522 \text{ nm}$ (p. 4.2.6.). Uzyskaną w ten sposób krzywą wzorcową przedstawia rysunek 49, zaś w tabeli 73 zamieszczono ocenę statystyczną precyzji metody.



Rysunek 49.

Krzywa wzorcowa do oznaczania kwasu galusowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną.

Tabela 73. Ocena statystyczna precyzji oznaczania kwasu taninowego metodą chromatograficzno - spektrofotometryczną

Ilość kwasu taninowego [µg/ml]	OZNACZONO n = 6			
	$\bar{X}$	S	$S_r\%$	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,2	0,034	0,003	8,82	0,004
0,4	0,066	0,005	7,58	0,006
0,6	0,104	0,004	3,85	0,005
0,8	0,140	0,005	3,57	0,006
1,2	0,218	0,006	2,75	0,007
1,6	0,272	0,005	1,97	0,006
2,0	0,341	0,005	1,47	0,006

Krzywa wzorcowa ma przebieg prostoliniowy w zakresie stężeń kwasu taninowego od 0,2 do 2,0 µg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{KT} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,1715$; $b = 0,0012$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9979. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{522}^S = 2,93 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$.

5.1.3. Krzywa wzorcowa do planimetrycznego oznaczania

(+)-katechiny

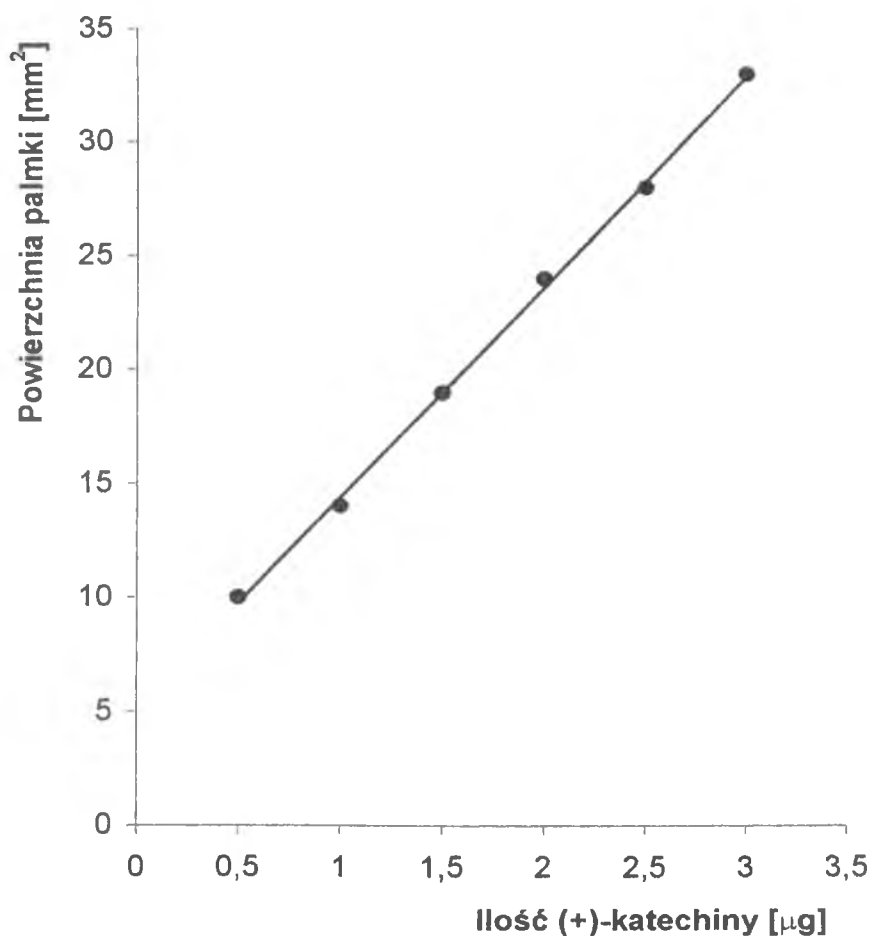
W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny, na płytki pokryte żel krzemionkowym nanoszono po 5 μ l roztworów wzorcowych badanej substancji, tak by jej ilość na płytce była równa: 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 μ g.

Chromatogramy rozwijano w ustalonych warunkach a po wysuszeniu wywoływano poprzez spryskanie roztworem soli Fe(III), a po chwili 2,2'-bipirydylem. Powierzchnię uzyskanych plam (+)-katechiny poddano planimetrowaniu. Wyniki badań przedstawiono na rysunkach 50 i 51 oraz w tabeli 74.



Rysunek 50.

Chromatogram do planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny.



Rysunek 51.

Krzywa wzorcowa do planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny.

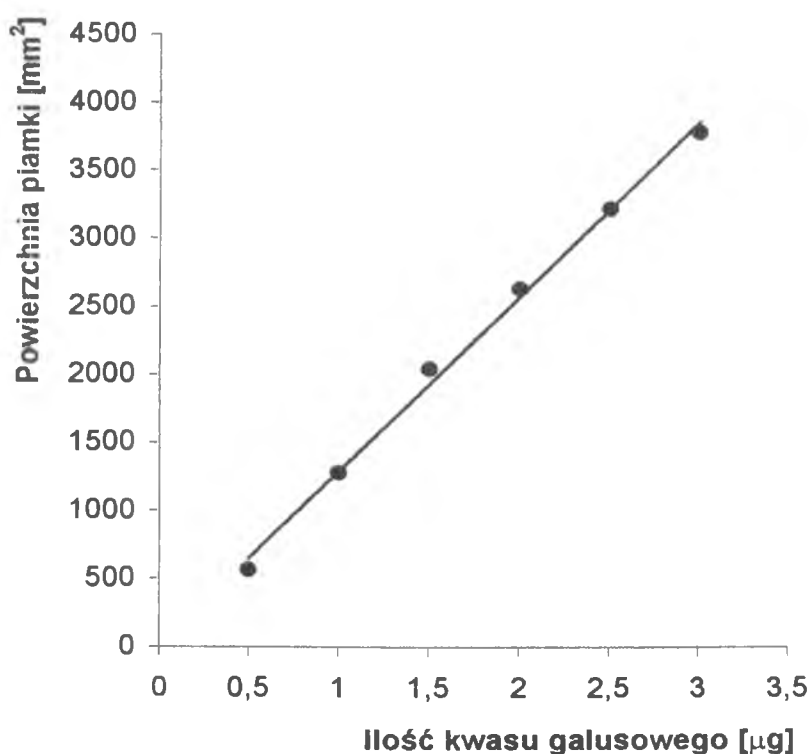
Krzywa wzorcowa ma przebieg prostoliniowy w zakresie stężeń katechiny od 0,5 do 3,0 μg. Parametry prostej $P = a \cdot c_{\text{KAT}} + b$ przyjmują wartość: $a = 9,26$; $b = 5,13$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9994.

Tabela 74. Ocena statystyczna precyzji planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny

Ilość (+)-katechiny [μg]	OZNACZONO n = 6			
	Srednia powierzchnia plamki [mm ²]	S	S _r %	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,5	10	0,6	6,0	0,6
1,0	14	1,8	12,8	1,9
1,5	19	2,0	10,5	2,1
2,0	24	1,1	4,6	1,1
2,5	28	2,1	7,5	2,2
3,0	33	1,1	3,3	1,1

5.1.4. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego.

Kontynuując badania chromatograficzne wyznaczono krzywą wzorcową dla oznaczania kwasu galusowego techniką chromatografii cienkowarstwowej z detekcją densytometryczną. W tym celu na płytki pokryte żelom krzemionkowym F₂₅₄ nanoszono mikrostrzykawką kolejno po 5 µl roztworów kwasu galusowego, tak by ilość badanej substancji na płytce mieściła się w zakresie od 0,5 do 3,0 µg. Chromatogramy rozwijano stosując układ: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy (5:4:1), a następnie suszono w celu usunięcia składników fazy rozwijającej. Otrzymane chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej przy ustalonej długości fali $\lambda_{\max} = 280$ nm. Uzyskaną w ten sposób krzywą wzorcową obrazuje rysunek 52, zaś w tabeli 75 zawarto ocenę statystyczną opracowanej metody.



Rysunek 52.

Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego.

Tabela 75. Ocena statystyczna precyzji densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego.

Ilość kwasu galusowego [μg]	OZNACZONO n = 6			
	Srednia powierzchnia piku [mm ²]	<i>S</i>	<i>S_r</i> %	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,5	558,8	21,85	3,91	22,93
1,0	1278,7	25,17	1,97	26,41
1,5	2043,6	16,37	0,80	17,18
2,0	2629,7	26,56	1,01	27,87
2,5	3217,2	20,62	0,64	21,64
3,0	3781,4	19,37	0,51	20,33

Krzywa wzorcowa ma przebieg prostoliniowy w zakresie od 0,5 do 3,0 μg kwasu galusowego. Parametry prostej $P = a \cdot c_{KG} + b$ wynoszą: $a = 1286,5$; $b = 0,1067$. Współczynnik korelacji liniowej przyjmuje wartość 0,9979.

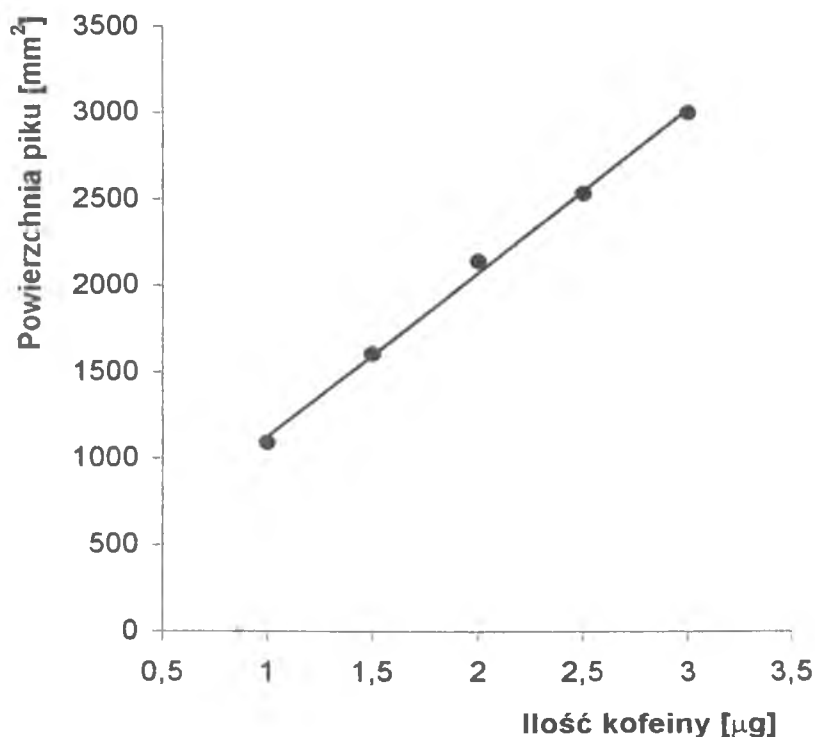
5.1.5. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kofeiny.

Krzywą wzorcową wyznaczono dla ilości kofeiny w zakresie stężeń od 1,0 do 3,0 μg. W tym celu, na płytki chromatograficzne nakroplono po 5 μl roztworów wzorcowych kofeiny w różnych stężeniach (od 0,2 do 0,6 mg/ml). Po rozwinięciu w ustalonych warunkach chromatogramy densytometrowano przy długości fali $\lambda_{max} = 280$ nm, rejestrując powierzchnię pików.

Krzywą wzorcową dla oznaczania kofeiny przedstawia rysunek 53. Ocena statystyczną precyzji metody zawarto w tabeli 76.

Tabela 76. Ocena statystyczna precyzji densytometrycznego oznaczania kofeiny.

Ilość kofeiny [μg]	OZNACZONO n = 6			
	Srednia powierzchnia piku [mm ²]	<i>S</i>	<i>S_r</i> %	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
1,0	1088,68	63,32	5,81	66,77
1,5	1608,75	42,20	2,62	44,29
2,0	2141,48	77,75	3,63	81,61
2,5	2532,88	72,89	2,88	76,50
3,0	3003,48	79,16	2,63	83,09



Rysunek 53.

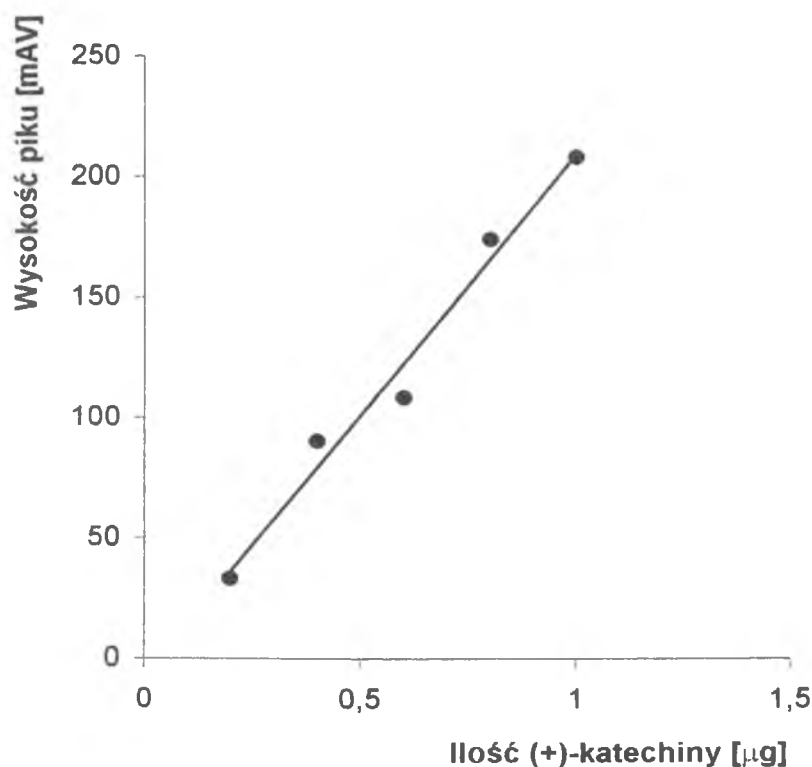
Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania kofeiny.

Krzywa wzorcowa ma przebieg prostoliniowy w zakresie od 1,0 do 3,0 μg kofeiny. Parametry prostej $P = a \cdot c_{\text{KOF}} + b$ wynoszą: $a = 950,75$; $b = 173,56$. Współczynnik korelacji liniowej przyjmuje wartość 0,9985.

5.1.6. Krzywa wzorcowa do densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny.

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do oznaczania (+)-katechiny po izolacji chromatograficznej z zastosowaniem detekcji densytometrycznej na płytce pokryte żelem krzemionkowym F_{254} наносzono mikrostrzykawką kolejno po 5 μl roztworów (+)-katechiny, tak by ilość badanej substancji na płytce mieściła się w zakresie od 0,2 do 1,0 μg . Chromatogramy rozwijano stosując układ: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy (5:4:1), a następnie suszono w celu usunięcia składników fazy rozwijającej. Otrzymane chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej przy ustalonej długości fali $\lambda_{\text{max}} = 410 \text{ nm}$, rejestrując wysokość pików.

Uzyskaną w ten sposób krzywą wzorcową obrazuje rysunek 54, zaś w tabeli 77 zawarto ocenę statystyczną opracowanej metody.



Rysunek 54.

Krzywa wzorcową do densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny.

Krzywa wzorcową ma przebieg prostoliniowy w zakresie stężeń (+)-katechiny od 0,2 do 1,0 µg. Parametry prostej $P = a \cdot c_{KAT} + b$ wynoszą: $a = 217,10$; $b = -7,48$. Współczynnik korelacji liniowej przyjmuje wartość 0,9897.

Tabela 77. Ocena statystyczna precyzji densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny.

Ilość (+)-katechiny [µg]	OZNACZONO n = 6			
	Średnia wysokość pików [mAV]	S	S _r %	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,2	33,0	1,78	5,39	1,87
0,4	90,2	5,76	6,38	6,04
0,6	108,5	4,31	3,97	4,52
0,8	174,0	5,03	2,89	5,27
1,0	208,2	4,72	2,27	4,96

5.2. Warunki rozdzielania i oznaczania badanych substancji techniką chromatografii bibułowej.

Przeprowadzone badania wstępne wykazały, że zastosowanie odczynników Ce(IV) i arsenazo III do spektrofotometrycznego oznaczania reduktorów po izolacji na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego charakteryzuje wysoki poziom absorbancji ślepej próby, uniemożliwiający wykonanie analizy. W związku z tym, aby zastosować opracowane, czułe, spektrofotometryczne metody oznaczania reduktorów w tym układzie odczynników, do izolacji analitu z materiału złożonego postanowiono wykorzystać chromatografię bibułową.

Przeprowadzono badania nad optymalizacją warunków rozdzielania kwasów: taninowego, galusowego i salicylowego na drodze chromatografii bibułowej.

Rozdział kwasu galusowego i kwasu salicylowego na drodze chromatografii bibułowej zapewniają przeważnie kwaśne układy rozpuszczalników. Do rozwijania chromatogramów stosuje się następujące fazy ruchome [134,160]: n-butanol – kwas octowy – woda (4:1:5); n-butanol – octan butylu – kwas octowy – woda (9:28:47:16); octan butylu – kwas octowy – woda (4:1:2); toluen – n-butanol – kwas octowy – woda (10:15:5:3); benzen – kwas octowy – woda (10:5:3); chloroform – alkohol etylowy (95%) – kwas mrówkowy (50:50:2) oraz 5% roztwór kwasu octowego. Leont'eva i Tselinskii [254] opracowali warunki rozdzielania wspomnianych fenolokwasów stosując układ rozwijający: woda – dioksan (25:5). Natomiast Masłowska i Kucharska [255] proponują jako fazę rozwijającą alkohol etylowy (96%) – amoniak (25%) (5:1).

Dobór fazy rozwijającej

Na bibułę Whatman nr 3 nanoszono kolejno roztwory wzorcowe: kwasu taninowego, galusowego i salicylowego oraz mieszaninę tych trzech kwasów w stosunku objętościowym 1:1:1. W celu wywołania chromatogramy spryskiwano roztworem soli Fe(III), a następnie 2,2'-bipirydyli. Przebadano kilka faz rozwijających, polecanych w literaturze oraz dokonano modyfikacji niektórych z nich.

Wyniki badań zamieszczono w tabeli 78.

Tabela 78. Dobór fazy rozwijającej dla rozdzielania kwasów: salicylowego, galusowego i taninowego na bibule Whatman nr 3

NR	UKŁAD ROZWIJAJĄCY	STOSUNEK OBJĘTOŚCIOWY	OCENA
1.	n-butanol – kwas octowy – woda	4 : 1 : 5	+
2.	n-butanol – octan butylu – kwas octowy – woda	9 : 28 : 47 : 16	+
3.	Octan butylu – kwas octowy – woda	4 : 1 : 2	+
4.	toluen – n-butanol – kwas octowy – woda	10 : 15 : 5 : 3	+
5.	benzen – kwas octowy – woda	10 : 5 : 3	–
6.	chloroform – alkohol etylowy (95%) – kwas mrówkowy	50 : 50 : 2	–
7.	5% roztwór wodny kwasu octowego		++
8.	woda – dioksan	25 : 5	+
9.	alkohol etylowy (96%) – amoniak (25%)	5 : 1	–
10.	5% roztwór wodny kwasu octowego – dioksan	29 : 1	–
11.	5% roztwór wodny kwasu octowego – dioksan	25 : 5	+
12.	5% roztwór wodny kwasu octowego – dioksan	25 : 10	–
13.	woda – dioksan	25 : 2	–
14.	woda – dioksan – 5% roztwór wodny kwasu octowego	20 : 5 : 5	–
15.	chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy	5 : 4 : 1	–
16.	izopropanol – izobutanol – woda	3 : 2 : 4	++
17.	izopropanol – izobutanol – woda – dioksan	3 : 2 : 4 : 1	+

gdzie: „-” układ niezadowalający
 „+” układ zadowalający
 „++” układ dobry

Wyznaczenie wartości R_F

Dla układów rozwijających, w których stwierdzono najlepsze rozdzielanie badanych substancji, wyznaczono wartości R_F .

Wyniki zamieszczono w tabeli 79.

Tabela 79. Wartości R_F dla kwasu galusowego, salicylowego i taninowego, po rozdzielaniu na bibule Whatman nr 3.

UKŁAD ROZWIJAJĄCY (stosunek objętościowy)	WARTOŚCI R_F KG: Kwas galusowy KS: Kwas salicylowy KT: Kwas taninowy
5% roztwór wodny kwasu octowego	$R_{F\text{ KG}} = 0,36$; $R_{F\text{ KS}} = 0,72$ $R_{F\text{ KT}} = 0,13$
izopropanol – izobutanol – woda (3 : 2 : 4)	$R_{F\text{ KG}} = 0,53$; $R_{F\text{ KS}} = 0,95$ $R_{F\text{ KT}} = 0,81$

W dalszych badaniach postanowiono stosować układ: izopropanol – izobutanol – woda (3:2:4). Dokonując wyboru wspomnianego układu kierowano się regularnością kształtu plamek, wartościami R_F , czasem rozwijania, kontrastowością i trwałością chromatogramów (plamy badanych substancji przyjmują kolor czerwony).

Kontynuując badania, podjęto próby wyznaczenia krzywych wzorcowych do spektrofotometrycznego oznaczania kwasów: galusowego, salicylowego i taninowego, z zastosowaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania przebiegających w układzie: Ce(IV), arsenazo III, po izolacji analitów na bibule Whatman. W przypadku kwasów: galusowego i salicylowego nie udało się uzyskać prostoliniowej zależności absorbancji od stężenia analitu.

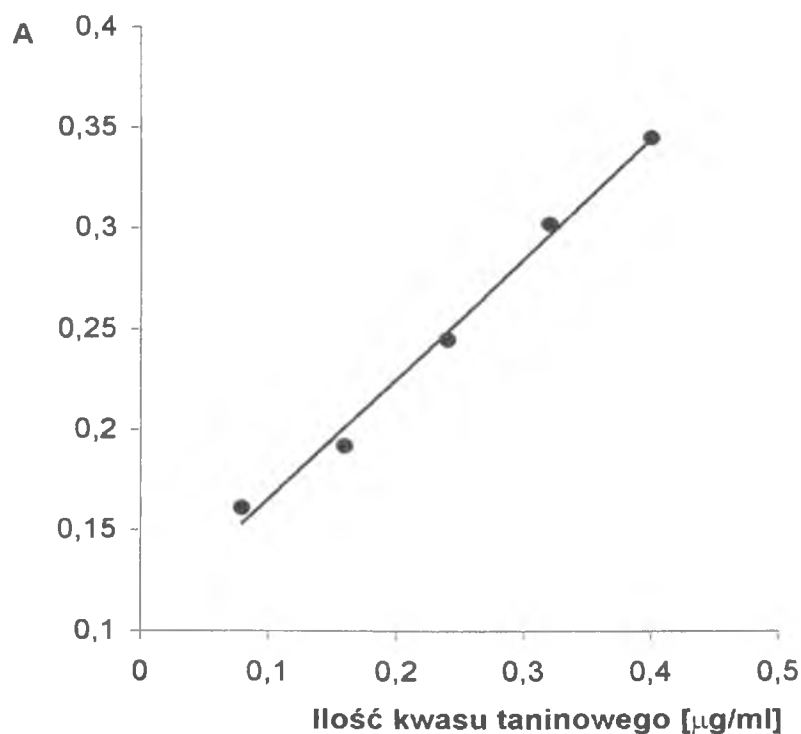
5.2.1. Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kwasu taninowego po izolacji na bibule Whatman.

W celu wyznaczenia krzywej wzorcowej do spektrofotometrycznego oznaczania kwasu taninowego, z zastosowaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania przebiegających w układzie Ce(IV) i arsenazo III, na bibułę Whatman nr 3 наносono po 5 μ l roztworów wzorcowych kwasu taninowego o różnym stężeniu (od 0,4 do 2,0 mg/ml).

Chromatogramy rozwijano w ustalonych warunkach i suszono w strumieniu zimnego powietrza. Część każdego chromatogramu spryskiwano roztworami soli Fe(III) oraz 2,2'-bipirydyli, w celu zlokalizowania plam analitu. Pozostałą część zabezpieczano, tak by uniemożliwić zajście reakcji z odczynnikami wywołującymi. Następnie wycinano fragmenty z wzorcami kwasu taninowego, przenoszono do zlewki i wmywano wodą. Do próby wprowadzano 110 μ g Ce⁴⁺ i przeprowadzano reakcje redoks w czasie 15 minut, po czym ustalano pH na ok. 3, przenoszono całość do kolby o pojemności 25 ml, wprowadzano 2,3 ml 0,05 % roztworu arsenazo III i uzupełniano wodą redestylowaną. Pomiar absorpcji wykonywano przy $\lambda_{\max} = 655$ nm, po 15 minutach od wywołania reakcji barwnej, względem wody jako roztworu odniesienia. W analogiczny sposób przygotowywano ślepe próby, tj. nie zawierające kwasu taninowego. Średnia wartość absorpcji dla ślepej próby wynosiła 0,345. Wyniki przedstawiono jako różnicę absorpcji próby zawierającej analit i ślepej próby. Tak otrzymaną krzywą wzorcową przedstawia rysunek 55, natomiast ocenę statystyczną metody zawarto w tabeli 80.

Tabela 80. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej

Ilość kwasu taninowego [μg/ml]	OZNACZONO n = 6			
	$\bar{X}$	S	S _r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,08	0,161	0,011	6,83	0,011
0,16	0,192	0,011	5,72	0,011
0,24	0,245	0,008	3,26	0,008
0,32	0,302	0,007	2,32	0,007
0,40	0,345	0,008	2,32	0,008



Rysunek 55.

Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kwasu taninowego po izolacji na bibule Whatman.

Badany układ spełnia prawo Beera w granicach stężeń kwasu taninowego od 0,08 do 0,40 $\mu\text{g/ml}$. Parametry prostej $A = a \cdot c_{\text{KT}} + b$ przyjmują wartość: $a = 0,5975$; $b = 0,1056$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9959. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\varepsilon_{655}^S = 1,37 \cdot 10^6 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$.

6. Spektrofotometryczne oznaczanie kofeiny po izolacji techniką ekstrakcji do fazy stałej (SPE).

6.1. Technika SPE.

Technika SPE umożliwia oddzielenie analitu od matrycy i jego zatężenie. Polega na przepuszczeniu ciekłej, analizowanej próbki przez złożę adsorbentu w kolumnie ekstrakcyjnej i adsorpcję oznaczanych związków w złożu. Po przemyciu kolumnienki zaadsorbowane anality wymywa się ilościowo rozpuszczalnikiem. W taki sposób można uzyskać wielokrotne zatężenie analizowanej substancji. W technice tej ważnym elementem postępowania analitycznego jest dobór eluenta do wymywania osadzonych na kolumnie analitów. Wymywanie substancji zaadsorbowanych na złożu przeprowadza się najczęściej rozpuszczalnikami organicznymi, znacznie rzadziej stosuje się ekstrakcję nadkrytyczną [252].

W Polsce, do ekstrakcji w układzie ciecz – ciało stałe stosuje się najczęściej urządzenia firmy Baker. Wykorzystuje się gotowe kolumny ekstrakcyjne, które można podzielić na cztery grupy:

- wymieniacze kationowe z grupą sulfonową, związane z pierścieniem benzenowym lub propylowym łańcuchem analitycznym
- wymieniacze anionowe zawierające czwartorzędową grupę aminową, do izolacji anionów oraz kompleksów o charakterze anionowym
- fazy polarne diolowe i cyjanopropylowe do izolacji kationów tworzących kompleksy z ugrupowaniem wodorotlenkowym lub aminowym
- fazy niepolarne oktylowe, oktadecylowe i fenyłowe do izolacji obojętnych kompleksów metali oraz związków organicznych [17, 256].

Ważną dziedziną zastosowań techniki SPE stanowi analiza leków i metabolitów oraz innych substancji biologicznie aktywnych w wodzie i próbkach biologicznych. Niekiedy ekstrakcję ciecz – ciało stałe stosuje się tylko do usuwania zanieczyszczeń, np.: węglowodorów parafinowych z próbki, w której mają być analizowane substancje lotne.

Wyodrębnianie substancji z matrycy wodnej techniką ekstrakcji ciecz – ciało stałe nie ma wad ekstrakcji jak w układzie ciecz – ciecz i umożliwia uzyskanie lepszych wyników przy wydzieleniu i zatężeniu analizowanych substancji.

6.2. Warunki izolacji kofeiny z zastosowaniem techniki SPE.

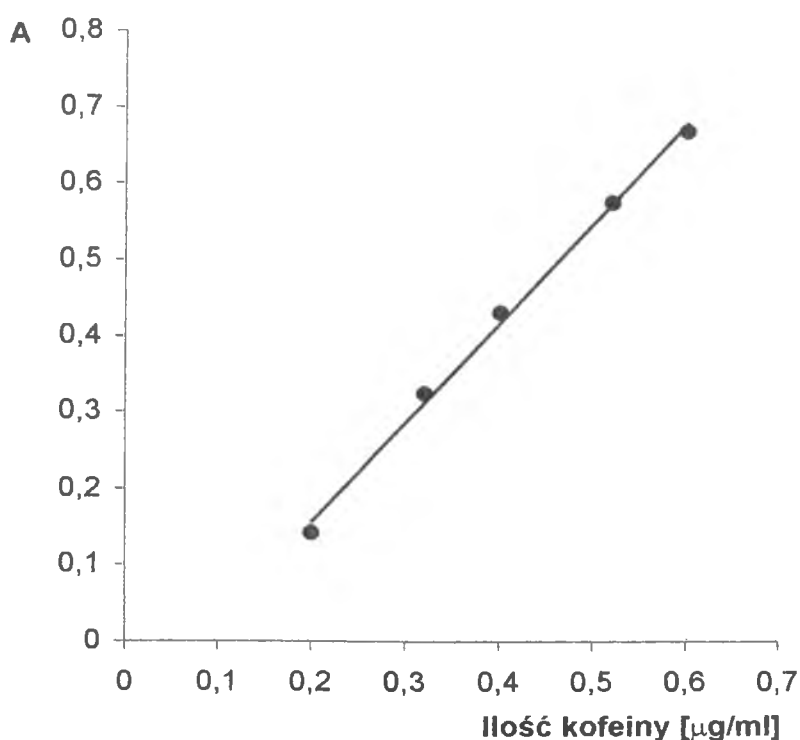
Kofeina jako substancja o słabych właściwościach redukujących nie reaguje w układzie odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli. Opracowana spektrofotometryczna metoda oznaczania kofeiny z zastosowaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania przebiegających w układzie Ce(IV) i arsenazo III, charakteryzuje się dobrą precyzją i wysoką czułością. Nie jest jednak możliwe zastosowanie tej metody do oznaczania kofeiny w materiałach złożonych bez jej wstępnej izolacji, gdyż sole Ce(IV) w środowisku kwaśnym wykazują wysoki potencjał utleniający, dlatego też utlenieniu uległa by nie tylko kofeina, ale także wszelkie inne reduktory będące składnikami matrycy. W pracy eksperymentalnej podjęto próby opracowania chromatograficzno - spektrofotometrycznej metody oznaczania kofeiny po jej izolacji na bibule Whatman. Przeprowadzono badania nad optymalizacją warunków chromatograficznego rozdzielania, wybierając jako fazę rozwijającą układ: aceton - izopropanol - woda, 5:3:2 (v/v/v). W celu wywołania chromatogramy spryskiwano roztworami: jodu w etanolowym roztworze jodku potasu, a po upływie 2 minut mieszaniną 25 % kwasu solnego i etanolu w stosunku 1:1 [110]. Nie udało się jednak uzyskać prostoliniowej zależności absorbancji od stężenia analitu.

Postanowiono więc zbadać możliwość spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny, w układzie Ce(IV) i arsenazo III, po jej izolacji z zastosowaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej. Badania przeprowadzono na kolumnienkach 100mg firmy Baker z fazą oktadecylową. Firma Baker proponuje do izolacji kofeiny z materiałów złożonych takich jak kawa, herbata, kakao i tzw. soft drink, kondycjonowanie kolumny metanolem, a do wymywania analitu zaleca chloroform. Biorąc pod uwagę powyższe informacje, w dalszych badaniach postępowano w następujący sposób:

- aby przygotować kolumnienki wprowadzano na każdą z nich trzy razy po 1 ml metanolu a następnie trzy razy po 1 ml wody
- na tak przygotowane kolumnienki wprowadzano po 1 ml roztworów wzorcowych kofeiny o stężeniu 50 µg/ml; 80 µg/ml; 100 µg/ml; 130µg/ml i 150 µg/ml.
- osadzoną na kolumnach kofeinę wymywano chloroformem - dwa razy po 1 ml
- otrzymane próbki odparowano do sucha a otrzymana w ten sposób kofeinę rozpuszczono w 10 ml wody

6.3. Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny po izolacji techniką SPE.

Z próbek otrzymanych w sposób opisany w punkcie 6.2. do małej zlewki, pobierano po 1 ml roztworu kofeiny i wprowadzano 100 μg Ce^{4+} . Całość ogrzewano na łaźni wodnej o temperaturze 60 ° C przez 30 minut. Następnie ustalano pH na ok. 3, całość przenoszono do kolbki o pojemności 25 ml, wprowadzano 2,3 ml 0,05% roztworu arsenazo III. Pomiary absorbancji wykonywano po 15 minutach o wywołania reakcji barwnej, przy $\lambda = 655 \text{ nm}$, względem wody jako roztworu odniesienia. W analogiczny sposób przygotowywano ślepe próby (w miejsce kofeiny na kolumnienki wprowadzano 1 ml wody), a wyniki przedstawiono jako różnice absorbancji próby zawierającej kofeinę i próby ślepej mierzonej względem wody jako roztworu odniesienia. Średnia wartość absorbancji dla próby ślepej wynosiła 0,299. Tak otrzymaną krzywą wzorcową przedstawiono na rysunku 56. W tabeli 81 zawarto ocenę statystyczną opracowanej metody.



Rysunek 56.

Krzywa wzorcowa do spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny po izolacji techniką SPE.

Tabela 81. Ocena statystyczna wyników krzywej wzorcowej.

Ilość kofeiny [μg/ml]	OZNACZONO n = 5			
	$\bar{X}$	S	S _r	$\pm t_{0,95} \cdot \bar{S}$
0,20	0,142	0,023	16,63	0,026
0,32	0,324	0,006	2,08	0,007
0,40	0,431	0,042	9,92	0,005
0,52	0,575	0,014	2,46	0,016
0,60	0,669	0,006	0,91	0,007

Badany układ spełnia prawo Beera w granicach stężeń kofeiny od 0,20 do 0,60 μg/ml. Parametry prostej $A = a \cdot c_{\text{KOF}} + b$ przyjmują wartość: $a = 1,3072$; $b = -0,1052$. Współczynnik korelacji liniowej wynosi 0,9982. Obliczony średni sumaryczny molowy współczynnik absorpcji ma wartość $\epsilon_{655}^S = 2,09 \cdot 10^5 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$.

7. Aplikacje.

7.1. Oznaczanie teofiliny w preparacie farmaceutycznym.

Opracowane spektrofotometryczne metody oznaczania badanych reduktorów można zastosować bezpośrednio dla preparatów prostych, w których brak jest innych substancji czynnych o właściwościach redukujących.

Wykorzystując układ odczynników: Ce(IV) i arsenazo III, oznaczono zawartość teofiliny w preparacie farmaceutycznym Theophyllum – prolongatum 300 (numer serii G11002, producent: Glaxo Smithkline Pharmaceuticals), stosowanym jako lek w zapobieganiu stanom duszności w przewlekłych chorobach dróg oddechowych.

Charakterystyka leku: teofilina bezwodna – 300 mg;

substancje towarzyszące – sacharoza, skrobia, talk.

Sposób analitycznego postępowania: tabletkę Theophyllum (300 mg) rozdrobniono i rozpuszczono w gorącej wodzie. Całość przesączono i uzupełniono wodą do objętości 100 ml. Otrzymany roztwór rozcieńczono. Do analizy pobierano 1 ml roztworu o deklarowanym stężeniu analitu 7,5 µg/ml. Analizowano z jednego preparatu trzy tabletki. Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 82. Są one zgodne z wartością deklarowaną, przy dobrej precyzji oznaczeń.

Tabela 82. Wyniki oznaczania teofiliny w preparacie farmaceutycznym

NUMER SERII	ZAWARTOŚĆ TEOFILINY [mg], n=6		S _r %	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
	DEKLAROWANA	OZNACZONA		
1.	300,00	301,50	0,75	2,34
2.	300,00	301,00	1,03	3,27
3.	300,00	300,83	0,99	3,14

gdzie:

- a) n = ilość oznaczeń
- b) S_r% = względne odchylenie standardowe
- c) μ = przedział ufności dla poziomu istotności α

7.2. Ocena zawartości garbników hydrolizujących w liściach jeżyny.

Opracowaną spektrofotometryczną metodę oznaczania kwasu taninowego z wykorzystaniem układu odczynników Ce(IV) i arsenazo III zastosowano do oceny zawartości garbników hydrolizujących w liściach jeżyny (*Rubi fruticosi folium*), po uprzedniej izolacji chromatograficznej na bibule Whatman nr 3.

Sposób analitycznego postępowania: 3,5 g liści zawierających ok. 10% garbników hydrolizujących zalano 250 ml wrzącej wody i gotowano łagodnie przez 10 minut. Po ostudzeniu przesączono i uzupełniono wodą do 250 ml. Na bibułę наносono 10 μ l tak przygotowanego roztworu, a następnie postępowano tak jak opisano w punkcie 5.2.1.

Wykonano trzy serie oznaczeń ($n=6$) z trzech różnych preparatów. Wyniki wraz z oceną statystyczną zamieszczono w tabeli 83.

Tabela 83. Ocena zawartości garbników hydrolizujących w liściach jeżyny.

NUMER SERII	Oznaczona zawartość garbników hydrolizujących [%]	$S_r\%$	μ_r $\alpha = 0,05[\%]$
1.	8,77	1,29	$\pm 0,18$
2.	7,76	2,10	$\pm 0,26$
3.	8,86	0,86	$\pm 0,11$

7.3. Oznaczanie kwasu galusowego w preparacie farmaceutycznym „Acifungin forte”.

Oznaczenie kwasu galusowego w preparacie złożonym, zawierającym inne związki o właściwościach redukujących wymaga jego uprzedniej izolacji. W badaniach zastosowano opracowane warunki rozdzielania chromatograficznego na żelu krzemionkowym. W celu oznaczenia analitu zastosowano opracowaną metodę spektrofotometryczną, wykorzystującą sprzężone reakcje redoks i kompleksowania przebiegające w układzie odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli oraz metodę densytometryczną.

Charakterystyka leku: „Acifungin forte”(producent: Zakłady Farmaceutyczne – Aerozolowe „Unia”Spółdzielnia Pracy) jest preparatem złożonym o miejscowym działaniu odkażającym. Wykazuje aktywność przeciwgrzybiczą i słabą przeciwbakteryjną. Działa także przeciwzapalnie, przeciwwysiękowo i złuszczająco. Jest przeznaczony do stosowania zewnętrznego, w chorobach grzybiczych paznokci.

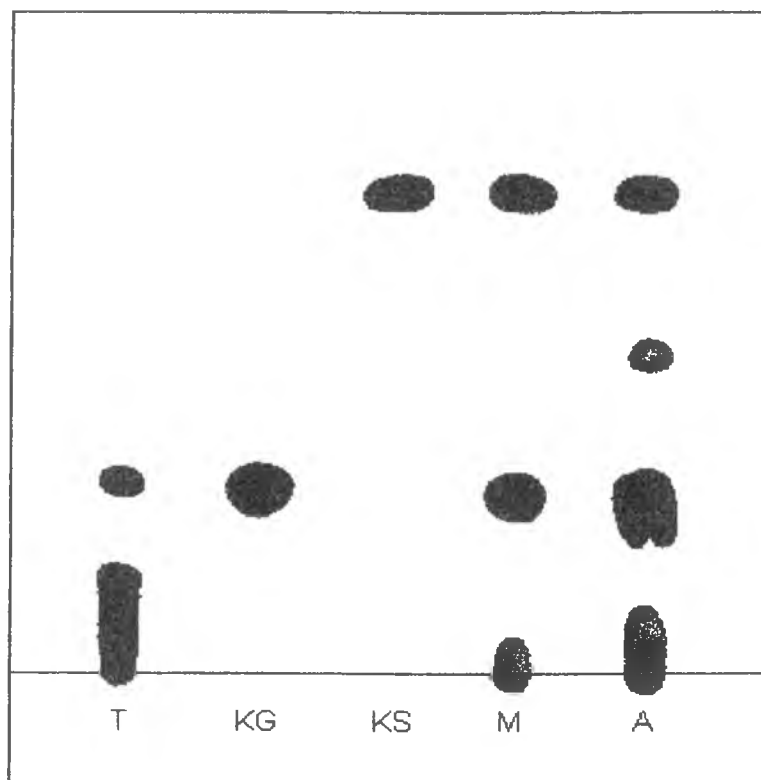
100 g płynu zawiera:

- | | |
|--------------------|---------|
| • Kwas borowy | 4,024 g |
| • Kwas salicylowy | 0,966 g |
| • Kwas galusowy | 1,61 g |
| • Kwas octowy | 2,0 g |
| • Kwas taninowy | 4,4 g |
| • Salicylan metylu | 1,0 g |

Sposób analitycznego postępowania: pobrano 10 ml płynu, który odparowano do sucha na łaźni wodnej. Pozostałość rozpuszczono w około 3 ml wody redestylowanej a otrzymany roztwór przesączono przez twardy sączek. Następnie przeniesiono ilościowo do kolbki o pojemności 100 ml i uzupełniono wodą redestylowaną. W celu oznaczenia kwasu galusowego metodą chromatograficzno – spektrofotometryczną

na płytki chromatograficzne nanoszono 20 μ l tak przygotowanego roztworu, a stosując detekcję densytometryczną 5 μ l roztworu pięciokrotnie rozcieńczonego.

Na rysunku 57 przedstawiono schemat chromatogramu uzyskany po rozwinięciu w wybranej fazie ruchomej i spryskaniu roztworami Fe(III) i 2,2'-bipirydyli.



Rysunek 57.

Schemat chromatogramu po wywołaniu układem odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli (T – kwas taninowy; KG – kwas galusowy; KS – kwas salicylowy; M – mieszanina T:KG:KS w stosunku objętościowym 1:1:1; A – „Acifungin forte”).

Aby oznaczyć kwas galusowy metodą chromatograficzno-spektrofotometryczną, po rozwinięciu chromatogramów zdejmowano z płytki plamkę kwasu galusowego, przenoszono do zlewki i eluowano ciepłą wodą redestylowaną (3 razy po 2 ml). Dalej postępowano zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 5.1.1.

W celu densytometrycznego oznaczenia analitu w badanym preparacie, postępowano zgodnie z opisem zamieszczonym w punkcie 5.1.4.

Wyniki oznaczeń, obliczone na podstawie wcześniej wyznaczonych krzywych wzorcowych zamieszczono w tabeli 84.

Tabela 84. Wyniki oznaczeń kwasu galusowego w preparacie farmaceutycznym „Acifungin”. Wartość deklarowana 1,61 g w 100 g płynu.

Metoda	Numer serii	Oznaczona ilość kwasu galusowego [g/100g] (n=6)	S _r [%]	μ, α = 0,05 [g]
Chromatograficzno - spektrofotometryczna	1	1.25	2.30	±0.07
	2	1.29	1.24	±0.04
	3	1.34	1.58	±0.05
Densytometryczna	1	1.54	1.36	±0.02
	2	1.49	1.81	±0.03
	3	1.43	1.68	±0.03

Otrzymane wyniki są nieco niższe od deklarowanej zawartości kwasu galusowego, przy jednoczesnej dobrej precyzji oznaczeń. Może to być spowodowane wstępną izolacją kwasu galusowego z preparatu „Acifungin” oraz zdejmowaniem i wymywaniem plamek tego związku z płytek chromatograficznych w celu dalszego oznaczenia spektrofotometrycznego.

7.4. Ilościowa ocena zawartości (+)-katechiny w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty.

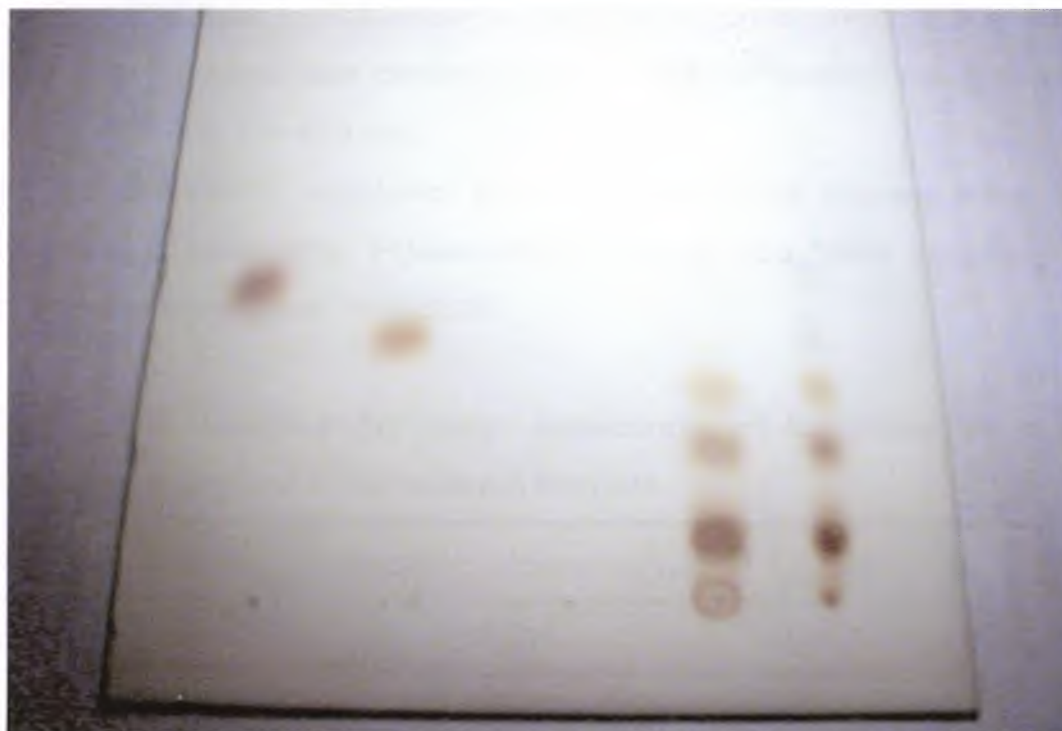
W temacie aplikacji opracowanej densytometrycznej metody oznaczania (+)-katechiny, podjęto próby ilościowej oceny zawartości tego analitu w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty.

Charakterystyka leku: kapsułki „Green tea”(producent: Sportatut Sp. z o.o., numer partii 112) zawierają silnie skoncentrowany ekstrakt zielonej herbaty. Deklarowana zawartość związków polifenolowych w jednej kapsułce wynosi 450 mg, z czego 330 mg stanowią katechiny: (+)-katechina, (-)-epikatechina, (+)-galokatechina, (-)-epigalokatechina, (-)-galusan epikatechiny i (-)-galusan epigalokatechiny.

Sposób analitycznego postępowania: zawartość dwóch kapsułek przeniesiono ilościowo do zlewki zawierającej 20 ml zimnej wody, po czym umieszczono ją w gorącej łaźni wodnej i co kilka minut mieszano zawartość. Po dwudziestu minutach całość przesączono do kolby o pojemności 50 ml i uzupełniono wodą redestylowaną.

Napar zielonej herbaty (Ceylon), przygotowano z 6 gramowej odważki suchych liści, które zaparzano przez 3 minuty w 25 ml wrzącej wody redestylowanej, po czym całość przesączono.

Na płytki pokryte żelem krzemionkowym F₂₅₄, наносzono po 5 µl tak przygotowanych roztworów. Chromatogramy rozwijano w ustalonych warunkach. Otrzymany chromatogram przedstawia rysunek 58. Do ekstrakcji katechin z zielonej herbaty polecane jest również zastosowanie octanu etylu. W trakcie wykonywania badań zaobserwowano, iż użycie tego rozpuszczalnika jest mniej efektywne. Na rysunku przedstawiającym rozdział preparatu „Green tea” katechina uwidacznia się jako mało kontrastowa plamka na wysokości odpowiadającej roztworowi wzorcowemu (+)-katechiny. Aby dodatkowo potwierdzić tożsamość tej substancji, wykreślono jej widmo, w zakresie od 200 do 500 nm, które porównano z widmem wzorca (+)-katechiny. Otrzymane zależności obrazuje rysunek 59. Analogiczne postępowanie przeprowadzono dla naparu z zielonej herbaty. Badania pozwoliły potwierdzić obecność analitu w badanych preparatach.



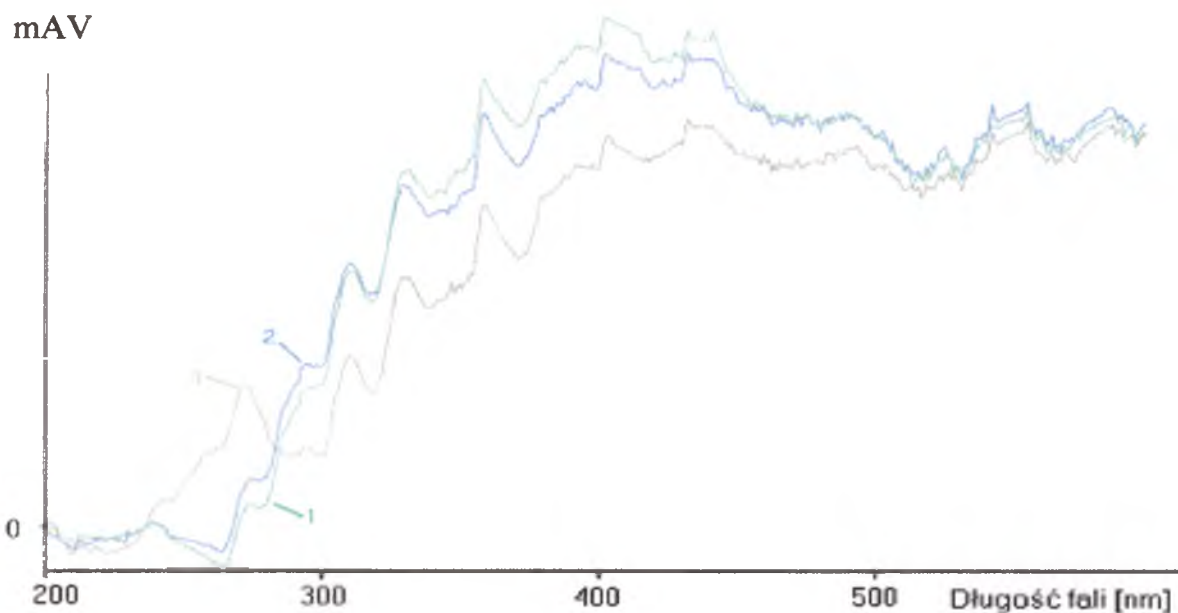
KG

KAT

„G.T. 1” „G.T. 2”

Rysunek 58.

Chromatogram po wywołaniu układem odczynników: Fe(III) – 2,2'-bipirydył; (KG-kwas galusowy, KAT-katechina, „G.T.1”-preparat „GREEN TEA”-ekstrahowano wodą, „G.T.2” preparat „GREEN TEA” – ekstrahowano octanem etylu).



Rysunek 59.

Widmo nr 1. – wzorzec (+)-katechiny

Widmo nr 2. – preparat „GREEN TEA”

Widmo nr 3. – napar z zielonej herbaty

W celu oznaczenia (+)-katechiny w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty, otrzymane chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej przy długości fali światła $\lambda = 410 \text{ nm}$.

• Otrzymane wartości wysokości pików odniesiono do krzywej wzorcowej do densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny. Analizowano jeden preparat, $n = 6$. Wyniki oznaczeń zamieszczono w tabeli 85.

Tabela 85. Wyniki densytometrycznego oznaczania (+)-katechiny w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty.

Analizowany materiał	Zawartość (+)-katechiny [$\mu\text{g/g}$]	$S_r\%$	$\mu, \alpha = 0,05$
Preparat “Green tea”	0,378	4,12	$\pm 0,005$
Napar z zielonej herbaty	0,065	3,97	$\pm 0,005$

Zielona herbata charakteryzuje się bogactwem związków określanych wspólną nazwą katechiny. Opracowane postępowanie pozwala oznaczyć jedną z tych substancji: (+)-katechinę. Uzyskane wielkości wskazują, że jej zawartość wśród całej grupy katechin jest znikoma. Fakt ten znajduje również potwierdzenie na zamieszczonym obrazie chromatogramu, gdzie intensywność plam pozostałych katechin znacznie przewyższa intensywność plamki (+)- katechiny.

Preparat farmaceutyczny „Green tea” to skoncentrowany ekstrakt z zielonej herbaty, stąd też oznaczona zawartość (+)-katechiny jest w nim znacznie wyższa niż w naparze z liści zielonej herbaty.

7.5. Zastosowanie densytometrii i spektrofotometrii do oznaczania kwasu galusowego w naparach herbacianych po rozdzieleniu chromatograficznym.

W ostatnim czasie, w Polsce znacznie wzrosło zainteresowanie herbatą. Obserwuje się zwiększenie spożycia tego napoju, przygotowywanego coraz częściej z wysokogatunkowych herbat liściastych. Na rynku pojawiło się wiele herbaciarni i specjalistycznych sklepów z herbatą oraz akcesoriami do jej zaparzania.

Celem badań było oznaczenie ilości kwasu galusowego w naparach herbacianych które piją Polacy. Wszystkie próbki herbat zakupiono w sieci sklepów „Herbaty Świata”, Asco Sp. z o.o. Analizie poddano po dwa gatunki herbaty oolong, pu – erh i czarnej. W herbacie białej i zielonej stwierdzono niewielkie ilości kwasu galusowego, będące poniżej granicy oznaczalności opracowanych metod.

7.5.1. Densytometryczne oznaczanie zawartości kwasu galusowego w herbacie pu – erh w zależności od czasu zaparzania.

Sposób analitycznego postępowania: 0,6 g herbaty pu – erh zalano 10 ml wrzącej wody redestylowanej i zaparzano pod przykryciem przez 5, 8 i 15 minut. Otrzymane napary przesączono przez sączek z bibuły i ostudzono. Na płytki chromatograficzne Kieselgel F₂₅₄ наносzono po 5 µl przygotowanych roztworów. Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono w ustalonych warunkach (p. 5.1.). Po rozwinięciu chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej w świetle UV przy $\lambda = 280$ nm. Otrzymane wielkości powierzchni pików chromatograficznych odniesiono do wcześniej otrzymanej krzywej wzorcowej charakteryzującej oznaczanie kwasu galusowego. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli 86.

Tabela 86. Wyniki densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego w herbacie pu – erh, w zależności od czasu zaparzania; n = 6.

Czas zaparzania [min]	Oznaczona ilość kwasu galusowego [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
5	8,44	3,79	$\pm 0,97$
8	9,60	2,19	$\pm 0,64$
15	11,62	1,03	$\pm 0,36$

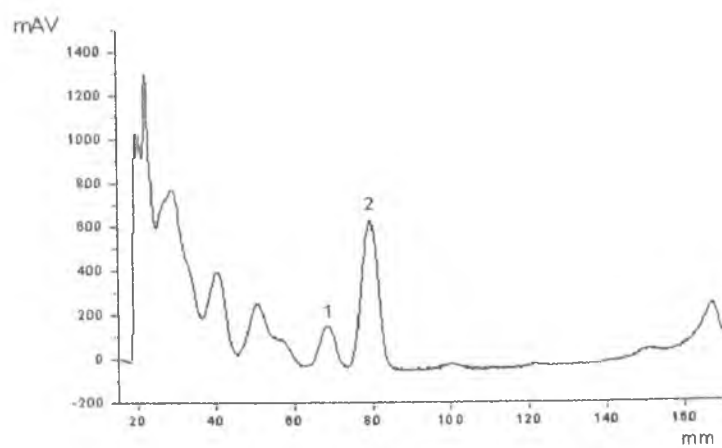
Ilość kwasu galusowego w przygotowanych naparach rośnie wraz z czasem zaparzania, jednakże gdy liście herbaciane są zaparzane dłużej niż 15 minut znacznie wzrasta ilość garbników. Taki napar jest bardzo cierpki i nie nadaje się do spożycia.

7.5.2. Densytometryczne oznaczanie zawartości kwasu galusowego w różnych rodzajach herbat.

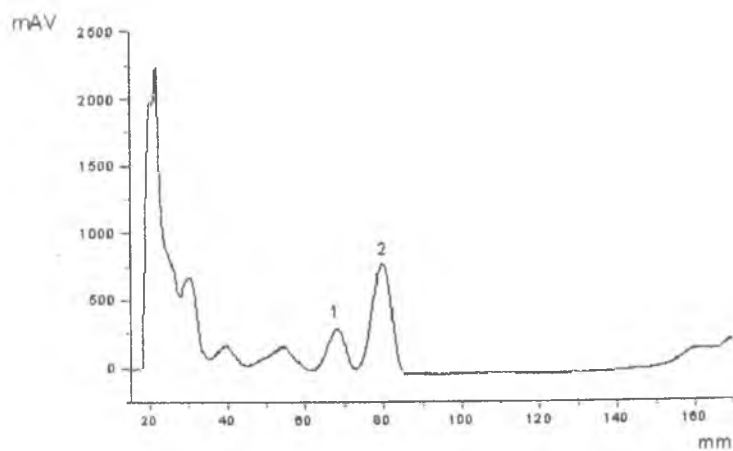
Sposób analitycznego postępowania: próby do badań przygotowywano poprzez zaparzanie przez 15 minut w 10 ml wrzącej wody redestylowanej: 1,6 g liści herbaty oolong, 1,2 g liści herbaty czarnej i 0,6 g liści herbaty pu – erh. Analizowano po dwa gatunki z każdego rodzaju herbat. Próby mieszano co 5 minut. Ekstrakty przesączono i ostudzone do temperatury pokojowej. Na płytki chromatograficzne Kieselgel F₂₅₄ наносzono po 5 μ l przygotowanych roztworów. Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono w ustalonych warunkach (p. 5.1.). Po rozwinięciu chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej w świetle UV przy $\lambda = 280$ nm. Przykłady otrzymanych densytogramów przedstawia rysunek 60.

Ilość kwasu galusowego w przygotowanych naparach herbacianych obliczono na podstawie krzywej wzorcowej. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli 87.

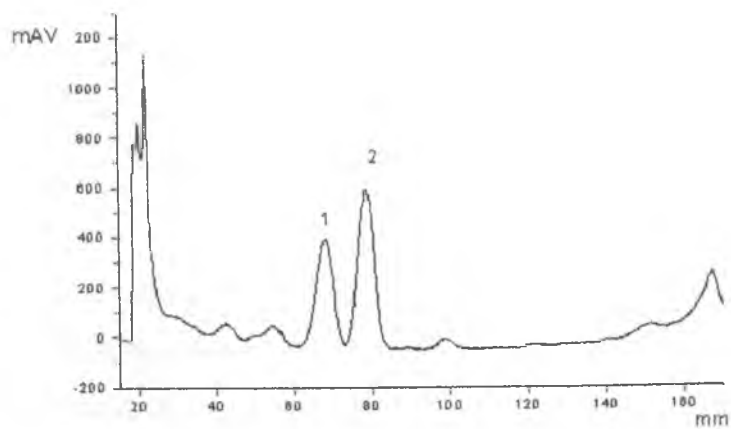
a)



b)



c)



**Rysunek 60. Densytogramy dla a) herbaty oolong, b) czarnej, c) pu – erh
(1 – kwas galusowy; 2 – kofeina)**

Tabela 87. Wyniki densytometrycznego oznaczania kwasu galusowego w różnych rodzajach herbat; n= 6.

Rodzaj herbaty	Oznaczona ilość kwasu galusowego [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
oolong 1	1.66	3.01	± 0.09
oolong 2	0.71	2.82	± 0.06
pu-erh 1	11.62	1.03	± 0.36
pu-erh 2	7.32	3.69	± 0.82
czarna-Ceylon Pakoe	3.26	3.37	± 0.20
czarna-Yunnan	1.34	1.05	± 0.04

Ilość kwasu galusowego w herbacie zależy między innymi od sposobu jej otrzymywania. Podczas produkcji herbaty ma miejsce deestryfikacja galusanów katechin, prowadząca do uwalniania kwasu galusowego. Stąd też jego zawartość w herbatach fermentowanych (oolong, czarna, pu – erh), jest znacznie większa niż w herbatach nie fermentowanych (biała, zielona) i pozostaje w zależności: oolong < czarna < pu – erh.

7.5.3. Spektrofotometryczne oznaczanie kwasu galusowego w herbacie pu – erh.

Ilość kwasu galusowego w herbacie pu – erh jest na tyle duża, że możliwe staje się jej spektrofotometryczne oznaczenie, po uprzedniej izolacji chromatograficznej. W tym celu zastosowano opracowaną procedurę chromatograficzno – spektrofotometrycznego oznaczania kwasu galusowego, z wykorzystaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania przebiegających w układzie odczynników: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli.

Sposób analitycznego postępowania: 1,6 g liści herbaty pu – erh zalano 10 ml wrzącej wody redestylowanej i zaparzano pod przykryciem przez 15 minut. Próby mieszano co 5 minut. Ekstrakty przesączono i ostudzone do temperatury pokojowej. Na płytki chromatograficzne Kieselgel F₂₅₄ наносzono po 10 µl przygotowanych roztworów. Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono w ustalonych warunkach (p. 5.1). Po wysuszeniu chromatogramów w temperaturze pokojowej, zdrapywano z nich kwas galusowy, który uwidacznia się jako szare plamy. Analit ekstrahowano z żelu gorącą wodą redestylowaną (3 razy po 2 ml). Połączone ekstrakty przesączono. Dalej postępowano zgodnie ze sposobem zamieszczonym w p. 5.1.1. Oznaczone zawartości kwasu galusowego porównano z wielkościami otrzymanymi w wyniku oznaczenia densytometrycznego, co przedstawia tabela 88.

Tabela 88. Wyniki oznaczania kwasu galusowego w herbacie pu – erh (n=6).

Rodzaj herbaty	Metoda oznaczania	Ilość kwasu galusowego [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
Pu – erh 1	Densytometryczna	11,62	1,03	± 0,26
	Spektrofotometryczna	10,52	2,47	± 0,79
Pu – erh 2	Densytometryczna	7,32	3,69	± 0,82
	Chromatograficzna	6,71	3,87	± 0,79

Zastosowanie dwóch opracowanych metod do oznaczania kwasu galusowego w naparach z liści herbaty pu - erh daje porównywalne wyniki, przy dobrej precyzji oznaczeń.

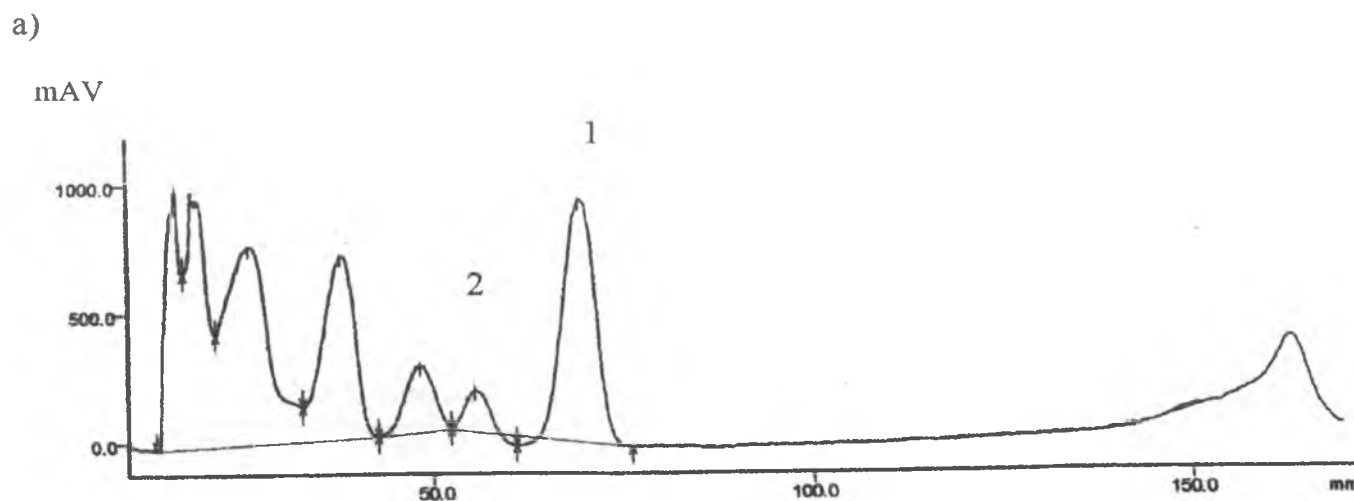
7.6. Densytometryczne oznaczanie kofeiny w materiałach roślinnych.

7.6.1. Oznaczanie kofeiny w naparach herbacianych.

Celem badań było oznaczenie kofeiny w naparach herbacianych przygotowanych z różnych rodzajów herbat, tj. białej, zielonej, oolong, pu – erh i czarnej. Analizowano po dwa gatunki z każdego rodzaju herbat. W badaniach zastosowano opracowaną metodę densytometrycznego oznaczania kofeiny po izolacji na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego.

Sposób analitycznego postępowania: 1,5 g suchych liści herbaty białej i czarnej, 2 g zielonej i oolong oraz 3 g pu – erh zalano 100 ml wrzącej wody redestylowanej i zaparzano pod przykryciem przez 3, 5 i 8 minut. Otrzymane napary przesączono przez sącdek z bibuły i ostudzono. Na płytki chromatograficzne Kieselgel F₂₅₄ наносzono po 5 µl przygotowanych roztworów. Rozwijanie chromatogramów przeprowadzono w ustalonych warunkach (p. 5.1.). Po rozwinięciu chromatogramy poddano detekcji densytometrycznej w świetle UV przy $\lambda = 280$ nm. Przykłady otrzymanych densytogramów przedstawia rysunek 61.

Otrzymane wielkości powierzchni pików chromatograficznych odniesiono do wcześniej wyznaczonej krzywej wzorcowej densytometrycznego oznaczania kofeiny. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli 89, 90 i 91.

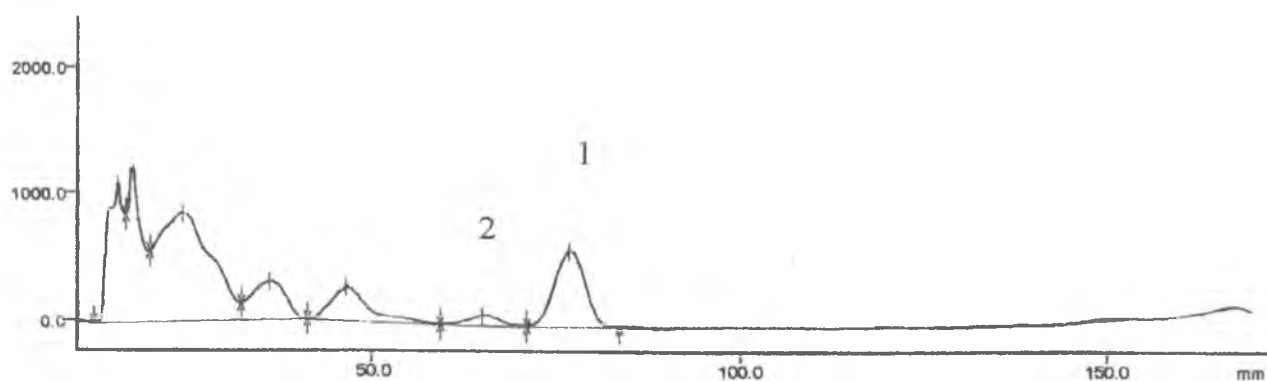


Rysunek 61.

Densytogramy otrzymane dla naparów z liści herbaty: a) białej, b) zielonej, c) oolong, d) pu – erh i e) czarnej. 1 – kofeina, 2 – kwas galusowy.

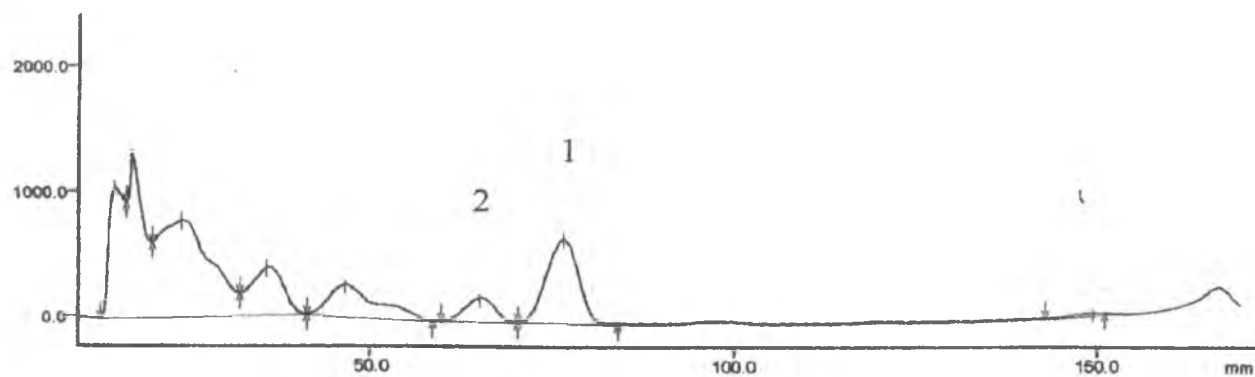
b)

mAV



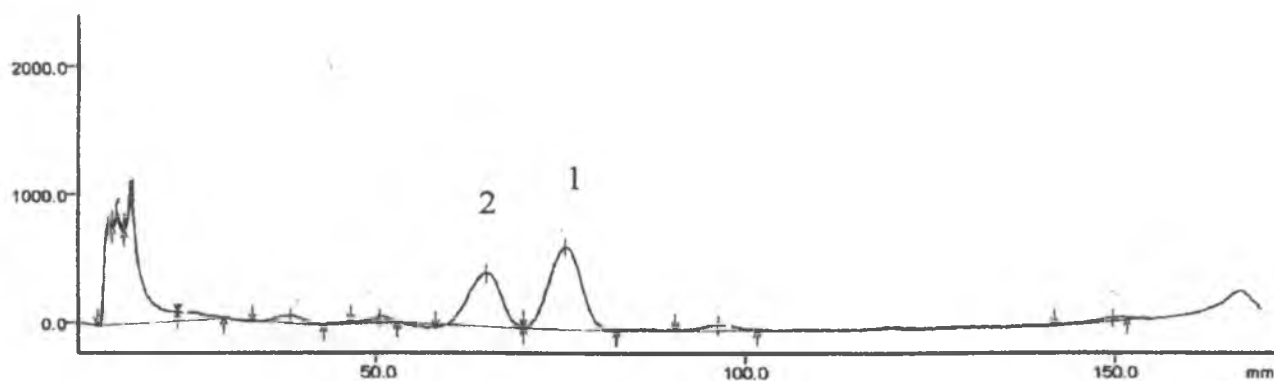
c)

mAV



d)

mAV

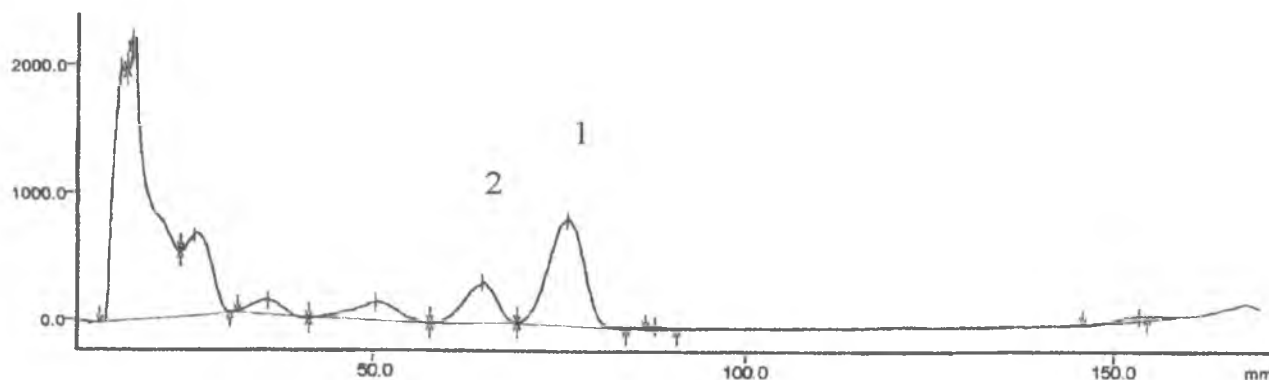


Rysunek 61.

Densytogramy otrzymane dla naparów z liści herbaty: a) białej, b) zielonej, c) oolong, d) pu – erh i e) czarnej. 1 – kofeina, 2 – kwas galusowy.

e)

mAV



Rysunek 61.

Densytogramy otrzymane dla naparów z liści herbaty: a) białej, b) zielonej, c) oolong, d) pu – erh i e) czarnej. 1 – kofeina, 2 – kwas galusowy.

Tabela 89. Wyniki oznaczania kofeiny w naparach herbacianych. Czas zaparzania: 3 minuty, n = 6.

Rodzaj herbaty	Ilość kofeiny [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
Biała – Fujan	29,16	2,50	29,16 ± 2,22
Biała – Paj Mu Tan	15,36	2,15	15,36 ± 1,00
Zielona – Ceylon	14,40	4,30	14,40 ± 1,89
Zielona – Gun Powder	15,27	4,32	15,27 ± 2,00
Oolong 1	15,70	3,90	15,70 ± 1,89
Oolong 2	13,69	3,72	13,69 ± 1,55
Pu –erh 1	16,98	1,18	16,98 ± 0,61
Pu-erh 2	13,78	1,81	13,78 ± 0,76
Czarna – Yunnan	23,50	0,94	23,50 ± 0,67
Czarna - Ceylon Pakoe	18,29	1,20	18,29 ± 0,67

Tabela 90. Wyniki oznaczania kofeiny w naparach herbacianych. Czas zaparzania: 5 minut, n = 6.

Rodzaj herbaty	Ilość kofeiny [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
Biała – Fujan	31,06	0,58	31,06 ± 0,55
Biała – Paj Mu Tan	19,19	2,76	19,19 ± 1,61
Zielona – Ceylon	17,39	2,87	17,39 ± 1,52
Zielona – Gun Powder	18,57	2,85	18,57 ± 1,61
Oolong 1	20,08	2,79	20,08 ± 1,70
Oolong 2	19,53	3,02	19,53 ± 1,79
Pu –erh 1	19,81	3,03	19,81 ± 1,82
Pu-erh 2	19,62	2,04	19,62 ± 1,22
Czarna – Yunnan	34,61	1,88	34,61 ± 1,98
Czarna - Ceylon Pakoe	24,66	4,05	24,66 ± 3,04

Tabela 91. Wyniki oznaczania kofeiny w naparach herbacianych. Czas zaparzania: 8 minut, n = 6.

Rodzaj herbaty	Ilość kofeiny [mg/g]	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
Biała – Fujan	33,86	1,12	33,86 ± 1,16
Biała – Paj Mu Tan	20,21	2,87	20,21 ± 1,76
Zielona – Ceylon	22,85	1,13	22,85 ± 0,82
Zielona – Gun Powder	19,32	3,05	19,32 ± 1,79
Oolong 1	23,57	1,61	23,57 ± 1,16
Oolong 2	19,85	1,26	19,85 ± 0,76
Pu –erh 1	23,18	3,75	23,18 ± 2,65
Pu-erh 2	20,70	1,83	20,70 ± 1,16
Czarna – Yunnan	37,16	1,45	37,16 ± 1,64
Czarna - Ceylon Pakoe	30,64	2,61	30,64 ± 2,43

Zawartość kofeiny w surowcach handlowych jest różna i zależy m. in. od odmiany, miejsca uprawy, czasu zbioru, a przede wszystkim sposobu otrzymywania. W przeprowadzonych badaniach napary z herbat przygotowywano w taki sposób, jak robi się to w celu codziennego spożycia (ok. 3, 5 lub 8 minut zaparzania). Uzyskane wyniki badań potwierdzają fakt, iż im mniej herbata jest poddawana obróbce, tym mniejsza jest biodostępność zawartej w niej kofeiny. Najmniejszą zawartość tego alkaloidu stwierdzono w herbacie zielonej – nie poddawanej procesowi fermentacji, więcej w herbatach półfermentowanych – oolong i pu – erh, a najwięcej w fermentowanej herbacie czarnej. Otrzymane wyniki pozostają w dobrej zgodności z danymi dotyczącymi oznaczania kofeiny, zamieszczonymi w literaturze [101,102,104]

7.6.2. Oznaczanie zawartości kofeiny w liściach Yerba Mate i preparatach zawierających Guarana.

Celem pracy było także ilościowe oznaczenie zawartości kofeiny w naparach przygotowanych z liści Yerba Mate oraz herbatek Guarana (Vitax) i Guaranda (Bio activ), zawierających ekstrakt z nasion guarany. W badaniach zastosowano detekcję densytometryczną. Oznaczenie poprzedziła izolacja analitu wykorzystująca technikę chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym.

Skład badanych preparatów:

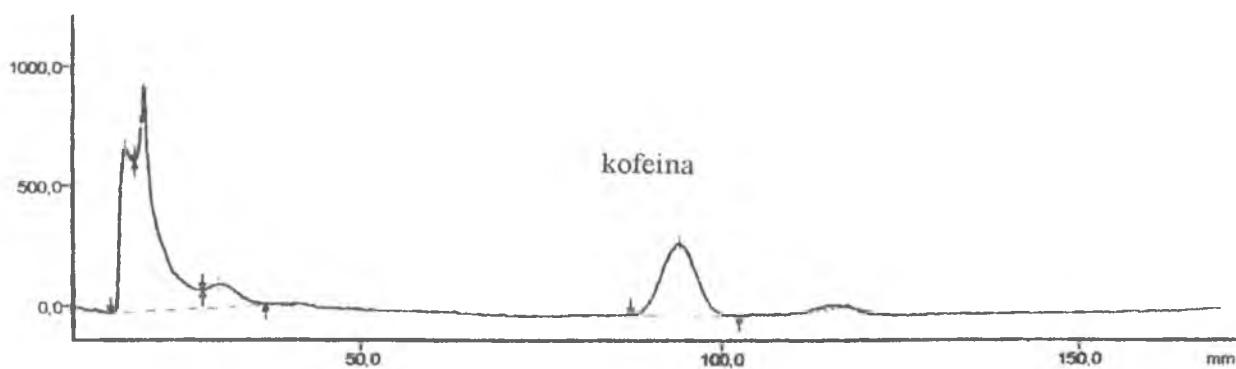
- herbatka Guarana (Vitax): jabłko, guarana, liść mięty, skórka pomarańczy i cytryny
- herbatka Guaranda (Bio activ): herbata oolong, guarana

Liście Yerba Mate zakupiono w sklepie „Herbaty Świata”

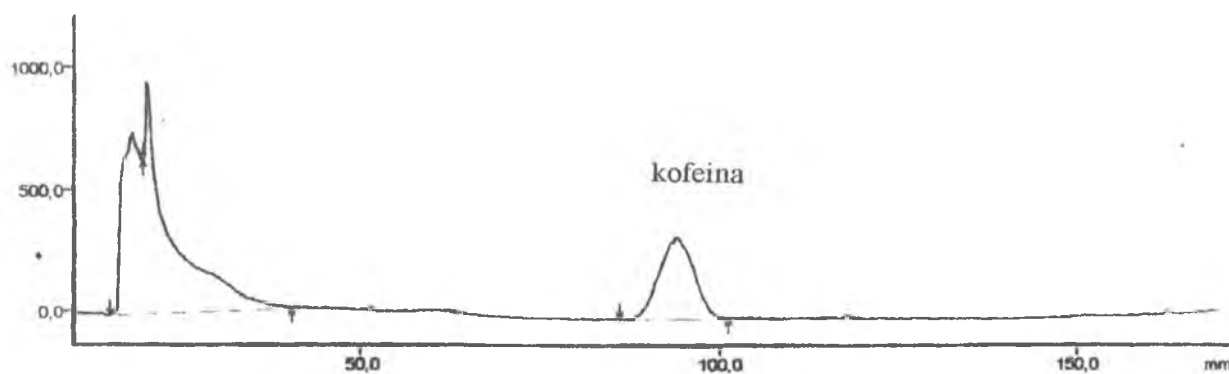
Sposób analitycznego postępowania:

Napary badanych preparatów przygotowano poprzez zalanie suszu wrzącą wodą redestylowaną i zaparzanie przez 8 minut. W przypadku herbatek Guarana i Guaranda, jedną torebkę, tj. 2 g, zalano odpowiednio 25 i 50 ml wody, zaś w przypadku Yerba Mate zaparzano 3 g liści w 100 ml wody. Po przesączeniu na płytki chromatograficzne наносzono po 5 μ l przygotowanych naparów. Chromatogramy rozwijano i densytometrowano w ustalonych warunkach. Otrzymane densytogramy przedstawiono na rysunku 62, a uzyskane wyniki oznaczania kofeiny w tabeli 92.

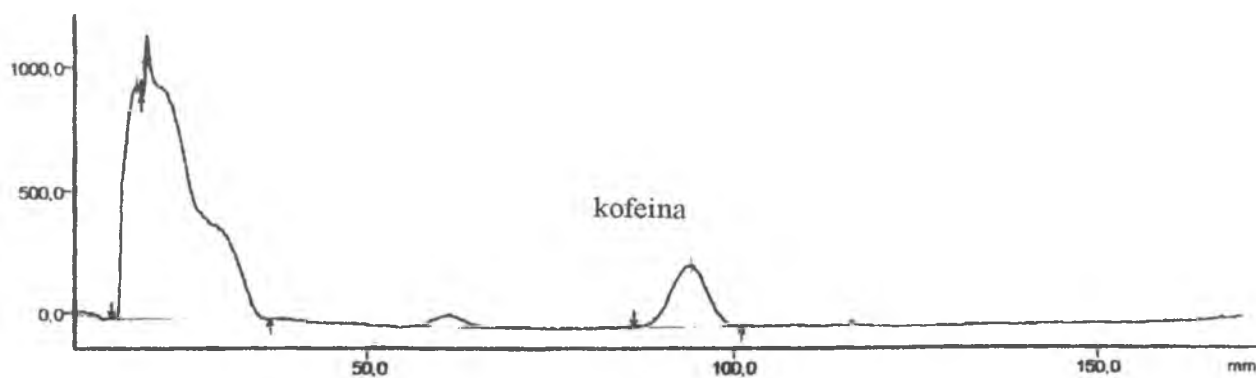
a) mAV



b) mAV



c) mAV



Rysunek 62.

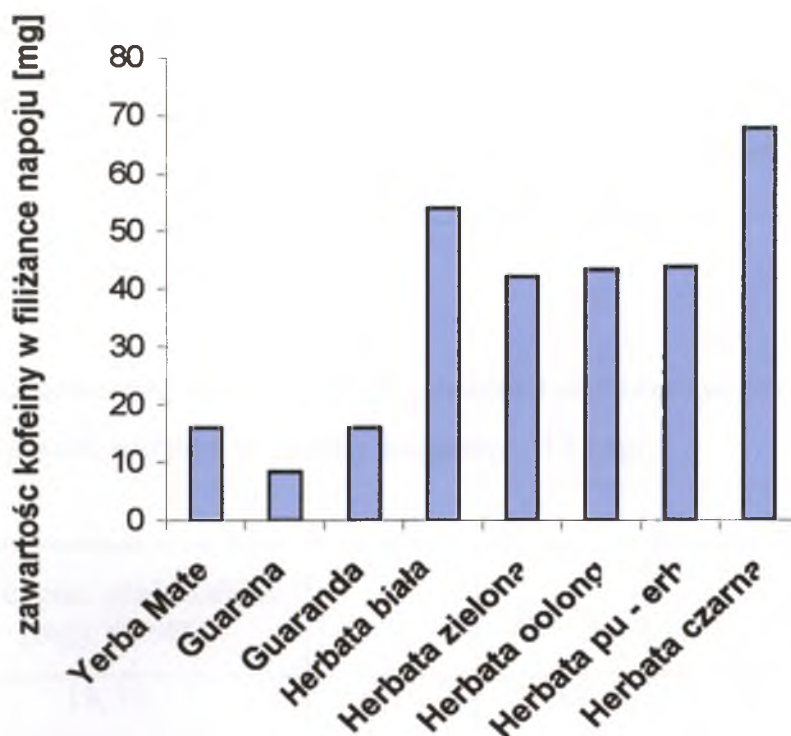
Densytogramy uzyskane dla naparów z herbat: a) Guarana, b) Guaranda oraz z c) liści Yerba Mate.

Tabela 92. Wyniki oznaczania kofeiny w herbatkach Guarana, Guaranda i liściach Yerba Mate, n=6.

Rodzaj preparatu	Zawartość kofeiny [mg/g]	S	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,95$ [mg/g]
GUARANA	4,17	0,21	4,94	4,17 ± 0,33
GUARANDA	10,35	0,22	2,14	10,35 ± 0,35
YERBA MATE	7,97	0,40	5,05	7,97 ± 0,64

7.6.3. Porównanie zawartości kofeiny w badanych surowcach purynowych.

Biorąc pod uwagę fakt, że tradycyjną filiżankę napoju przygotowuje się z około 2 g liści herbaty, porównano średnią, oznaczoną zawartość kofeiny w badanych surowcach purynowych. Otrzymane zależności przedstawiono na rysunku 63.



Rysunek 63.

Porównanie zawartości kofeiny w badanych surowcach purynowych.

7.7. Spektrofotometryczne oznaczanie kofeiny w materiałach roślinnych po izolacji z zastosowaniem techniki SPE.

7.7.1. Oznaczanie kofeiny w preparacie „Green tea”

Opracowaną, spektrofotometryczną metodę oznaczania kofeiny, po izolacji analitu z zastosowaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej, wykorzystano do oznaczania badanej substancji w preparacie „Green tea”, o deklarowanej zawartości kofeiny.

Charakterystyka preparatu „Green tea”: kapsułki zawierają ekstrakt z zielonej herbaty, o składzie: 0,12 g węglowodanów; 18 mg kofeiny, 450 mg polifenoli. Preparat polecany jest jako środek wspomagający odchudzanie i naturalny przeciwutleniacz.

Sposób analitycznego postępowania: zawartość kapsułki rozpuszczono w gorącej wodzie, a następnie przesączono i uzupełniono do objętości 50 ml. Na uprzednio przygotowane kolumny nanoszono po 1 ml roztworu badanego preparatu. Kofeinę z kolumny wymywano chloroformem (2×1 ml). Z otrzymanej próbki odparowywano do sucha chloroform, a kofeinę rozpuszczano w 10 ml gorącej wody. W celu oznaczenia kofeiny pobierano 1 ml tak przygotowanego roztworu i postępowano zgodnie ze sposobem opisanym w p. 6.3. Analizie poddano trzy różne kapsułki, z tego samego opakowania preparatu. Za każdym razem wykonywano cztery oznaczenia. Otrzymane wyniki zamieszczono w tabeli 93

**Tabela 93. Wyniki oznaczeń kofeiny w preparacie farmaceutycznym „Green tea”.
Deklarowana zawartość kofeiny w jednej kapsułce: 18 mg.**

Numer serii	Oznaczona ilość kofeiny [mg] (n=4)	S	S _r [%]	μ , $\alpha = 0,05$ [mg]
1	18,30	0,16	0,86	$18,30 \pm 0,25$
2	18,14	0,17	0,91	$18,14 \pm 0,26$
3	18,29	0,16	0,89	$18,29 \pm 0,26$

7.7.2. Ocena zawartości kofeiny w preparatach zawierających Guarane.

Opracowaną, spektrofotometryczną metodę oznaczania kofeiny, po izolacji analitu z zastosowaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej, wykorzystano również do oceny zawartości badanej substancji w herbatkach Guarana (Vitax) oraz Guaranda (Bio – activ). W tym celu, jedną torebkę, tj. 2 g zalano odpowiednio 50 i 100 ml wody i zaparzano pod przykryciem przez okres 8 minut. 1 ml tak przygotowanych naparów nanoszono na kolumny SPE, dalej postępując jak to opisano w punkcie 6.3. Wyniki, zamieszczone w tabeli 94, porównano z wielkościami otrzymanymi na drodze densytometrycznego oznaczania kofeiny w badanych preparatach.

Tabela 94. Ocena zawartości kofeiny w preparatach zawierających guaranę.

Rodzaj preparatu	Metoda oznaczania	Oznaczona ilość kofeiny [mg/g], (n=4)	S _r [%]	$\mu, \alpha = 0,05$ [mg/g]
Guarana	Spektrofotometryczna	4,60	0,71	4,60 ± 0,05
	Densytometryczna	4,17	4,94	4,17 ± 0,33
Guaranda	Spektrofotometryczna	10,79	0,40	10,07 ± 0,06
	Densytometryczna	10,35	2,14	10,35 ± 0,35

Zastosowanie dwóch opracowanych metod do oznaczania kofeiny w preparatach zawierających guaranę dało porównywalne wyniki. Zawartość kofeiny w herbatce Guaranda jest około dwukrotnie większa niż w herbatce Guarana. Kofeina w herbatce Guaranda może pochodzić z liści herbaty oolong, która jest składnikiem badanego preparatu.

IV

WNIOSKI

1. Zasadniczym celem niniejszej rozprawy było opracowanie warunków oznaczania następujących substancji o znaczeniu biologicznym i farmaceutycznym: kwasu salicylowego, kwasu galusowego, kwasu taninowego, (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny.
2. W opracowanych procedurach analitycznego postępowania w zakresie oznaczania wymienionych reduktorów zastosowano następujące metody i techniki:
 - spektrofotometrię
 - chromatografię planarną
 - spektrodensytometrię
 - łączenie chromatografii planarnej z metodą spektrofotometryczną
 - ekstrakcję do fazy stałej

Wykazano ich przydatność analityczną do oznaczania badanych substancji.

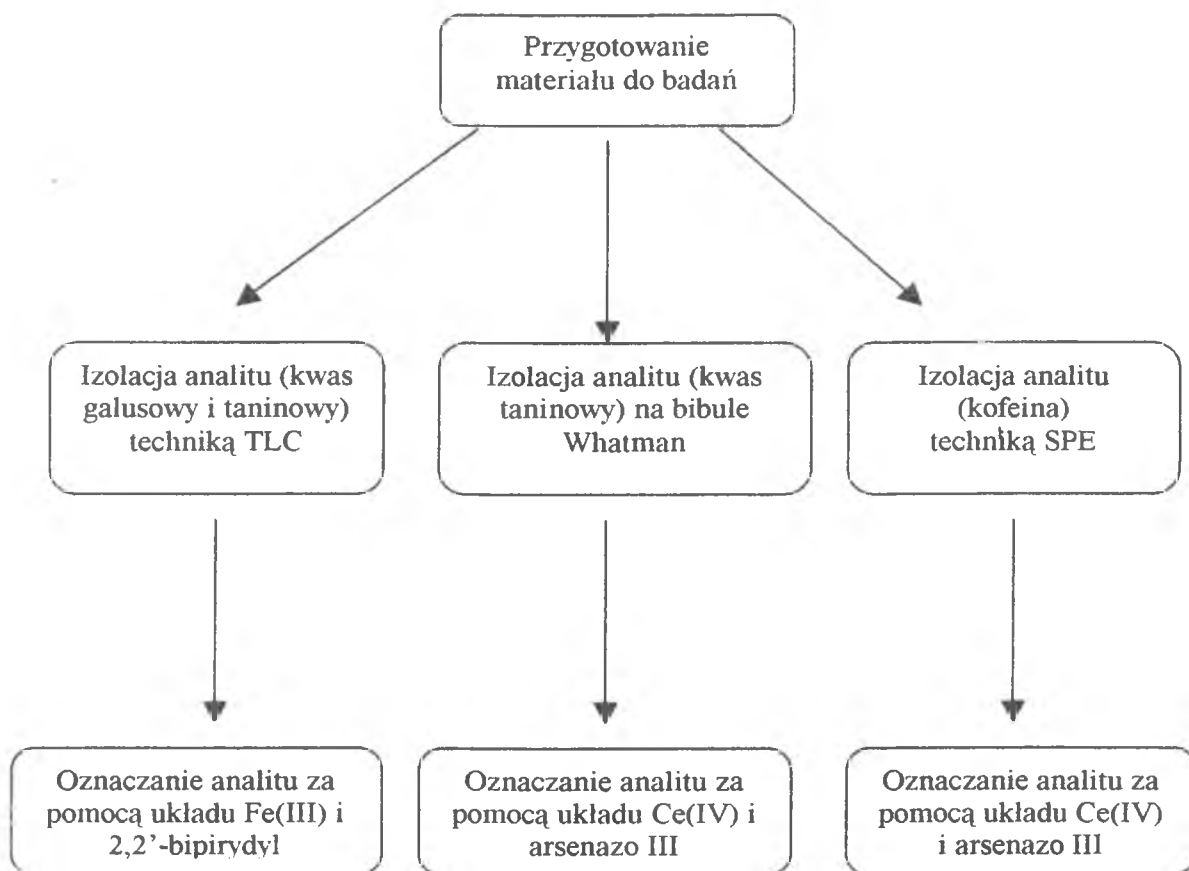
3. W toku przeprowadzonych badań dowiedziono, że układy oksydacyjno – redukcyjne: Ce(IV) - arsenazo III oraz Fe(III) - 2,2'-bipirydył stwarzają realne możliwości oznaczania badanych reduktorów. Proponowane metody spektrofotometryczne charakteryzują się dużą czułością, wynikającą z amplifikacji elektronowej. Obliczone sumaryczne molowe współczynniki absorpcji są od kilku do kilkudziesięciu razy wyższe od molowych współczynników absorpcji dla oznaczania Ce(III) za pomocą arsenazo III oraz Fe(II) za pomocą 2,2'-bipirydyłu. Wzrost efektu barwnego w badanych układach jest związany ze zwiększoną wymianą elektronową w reakcjach redukcji: $Ce^{4+} \rightarrow Ce^{3+}$ oraz $Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$. Sumaryczne molowe współczynniki absorpcji dla oznaczania substancji, w których forma utleniona reduktora organicznego jest bezbarwna, zgodnie ze wzorem: $\epsilon_{Rr}^S = n \cdot \epsilon_{[Me(L)_p]^{m+}}$, zależy od dwóch czynników:

- a) od ilości elektronów oddawanych przez reduktor podczas utleniania (n), co wiąże się ze stechiometrią reakcji redukcji metalu
- b) od wartości molowego współczynnika absorpcji barwnego połączenia kompleksowego ($\epsilon_{[Me(L)_p]^{m+}}$)

[257]

Ponadto opracowane metody cechuje niska granica oznaczalności oraz dobra precyzja, przy jednoczesnej dużej prostocie wykonania i stosunkowo niewielkich kosztach analizy.

4. Substancje, które są przedmiotem badań często występują łączne, zarówno w preparatach naturalnych jak i syntetycznych. Celem zwiększenia selektywności metod spektrofotometrycznych dokonano wyizolowania ich z materiałów złożonych. W tym celu użyto technik chromatograficznych oraz ekstrakcji do fazy stałej. Sposób postępowania zaproponowany w pracy obrazuje schemat:



5. Opracowane rozwiązania analitycznego postępowania zastosowano do oznaczania badanych reduktorów zarówno w preparatach farmaceutycznych (o deklarowanej zawartości badanej substancji) jak również w materiałach naturalnych. Wyniki oznaczeń uzyskane metodą spektrofotometryczną porównano z danymi otrzymanymi metodą densytometryczną. Wykazano dobrą zgodność pomiędzy ilością składnika deklarowanego a uzyskanymi wynikami oznaczeń. Zaletą prezentowanej pracy jest połączenie rozdziału

chromatograficznego z badaniami spektrofotometrycznymi i densytometrycznymi.

6. Kofeina i kwas galusowy są związkami często oznaczanymi w materiałach roślinnych. Dla każdego typu próbki muszą być opracowane nowe warunki badań, ze względu na różny skład analitów. Prostota preparatyki próbki i rozdziału chromatograficznego stanowią zaletę prezentowanej pracy, wykorzystującej izolację analitów na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego. Możliwość naniesienia na jedną płytkę kilkunastu próbek naparów herbacianych nie tylko obniża koszty badań i skraca czas analizy oraz głównie pozwala na względne porównanie wyników rozdzielenia składników i ich oznaczenia.
7. Uwzględniając opracowane warunki badań jak i uzyskane wyniki dotyczące oznaczania kwasu salicylowego, kwasu galusowego, kwasu taninowego, (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny należy wnioskować o ogólnym znaczeniu i przydatności zaproponowanym metod i technik w analizie wyżej wymienionych substancji w różnych preparatach naturalnych i syntetycznych.

V

STRESZCZENIE

Od wielu lat w Zakładzie Chemii Analitycznej, Instytutu Chemii Uniwersytetu Śląskiego, pod kierunkiem pana profesora Franciszka Buhla są prowadzone systematyczne badania nad zastosowaniem sprzężonych reakcji redoks i kompleksowania do oznaczania substancji o znaczeniu biologicznym, farmaceutycznym i biomedycznym. Praca niniejsza podejmuje problem badawczy związany z analizą związków fenolowych i alkaloidów purynowych o właściwościach redukujących. W tym zakresie wykonane zostały następujące badania:

1. Opracowano spektrofotometryczne metody oznaczania kwasu salicylowego, kwasu galusowego, kwasu taninowego, (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny. Jako podstawę efektu analitycznego wykorzystano reakcje redoks i kompleksowania przebiegające w dwóch układach odczynników: Ce(IV) - arsenazo III i Fe(III) - 2,2'-bipirydyli. W wyniku reakcji jonów metalu na wyższym stopniu utlenienia z organicznym analitem o właściwościach redukujących powstaje bezbarwna, utleniona postać analitu oraz stechiometryczna ilość jonów metalu na niższym stopniu utlenienia, które są wiązane w związek kompleksowy przez odczynnik chromogeny.

W pierwszym układzie odczynników reagują wszystkie badane reduktory. Natomiast wykorzystując do redukcji kationów Fe^{3+} kwas salicylowy, kofeinę i teofilinę, stwierdzono że reakcja zachodzi powoli i w niewielkim stopniu, co uniemożliwiło zastosowanie pary odczynników Fe^{3+} i 2,2'-bipirydyli do opracowania nowych warunków spektrofotometrycznego oznaczania tych reduktorów.

Wykreślone krzywe spektrofotometryczne dla prób: kation metalu – reduktor – odczynnik kompleksujący, pozwoliły wnioskować o obecności w badanych roztworach związków kompleksowych, odpowiednio: $[\text{Ce}(\text{A})]^-$ oraz $[\text{Fe}(\text{2,2'-bip})_3]^{2+}$. Stąd też analitycznymi długościami fali światła były wartości charakterystyczne dla tych związków kompleksowych, tzn. $\lambda_{\text{max}} = 655 \text{ nm}$ oraz $\lambda_{\text{max}} = 522 \text{ nm}$.

W badaniach nad optymalizacją warunków oznaczania ustalono nadmiary reagentów potrzebnych do przeprowadzenia oznaczeń oraz warunki w jakich zachodzą reakcje redoks i kompleksowania. W temacie walidacji opracowanych metod wyznaczono zakresy liniowości oraz zbadano precyzję oznaczeń. Optymalne warunki oznaczania badanych reduktorów oraz parametry opracowanych metod zebrano w tabelach 95 i 96.

Tabela 95. Warunki oznaczania badanych reduktorów w układzie: Ce(IV) i arsenazo III; $\lambda_{\max} = 655 \text{ nm}$.

Substancja oznaczana	Ilość jonów Ce^{4+} [$\mu\text{g}/25\text{ml}$]	Warunki reakcji redoks			Ilość 0,05% roztworu arsenazo III [$\text{ml}/25 \text{ ml}$]	Zakres oznaczania [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	ε^s [$\text{l}/\text{mol} \cdot \text{cm}$]	Współczynnik korelacji	Parametry prostej
		pH	Czas [min]	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]					
Kwas salicylowy	70 – 140	2,8 – 3,5	30	22 ± 2	2,0 – 3,0	0,04 – 0,20	$5,66 \times 10^{-5}$	0,9994	$a = 2,8275$ $b = 0,0451$
Kwas galusowy	70 – 120	2,8 – 3,5	15	22 ± 2	2,0 – 2,5	0,04 – 0,20	$6,06 \times 10^{-5}$	0,9996	$a = 3,1150$ $b = 0,0406$
Kwas taninowy	100 – 120	2,7 – 3,3	15	22 ± 2	1,8 – 2,0	0,04 – 0,40	$3,84 \times 10^{-6}$	0,9995	$a = 2,2121$ $b = 0,0063$
(+)- Katechina	80 – 120	3,1 – 4,0	15	22 ± 2	1,5 – 3,0	0,12 – 0,48	$4,26 \times 10^{-5}$	0,9986	$a = 1,2052$ $b = 0,0603$
Kofeina	80 – 120	2,5 – 3,5	30	60 ± 2	1,5 – 2,5	0,12 – 0,72	$2,25 \times 10^{-5}$	0,9983	$a = 0,8539$ $b = 0,0915$
Teofilina	80 – 170	2,5 – 3,5	30	22 ± 2	2,0 – 2,5	0,16 – 0,64	$2,07 \times 10^{-5}$	0,9976	$a = 1,0476$ $b = 0,0196$

Tabela 96. Warunki oznaczania badanych reduktorów w układzie: Fe(III) i 2,2'-bipirydyli; $\lambda_{\max} = 522 \text{ nm}$.

Substancja oznaczana	Ilość jonów Fe^{3+} [$\mu\text{g}/25\text{ml}$]	Warunki reakcji redoks			Ilość 0,5% roztworu 2,2'-bipirydyli [$\text{ml}/25 \text{ ml}$]	Zakres oznaczania [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	ε^s [$\text{l}/\text{mol} \cdot \text{cm}$]	Współczynnik korelacji	Parametry prostej
		pH	Czas [min]	Temperatura [$^{\circ}\text{C}$]					
Kwas galusowy	150 - 250	1,9 - 2,5	30	22 ± 2	2,0 - 6,0	0,80 - 4,00	$4,23 \times 10^{-4}$	0,9994	$a = 0,2353$ $b = 0,0240$
Kwas taninowy	150 - 250	2,0 - 2,5	30	60 ± 2	4,0 - 7,0	0,40 - 3,20	$4,51 \times 10^{-5}$	0,9988	$a = 0,2587$ $b = 0,0088$
(+)- Katechina	100 - 250	2,0 - 2,5	30	22 ± 2	2,0 - 5,0	1,20 - 4,80	$3,72 \times 10^{-4}$	0,9962	$a = 0,1009$ $b = 0,0634$

2. Przeprowadzono badania chromatograficzne nad optymalizacją warunków rozdzielania kwasów: salicylowego, galusowego, taninowego; (+)-katechiny, kofeiny i teofiliny, na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego F₂₅₄. Stwierdzono, że najlepsze rezultaty rozdzielania wymienionych substancji uzyskuje się stosując fazę rozwijającą o składzie: chloroform – octan etylu – kwas mrówkowy w stosunku objętościowym 5:4:1. Jako wywoływacz stosowano światło UV ($\lambda = 254$ nm) oraz układ odczynników: Fe(III) – 2,2'-bipirydył. W optymalnych warunkach rozdzielania wyznaczono wartości R_F dla badanych substancji oraz indeksy wykrywalności.

Ustalono warunki izolacji kwasu taninowego z materiałów złożonych wykorzystując technikę chromatografowania dwukierunkowego prostopadłego.

Wyznaczono krzywe wzorcowe spektrofotometrycznego oznaczania kwasu galusowego i taninowego, po ich izolacji na cienkiej warstwie żelu krzemionkowego, wykorzystując jako podstawę efektu analitycznego sprzężone reakcje redoks i kompleksowania przebiegające w układzie: Fe (III) – 2,2'-bipirydył.

Prowadząc analizę chromatograficzną w ustalonych warunkach wyznaczono krzywą wzorcową planimetrycznego oznaczania (+)-katechiny. Wizualizację obrazu chromatograficznego uzyskano poprzez spryskanie płytek roztworami Fe(III) a następnie 2,2'-bipirydyłu.

Dokonano analizy spektrodensytometrycznej kwasu galusowego, kofeiny i (+)-katechiny na cienkiej warstwie.

3. Wykorzystując sprzężone reakcje redoks i kompleksowania przebiegające w układzie odczynników Ce(IV) i arsenazo III, opracowano metodę oznaczania kwasu taninowego po jego izolacji z materiałów złożonych na drodze chromatografii bibułowej. Badania nad optymalizacją warunków rozdzielania kwasów: salicylowego, galusowego i taninowego przeprowadzono stosując jako fazę stacjonarną bibułę Whatman nr 3. Najlepsze rezultaty rozdzielania uzyskano przy zastosowaniu fazy rozwijającej o składzie: izopropanol – izobutanol – woda, w stosunku objętościowym 3:2:4. Chromatogramy wywoływano poprzez spryskanie roztworami Fe(III) i 2,2'-bipirydyłu. W ustalonych warunkach wyznaczono krzywą wzorcową oraz dokonano oceny statystycznej wyników.

4. Zbadano możliwość spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny z wykorzystaniem pary odczynników Ce(IV) i arsenazo III, po izolacji analitu techniką SPE. Stosując

kolumnienki z fazą oktadecylową i wymywając osadzoną kofeinę chloroformem, wyznaczono krzywą wzorcową oznaczania kofeiny po jej ekstrakcji do fazy stałej.

5. W celu zbadania przydatności opracowanych procedur analitycznych oznaczono wybrane reduktory w preparatach farmaceutycznych i naturalnych:

- oznaczono teofilinę w preparacie *Theophyllum* metodą spektrofotometryczną wykorzystującą parę odczynników Ce(IV) i arsenazo III
- dokonano oceny zawartości garbników hydrolizujących w liściach jeżyny metodą spektrofotometryczną wykorzystującą parę odczynników Ce(IV) i arsenazo III, po izolacji kwasu taninowego na drodze chromatografii bibułowej
- oznaczono kwas galusowy po izolacji z preparatu „Acifungin forte” techniką TLC. W badaniach wykorzystano opracowaną metodę spektrofotometryczną, opartą na reakcjach redoks i kompleksowania przebiegających w układzie Fe(III) i 2,2'-bipirydyli oraz metodę densytometryczną
- dokonano ilościowej oceny zawartości (+)-katechiny w preparacie „Green tea” oraz w naparze z liści zielonej herbaty, wykorzystując opracowaną metodę densytometrycznego oznaczania analitu
- zastosowano opracowane metody: spektrofotometryczną i densytometryczną do oznaczania kwasu galusowego w naparach z różnych rodzajów herbat, po ich rozdzieleniu chromatograficznym techniką TLC
- opracowaną metodę densytometrycznego oznaczania kofeiny zastosowano do oceny zawartości analitu w naparach z różnych rodzajów herbaty, liści Yerba Mate oraz preparatów zawierających Guarinę
- opracowane warunki spektrofotometrycznego oznaczania kofeiny po jej izolacji techniką ekstrakcji do fazy stałej zastosowano do jej oznaczania w preparacie „Green tea” oraz preparatach zawierających Guarinę

VI
LITERATURA

1. Ball S., „Antyoksydanty w medycynie i zdrowiu człowieka”, Medyk, Warszawa. 2001
2. Lutomski J., Alkiewicz J., „Leki roślinne w profilaktyce i terapii”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1993
3. Jurkowska S., „Surowce kosmetyczne”, Dąbrowa Górnicza, 1999
4. Borkowski B., Miłkowska K., Herba Pol., 42(1), 55 (1996)
5. Nartowska J., Farm. Pol., 57(15), 741 (2001)
6. Królikowska M., „Analiza fitochemiczna roślinnych surowców leczniczych”, dla studentów farmacji, A.M. w Łodzi, 1988.
7. Borkowski B., Miłkowska K., Herba Pol., 43(3), 233 (1997)
8. Cieślińska A., Kamiński M. A., Lucińska A., „Ekstrakt z zielonej herbaty. Lecznicza siła polifenoli”, reMedium, Wrocław, 2002
9. Mothes K., Schütte H. R., Luckner M., „Biochemistry of alkaloids“, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 1985
10. Kozłowska – Wojciechowska M., Wiad. Zielarskie, 44(5), 8 (2002)
11. Kohlmünzer S., „Farmakognozja”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998
12. Jędrzejko K., Ruszkiewicz C. B., Farm. Pol., 59(12), 547 (2003)
13. Grochowski B., Wiad. Zielarskie, 33(9), 11 (1991)
14. Nartowska J., Wasek M., Białek A., Bogusiak A., Grabarska M., Ilczuk A., Izbecki Ł., Klemens J., Kopeć I., Kowalczyk P., Olędzki P., Skibińska J., Staszewska B., Strzelecka M., Sut E., Ścisłowska A., Tyrcha P., Wierzbińska A., Woźniak A., Żabiński J., Żemajtys M., Farm. Pol., 58(20), 965 (2002)
15. Klimek B., Farm. Pol., 59(5), 232 (2003)
16. Soczewiński E., Chem. Anal. (Warsaw), 48, 647 (2003)
17. Kealey D., Haines P. J., „Chemia analityczna – krótkie wykłady”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2005
18. Buhl F., Hachuła U., Chem. Anal., 26, 395 (1981)
19. Buhl F., Hachuła U., Chwistek M., J. Chromatogr., 219, 189 (1981)
20. Buhl F., Hachuła U., Chem. Anal., 29, 483 (1984)
21. Buhl F., Dul – Zarychta E., Chwistek M., Chem. Anal., 33, 819 (1988)
22. Buhl F., Hachuła U., Chem. Anal., 36, 27 (1991)
23. Buhl F., Szpikowska – Sroka B., Chem. Anal. (Warsaw), 46, 69 (2001)
24. Małyszko J., Gierulski D., Chem. Szk., 3, 125 (2002)
25. Gertig H., „Żywność a zdrowie”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1996
26. Sikorski Z.E., „Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności”, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1994
27. Nenitescu C.D., „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 1969
28. Brewster R.Q., McEwen W.E., „Podstawy chemii organicznej”, PWN, Warszawa, 1968
29. Nyrek S., „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 1976
30. Skwarski D., Seńczuk L., Kalinowska – Torz J., „Ćwiczenia z technologii chemicznej środków leczniczych”, Akademia Medyczna, Poznań, 1987

31. Bobrański B., „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 1973
32. Kalinowski K., „Farmakopea Polska IV”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1965
33. Cziczibabin A.E., „Podstawy chemii organicznej”, PWN, Warszawa, 1961
34. Kraczkowska A., Olędzka I., Rajzer D., Sell E., „Chemiczne metody identyfikacji środków leczniczych”, Akademia Medyczna, Gdańsk, 1997
35. Shirley D.A., „Chemia organiczna”, Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1964
36. Żiriakow W.G., „Chemia organiczna”, Wydawnictwo Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1976
37. Mastalerz P., „Chemia organiczna”, PWN, Warszawa, 1986
38. Zejca A., Gorczyca M., „Chemia leków”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1998
39. Pawelczyk E., „Chemia leków”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1978
40. Nikonorow M., Urbanek – Karłowska B., „Toksykologia żywności”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1987
41. Malinka W., „Zarys chemii kosmetycznej”, Volumed, Wrocław, 1999
42. Lamer – Zarawska E., Noculak – Palczewska A., „Kosmetyki naturalne. Przewodnik dla zielarzy, farmaceutów i zakładów kosmetycznych”, Wydawnictwo Astrum, Wrocław, 1994
43. Kubiak A., Schneider I., Tomkowiak J., „Ćwiczenia z chemii organicznej”, Akademia Rolnicza, Poznań, 1982
44. Seńczuk W., „Toksykologia”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 1999
45. Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K., „Dodatki funkcjonalne do żywności”, Agro & Food Technology, Katowice, 1993
46. Saha U., Baksi K., Analyst (London), 110(6), 739 (1985)
47. Qu Y., Talanta, 38(9), 1061 (1991)
48. Torrado S., Torrado S., Cadorniga R., J. Pharm. Biomed. Anal., 12(3), 383 (1994)
49. Stewart J. T., Lang J. R., Honigberg I. L., J. Liq. Chromatogr., 11(16), 3353 (1988)
50. Wei J., Yaouxue Tongbao, 20(11), 658 (1985); wg Anal. Abstr., AN: 4809E00097.
51. El-Yazbi F. A., Korany M. A., Abdel-Razak O., Elsayed M. A., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 69(4), 614 (1986)
52. Wahbi A. A. M., Al-Khamees H. A., Youssef A. M. A., Talanta, 36(11), 1117 (1989)
53. El-Yazbi F. A., Abdine H. H., Shaalan R. A., Korany E. A., Spectrosc. Lett., 31(7), 1403 (1998); wg Anal. Abstr., AN: 6106C00034
54. Vinokurov A., Podkovyrina T. A., Semakhina N. I., Egarova T. G., Zavod. Lab., 49(6), 18 (1983); wg Anal. Abstr., AN: 4601C00015
55. Wulandari L., Indrayanto G., J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, 16(6), 438 (2003)
56. Krzek J., Starek M., J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, 12(5), 356 (1999)
57. Li Z. G., Shi T. G., Song G. P., Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi, 22(10), 459 (1991); wg Anal. Abstr., AN: 5507G00110.
58. Taylor M. R., Westwood S.A., J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, 6(5), 415 (1993)
59. Chattaaraj S., Das A. K., Indian J. Chem. Sect. A, 32A (11), 1009 (1993); wg Anal. Abstr., AN: 5605G00200

60. Villari A., Micali N., Fresta M., Puglisi G., *Analyst (London)*, 119(7), 1561 (1994)
61. Cui H., Li S. F., Li F., Sun Y. G., Lin X. Q., *Anal. Bioanal. Chem.*, 372(4), 601 (2002)
62. Flaherty S., Wark S., Street G., Farley J. W., Brumley W. C., *Electrophoresis*, 23(14), 2327 (2002)
63. Croubels S., Maes A., Baert K., de Backer P., *Anal. Chim. Acta*, 529(1-2), 179 (2005)
64. Deng C. H., Zhang X. M., Zhang J., Qian J., Zhu W. M., *Chromatography*, 58 (3-4), 225 (2003)
65. Cui H., Zhou J., Xu F., Lai C. Z., Wan G. H., *Anal. Chim. Acta*, 511(2), 273 (2004)
66. Baxter G. J., Lawrence J. R., Graham A. B., Wiles D., Paterson J. R., *Ann. Clin. Biochem.*, 39(1), 50 (2002)
67. Vree T. B., Van Ewijk-Beneken Kolmer E. W. J., Verwey-Van Wissen C. P. W. G. M., Hekster Y. A., *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 652(2), 161 (1994)
68. Aboul-Soud M. A. M., Cook K., Loake G. J., *Chromatographia*, 59(1-2), 129 (2004)
69. Lee K., Chung Y., Oh S., *Anal. Sci. Technol.*, 12(3), 203 (1999); *wg Anal. Abstr.*, AN: 6112G00005
70. Zeng H., Sun G. X., Cen L. J., *Sepu*, 19(4), 370 (2001); *wg Anal. Abstr.*, AN: 6411G10172
71. Neumayr M., Friedrich O., Sontag G., Pittner F., *Anal. Chim. Acta*, 273(1-2), 469 (1993)
72. Torriero A. A. J., Luco J. M., Sereno L., Raba J., *Talanta*, 62(2), 247 (2004)
73. Fieser L.F., Fieser M., „*Chemia organiczna*”, PWN, Warszawa, 1958.
74. Borkowski B., Milkowska K., *Herba Pol.*, 44(2), 136 (1998)
75. Prasad U. V., Rao K. E., Sastry C. S. P., *Food Chem.*, 17(3), 209 (1985)
76. Prasad U. V., Divakar T. E., Hariprasad K., Sastry, C. S. P., *Food Chem.*, 25(2), 159 (1987)
77. Tomas C., Celeste M., Clandera A., Gomez E., Manuela-Estela J., Cerda V., *Food Chem.*, 47(2), 201 (1993)
78. Rawat J. P., Singh Muktaawat K. P., *Microchem. J.*, 30, 289 (1984)
79. Sastry C. S. P., Rao K. E., Prasad U. V., *Talanta*, 29, 917 (1982)
80. Markopoulou C. K., Koundourellis J. E., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 33(5), 1163 (2003)
81. Slaveska-Raicki R., Rafajlovska V., Rizova V., Spirevska I., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 16(5), 396 (2003)
82. Sawicka U., Cisowski W., Matysik G., Kowalczyk A., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 15(6), 442 (2002)
83. Mao X. J., Xiong H. L., Xu Q., Lin R. C., *Yaowu Fenxi Zazhi*, 21(5), 364 (2001); *wg Anal. Abstr.*, AN: 6420G10224
84. Cauhan S. K., Singh B., Agrawal S., *J. AOAC Int.*, 83(6), 1480 (2000)
85. Lalla J. K., Hamrapurkar P. D., Mamania H. M., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 13(5), 390 (2000)
86. Li A. Q., Cai K. H., Li L., *Fenxi Ceshi Xuebao*, 18(1), 64 (1999); *wg Anal. Abstr.*, AN: 6106G00152
87. Barthomeuf C., Regerat F., Combe – Chevaleyte S., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 6(3), 245 (1993)
88. Shi R., Schwedt G., *Dtsch. Lebensm. Rundsch.*, 91(1), 14 (1995)

89. Dmitrienko S. G., Medvedeva O. M., Ivanov A. A., Shpigun O. A., Zolotov Y. A., *Anal. Chim. Acta*, 469(2), 295 (2002)
90. Wang X. X., Wang J. W., *Fenxi Kexue Xuebao*, 21(1), 72, (2005), *wg Anal. Abstr. (On line)*
91. Lin X. Q., Li F., Pang Y. Q., Cui H. *Anal. Bioanal. Chem.*, 378(8), 2028 (2004)
92. Vanhoenacker G., de Villiers A., Lazou K., de Keukeleire D., Sandra P., *Chromatographia*, 54(5-6), 309 (2001)
93. Chu T. Y., Chang C. H., Liao Y. C., Chen Y. C., *Talanta*, 54(6), 1163 (2001)
94. Sheng Y. X., Li L., Wang Q., Guo H. Z., Guo D. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 37(4), 805 (2005)
95. Lopez M., Martinez F., del Valle C., Orte C., Miro M., *J. Chromatogr. A*, 922(1-2), 359 (2001)
96. Lei Z., Jervis J., Helm R. F., *J. Agric. Food Chem.*, 49(3), 1165 (2001)
97. Long H., Zhu Y. X., Coury L. A., Duda C. T., Kissinger C. B., Kissinger P. T., *LC. GC. Eur.*, 14(6), 323 (2001); *wg Anal. Abstr.*, AN: 6402H10192
98. Chen H., Zuo Y. G., Deng Y. W., *J. Chromatogr. A*, 913(1-2), 387 (2001)
99. Shahrzad S., Bitsch I., *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 705(1), 87 (1998)
100. Arce L., Rios A., Valcárcel M., *J. Chromatogr. A*, 827, 113 (1998)
101. Lin J. K., Lin Ch. L., Liang Y. Ch., Lin-Shiau S. Y., Juan I. M., *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3635 (1998)
102. Khokhar S., Magnusdottir S. G. M., *J. Agric. Food Chem.*, 50, 565 (2002)
103. Zuo Y., Chen H., Deng Y., *Talanta*, 57, 307 (2002)
104. Cabrera C., Giménez R., López M. C., *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4427 (2003)
105. Aucamp J. P., Hara Y., Apostolides Z., *J. Chromatogr. A*, 876, 235 (2000)
106. Zhang J. C., Bai Y. W., Dang H. G., *Fenxi Kexue Xuebao*, 21(1), 69 (2005), *wg Anal. Abstr. (On line)*
107. Kilmartin P. A., Zou H. L., Waterhouse A. L., *J. Agric. Food Chem.*, 49(4), 1957 (2001)
108. Jimenez P. R., Silva M., Perez B. D., *Anal. Chim. Acta*, 334(3), 323 (1996)
109. Wilska – Jeszka J., „Antyoksydanty w żywności”, Łódź, 1999
110. Strzelecka H., Kamińska J., Kowalski J., Walewska E., „Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych”, PZWL, Warszawa, 1982
111. Ostrowska J., Stankiewicz A., Skszydłowska E., *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2, 131 (2001)
112. Singh H. P., Ravindranath S. D., Singh C., *J. Agric. Food Chem.*, 47, 1041, (1999)
113. Kivits G. A. A., van der Sman F. J. P., Tijburg L. B. M., *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 48, 387 (1997)
114. Krzek J., Janeczko Z., *Chem. Anal.*, 30, 465 (1985)
115. Garcia – Parrilla M. C., Heredia F. J., Troncoso A. M., Gonzalez A. G., *Talanta*, 44(1), 119 (1997)
116. Sane R. T., Malkar V. B., Nayak V. G., Sapre D. S., *Indian Drugs*, 22(1), 20 (1984)
117. Vanhaelen M., Vanhaelen – Fastré R., Nibes P., Jans M., *Chromatography*, 16, 678 (1984)
118. Janeczko Z., Sendra J., Krzek J., *Herba Pol.* 33(2), 105 (1987)
119. Fecka I., Cisowski W., Luczkiewicz M., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 14(6), 405 (2001)
120. Nowak R., Hawryl M., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 18(103) 217 (2005)
121. Zhu M., Xiao P. G., *Phytother. Res.*, 5, 239 (1991)

122. Desai D. S., Laddha K. S., *Indian Drugs.*, 39(2), 91 (2002)
123. Lu Y. J., Chen H. C., Lu J., Chen X. D., *Fenxi. Xuaxue*, 33(6), 835 (2005), *wg Anal. Abstr.* (On line)
124. Lee B. L., Ong C. N., *J. Chromatogr. A*, 881, 439 (2000)
125. Zeeb D. J., Nelson B. C., Dalluge J. J., Albert K., *Anal. Chem.*, 72, 5020 (2000)
126. Luthria D. L., Jones A. D., Donovan J. L., Waterhouse A. L., *J. High Resolut. Chromatogr.*, 20(11), 621 (1997)
127. Rodriguez – Delgado M. A., Malovana S., Perez J. P., Borgez T., Garcia Montelongo F. J., *J. Chromatogr. A*, 912(2), 249 (2001)
128. Subagio A., Sari P., Morita N., *Phytochem. Anal.*, 12(4), 271 (2001)
129. Ho Y., Lee Y. L., Hsu K. Y., *J. Chromatogr. B*, 665(2), 383 (1995)
130. Pineiro Z., Palma M., Barroso C. G., *J. Chromatogr. A*, 1026(1-2), 19 (2004)
131. Wu J., Wang H., Fu L., Chen Z. P., Jiang J. H., Shen G. L., Yu R. Q., *Talanta*, 65(2), 511 (2005)
132. Castaignede V., Durliat H., Comtat M., *Anal. Lett*, 36(9), 1707 (2003)
133. Borkowski B. (red), „Chromatografia cienkowarstwowa w analizie farmaceutycznej”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1973
134. Borkowski B., „Zarys farmakognozji”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1974
135. Borkowski B., Milkowska K., *Herba Pol.*, 43(1), 73 (1997)
136. Ożarowski A., „Ziołolecznictwo. Poradnik dla lekarzy”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1983
137. Oszmiański J., Lamer – Zarawska E., *Wiad. Zielarskie*, 35(12), 16 (1993)
138. Borkowski B., Milkowska K., *Herba Pol.*, 41(4), 217 (1995)
139. Lamer – Zarawska E., Olechnowicz – Stępień W., *Wiad. Zielarskie*, 34(8), 15 (1992)
140. Ożarowski A., Jaroniewski W., „Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie”, Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych, Warszawa, 1989
141. Dębska W., „Metody oceny jakości leku roślinnego”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1983
142. Sun, Y. H.; Fu, L.; Gao, J. G., *Fenxi Shiyanshi*, 23 (8), 34, (2004), *wg Anal. Abstr.* (On line)
143. Jia L. P., Zhang A. M., Niu X. L., *Fenxi Kexue Xuebao*, 20(3), 290 (2004), *wg Anal. Abstr.* (On line)
144. Alvarez del Pino M. C., Hervas G., Mantecon A. R., Javier Giraldez F., Frutos P., *J. Sci. Food Agric.*, 85(4), 583 (2005)
145. Celeste M., Tomas C., Cladera A., Estela J. M., Cerda V., *Anal. Chim. Acta*, 269(1), 21 (1992)
146. Amin A. S., *Mikrochim. Acta*, 126(1-2), 105 (1997)
147. Sastry C. S. P., Rao K. E., Vijaya D., Rao A. R., Rao M. V., *J. Food. Sci. Technol.*, 25(3), 156 (1988)
148. Makkar H. P. S., Dawra R. K., Singh B., *Anal. Biochem.*, 166(2), 435 (1987)
149. Sharma O. P., Bhat T. K., Singh B., *J. Chromatogr. A*, 822(1), 167 (1998)

150. Kemertelidze E. P., Yavich P. A., Sarabunovich A. G., Churadze L. I., Khechumashvili M. I., Elerdashvili G. E., Dolidze D. D., *Farmatsiya (Moscow)*, 33(4), 34 (1984); *wg Anal. Abstr.*, AN: 4703E00109
151. Yebra M. C., Gallego M., Valcarcel M., *Anal. Chim. Acta*, 308(1-3), 357 (1995)
152. Gomez-Taylor Corominas B., Garcia Mateo J. V., Lahuerta Zamora L., Martinez Calatayud J., *Talanta*, 58(6), 1243 (2002)
153. Priego-Capote F., Ruiz-Jimenez J., Luque de Castro M. D., *J. Chromatogr. A*, 1045(1-2), 239 (2004)
154. Zhu J., Ng J., Flippich L. H., *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, 115(1 (J. Chromatogr., 577)), 77 (1992)
155. Belleau G., Dadic M., *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 37(4), 175 (1979); *wg Anal. Abstr.*, AN: 4002F00065
156. Nakamura Y., Tsuji S., Tonogai Y., *J. Agric. Food Chem.*, 51(1), 331 (2003)
157. Zhao C., Song J. F., Zhang J. C., *Talanta*, 59(1), 19 (2003)
158. Zhao Y. B., Wen M. L., Liu S. Q., Liu Z. H., Zhang W. D., Yao Y., Wang C. Y., *Microchem. J.*, 60(3), 201 (1998)
159. Dembińska – Migas W., Krauze M., *Herba Pol.*, 35(1), 9 (1989)
160. Jerzmanowska Z., „Substancje roślinne – metody wyodrębniania”, PWN, Warszawa, 1967
161. Krzaczek T., *Herba Pol.*, 44(4), 292 (1998)
162. Rumińska A., „Rośliny lecznicze. Podstawy biologii i agrotechniki”, PWN, Warszawa, 1981
163. Kączkowski J., „Biochemia roślin”, PWN, Warszawa, 1984
164. Robinson T., „The biochemistry of alkaloids”, Springer – Verlag, Berlin – Heidelberg – New York, 1981
165. Bojarski J., „Chemia organiczna”, Wyd. U. J., Kraków, 1999
166. Morrison R. T., Boyd R. N., „Chemia organiczna”, Wydawnictwo naukowe PWN, Warszawa, 1996
167. Danysz A., Gryglewski R., „Farmakologia – podręcznik dla studentów medycyny”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1982
168. Procyk A., *Wiad. Zielarskie*, 35(8/9), 13 (1993)
169. Rutkowska H., *Biul. Kosmetol.*, 4, 278 (2002)
170. Kołodziejczyk A., „Naturalne związki organiczne”, PWN, Warszawa, 2003
171. Kolanowski W., *Żywn. Żyw. Zdr.*, 8(2), 200 (1999)
172. Lin J., Xie A., Fu Q., *Yaoxue Tangbao.*, 21(2), 81 (1986); *wg Anal. Abstr.*, AN: 4811E00016
173. Zhang Y. Q., Hu S. R., Li Q. S., *Zhongguo Yiyao Gongye Zazhi*, 22(11), 506 (1991); *wg Anal. Abstr.*, AN: 5507G00004
174. Zhang Q., Wu L., Liu A., *Yaowu Fenxi Zazhi*, 11(3), 177 (1991); *wg Anal. Abstr.*, AN: 5411G00115
175. Shapovalova V. O., *Farmatsevtichnii Zh. (Kiev)*, 3, 87 (1996); *wg Anal. Abstr.*, AN: 5905G00007

176. Zhao C., Tong L., Zhou L., Hu T., Shenyang Yaoxueyuan Xuebao, 10(3), 195 (1993); wg Anal. Abstr., AN: 5606G00005
177. Cepeda A., Paseiro P., Simal J., Rodriguez J. L., An. Bromatol., 42(2), 241 (1991); wg Anal. Abstr., AN: 5408H00248
178. Lau O., Luk S., Cheng O., Chiu T. P. Y., Analyst (London), 117(4), 777 (1992)
179. Sullivan C., Sherma J., J. AOAC Int., 88(5), 1537 (2005)
180. Ford M. J., Deibel M. A., Tomkins B. A., van Berkel G. J., Anal. Chem. 77(14), 4385 (2005)
181. Prosek M., Golc-Wondra A., Vovk I., Andresek S., J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, 13(6), 452 (2000)
182. Feng Y. L., Wang P. L., Zhao H. W., Xia C. Z., Zhu H. W., Fenxi Ceshi Xuebao, 18(1), 46 (1999); wg Anal Abstr., AN: 6106G00142
183. Athayde M. L., Coelho G. C., Schenkel E. P., Phytochemistry, 55(7), 853 (2000)
184. Ruddy D., Sherma J., Acta Chromatogr., (12), 143 (2002)
185. El Sadek M., El Shanawany A., Aboul Khier A., Ruecker G., Analyst (London), 115(9), 1181 (1990)
186. Mincsovcics M., Garami M., Kecskes L., Tapa B., Vegh Z., Katay G., Tyihak E., J. AOAC Int., 82(3), 587 (1999)
187. Ohnsmann J., Quintas G., Garrigues S., de la Guardia M., Anal. Bioanal. Chem., 374(3), 561 (2002)
188. Daghbouche Y., Garrigues S., Vidal M. T., de la Guardia M., Anal. Chem., 69(6), 1086 (1997)
189. Katayama M., Taniguchi H., Talanta, 36(12), 1171 (1989)
190. Aboul-Enein H. Y., Bakr S. A., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 20(1), 47 (1997)
191. Hurst W. J., Martin R. A., Analusis, 21(9), 389 (1993)
192. Hawthorne S. B., Miller D. J., Pawliszyn J., Arthur C. L., J. Chromatogr., 603(1-2), 185 (1992)
193. Kang J. H., Kondo F., Food Addit. Contam., 19(9), 886 (2002)
194. Rojo de Camargo M. C., Teledol M. C. F., J. Sci. Food Agric., 79(13), 1861 (1999)
195. Dobrocky P., Bennett P. N., Notarianni L. J., J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 652(1), 104 (1994)
196. De Roche G. M., Portz B. S., Rector W. G., Everson G. T., J. Liq. Chromatogr., 13(17), 3493 (1990)
197. Martin M. J., Pablos F., Gonzalez A. G., Talanta, 49(2), 453 (1999)
198. Zhao Y., Lunte C. E., J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 688(2), 265 (1997)
199. Lima J. L. F. C., Delerue-Matos C., Nouws H. P. A., Vaz M. C. V. F., Food Addit. Contam., 15(3), 265 (1998)
200. Ly S. Y., Jung Y. S., Kim M. H., Han I. K., Jung W. W., Kim H. S., Microchim. Acta, 146(3-4), 207 (2004)
201. Abdennabi A. M. S., Sultan S. M., Electroanalysis (N. Y.), 5(8), 709 (1993)
202. Karawya M. S., Diab A. M., Swelem N. Z., Anal.Lett., 17(B1), 77 (1984)
203. Fujita Y., Mori I., Fujita K., Nakahashi Y., Tanaka T., Chem. Pharm. Bull, 35(12), 5004 (1987); wg Anal. Abstr., AN: 5009E00004

204. Abroskin A. G., Belyaeva T. V., Ivanova E. K., Mayakova S. G., Proskurnin M. A., Zh. Anal. Khim., 46(6), 1199 (1991); wg Anal. Abstr., AN: 5406G00167
205. Nowakowska Z., Farm. Pol., 43(3), 141 (1987)
206. El-Shabouri S. R., Hussein S. A., Emara S. E., Talanta, 36(12), 1288 (1989)
207. Arnoudse P. B., Pardue H. L., J. Autom. Chem., 8(2), 75 (1986); wg Anal. Abstr., AN: 4807E00008
208. Abuirjeie M. A., El-Din M. S., Mahmoud I. I., J. Liq. Chromatogr., 15(1), 101 (1992); wg Anal. Abstr., AN: 5409H00185
209. Jamshidi A., Adjvadi M., Shahmiri S., Masoumi A., Husain S. W., Mahmoodian M., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 22(10), 1579 (1999); wg Anal. Abstr., AN: 6111G00108
210. Essig S., Kovar K. A., J. Planar Chromatogr. Mod. TLC, 12(1), 63 (1999)
211. Salvadori M. C., Rieser E. M., Neto L. M. R., Nascimento E. S., Analyst (London), 119(12), 2701 (1994)
212. Shinde V. M., Tendolkar N. M., Desai B. S., Anal. Lett., 28(1), 45 (1995)
213. Salama O. M., Walash M. I., Anal. Lett., 22(4), 827 (1989)
214. Pokrajac M., Agbaba D., Varagic V. M., Glisovic L., Acta. Pharm. Jugosl., 36(4), 445 (1986); wg Anal. Abstr., AN: 4910D00066
215. Li B., Tong L., Zou B., Yaoxue. Xuebao., 20(5), 398 (1985); wg Anal. Abstr., AN: 4805D00071
216. Jourquin G., Kauffmann J. M., J. Pharm. Biomed. Anal., 18(4-5), 585 (1998)
217. Malliaros D. P., Wong S. S., Wu A. H. B., Campbell J., Leonard H., Houser S., Berg M., Gornet T., Brown C., Feng Y. J., Ther. Drug Monit., 19(2), 224 (1997); wg Anal. Abstr., AN: 5911G00149
218. Feng C. H., Wu H. L., Lin S. J., Chen S. H., J. Liq. Chromatogr. Related Technol., 26(12), 1913 (2003)
219. Kanazawa H., Atsumi R., Matsushima Y., Kizu J., J. Chromatogr. A, 870(1-2), 87 (2000)
220. Culae M., Palibroda N., Chereches-Panta P., Nanulescu M., Chromatography, 53(Suppl.), S387 (2001)
221. Umemura T., Kitaguchi R., Inagaki K., Haraguchi H., Analyst (Cambridge, U. K.), 123(8), 1767 (1998)
222. Rasmussen B. B., Brosen K., J. Chromatogr. B. Biomed. Appl., 676(1), 169 (1996)
223. Papadoyannis I. N., Samanidou V. F., Tsoukali, H., Epivatianou F., Anal. Lett., 26(10), 2127 (1993)
224. Mwalupindi A. G., Warner I. M., Anal. Chim. Acta, 306(1), 49 (1995)
225. McNeil C. J., Cooper J. M., Spoors J. A., Biosens. Bioelectron., 7(5), 375 (1992); wg Anal. Abstr., AN: 5508A00099
226. Yang G. J., Wang K., Xu J. J., Chen H. Y., Anal. Lett., 37(4), 629 (2004)
227. Huang W. S., Lin S. J., Wu H. L., Chen S. H., J. Chromatogr. B, 795(2), 329 (2003)
228. Tsai T. H., Liu M. C., J. Chromatogr. A, 1032(12), 97 (2004)
229. Tutakowska I., Małeckie P., „Herbata – napój dla ciała i ducha”, Media Publication, 2002

230. Urbanik M., *Farm. Pol.*, 56(24), 1153 (2000)
231. Robak J., Zachwieja Z., *Bromat.Chem.Toksykol.*, 32(3), 215 (1999)
232. Świdorski J., Drabarek S., Szuchnik A., „*Chemia organiczna*”, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa, 1970
233. Savvin S.B., „*Organičeskie reagenty grupy arsenazo III*”, Atomizdat, Moskwa, (1971)
234. Petzold W., „*Die Cerimetrie*”, Verlag Chemie, 1955
235. Sillen L.G., „*Stability constants of metal – ion complexes*”, The chemical society, London, 1971
236. Inczedy J., „*Równowagi kompleksowe w chemii analitycznej*”, PWN, Warszawa, 1979
237. Marczenko Z., „*Spektrofotometryczne oznaczanie pierwiastków*”, PWN, Warszawa, 1979
238. Jackson H., Bailey E.E., Williams L.H., *Metallurgia*, 51, 309 (1955)
239. Savvin S.B., *Ž.anal.chim.*, 17, 785 (1962)
240. Savvin S.B., *Zaw.Łab.*, 29, 131 (1963)
241. Buděšinský B., *Collectoin Czechoslov.Chem.Commus.*, 28, 2902 (1963)
242. Evseeva T.I., Čevstvenkova E.P., *Ž.anal.chim.*, 22, 34 (1967)
243. Barissova R., Mitropolitska E., *Talanta*, 26, 543 (1979)
244. Budanova L.M., Pinaeva S.N., *Ž.anal.chim.*, 20, 320 (1965)
245. Lukjanov V.F., Moščanskaja N.G., *Ž.anal.chim.*, 19, 1264 (1964)
246. Hachuła U., Winkler W., Anikiel S., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 15(4), 306 (2002)
247. Kubaszewski E., Kurzawa Z., *Chem. Anal.*, 30, 609, (1985)
248. Belcher R., Brazier I.N., Stephen W.I., *Talanta*, 12, 778, (1965)
249. Irwing U.M., Mellor D.P., *J. Chem. Soc.*, 5222, (1962)
250. Anderegg G., *Helv. Chim. Acta.*, 46, 2397 (1963)
251. Hachuła U., Anikiel S., Polowniak M., *J. Planar Chromatogr. Mod. TLC*, 17(1), 51 (2004)
252. Witkiewicz Z., „*Podstawy chromatografii*”, Wydawnictwa Naukowo – Techniczne, Warszawa, 1995.
253. Śliwiok J., „*Barwniki fuksynowe jako nowe odczynniki wywołujące substancje organiczne w chromatografii cienkowarstwowej*”, *Zeszyty Nauk., Pol. Śl.*, 290, *Chemia* 54, Gliwice, 1970.
254. Leont'eva L.B., Tselinskii I.V., Biochinova E.S., Krauklish I.V., *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim.Khim.Tekhnol.*, 34(10), 38 (1991).
255. Masłowska J., Kucharska U., *Chem.Anal. (Warsaw)*, 33(4), 567 (1988).
256. R. Kocjan (red), „*Chemia analityczna – podręcznik dla studentów*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, 2002.
257. Hachuła U., „*Sprzężone reakcje redokso – kompleksowe w spektrofotometrycznej i chromatograficznej analizie wybranych reduktorów z grupy fenylopirazolinonu-5*”, praca doktorska, Katowice, 1984