

УДК 535.37;546.65;543.8

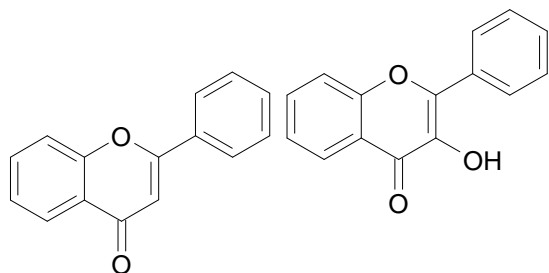
¹Бельтюкова С.В., д.х.н., проф.; ²Теслюк О.І., к.х.н., доц., ст.н.с.;
¹Лівенцова О.О., к.х.н., доц.

ВПЛИВ БИЧАЧОГО СИРОВАТКОВОГО АЛЬБУМІНУ НА ЛЮМІНЕСЦЕНТНІ ВЛАСТИВОСТІ ФЛАВОНОЇДІВ

¹Одеська національна академія харчових технологій, кафедра харчової хімії та експертизи, 65039, м.Одеса, Канатна, 112; e-mail: liventsova.helen@gmail.com

²Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського НАН України, відділ хімії функціональних неорганічних матеріалів, 65080, м. Одеса, Люстдорфська дорога, 86; e-mail: olgateslyuk@rambler.ru

Флавоноїди (оксифлавоїди) належать до широкого класу флавоноїдних сполук – ароматичних фенолів, що є похідними бензо-γ-пірону з α, β-ненасиченою кетонною структурою, в яких атом водню в α-положенні заміщений фенольним залишком (I), в β-положенні гідроксильною групою (II) [1, 2]:



I

II

В спектрах поглинання етанольних розчинів кверцетину, моріна і рутину є смуги поглинання з високими значеннями молярних коефіцієнтів поглинання, що вказує на ефективне поглинання ними світлової енергії. Кверцетин і морін в етанольних розчинах проявляють власну інтенсивну люмінесценцію ($\lambda_{\text{випр}} = 402$ нм для кверцетину, а також 411 нм і 501 нм для моріну). В спектрі люмінесценції рутину, в 3-оксигрупі якого атом водню заміщений на рамнозу, спостерігається дуже слабка флуоресценція з максимумом в синій області ($\lambda_{\text{випр}} = 420$ нм) [3]. Поліоксифлавоїди мають кілька циклоутворюючих угруповань: 3,4-ортооксикарбонільну, 5,4-періоксикарбонільну і ортодіфенольну, і утворюють з багатьма

іонами металів хелати з співвідношенням Me: R = 1: 1 або 1: 2.

Інтенсивність люмінесценції ($I_{\text{люм}}$) хелатів вивчена нами раніше [4]. При цьому розглянуто вплив поверхнево-активних речовин різної природи (ПАР) та донорно-активних речовин (ДАР) на інтенсивність люмінесценції комплексів Y (III) з кверцетином і моріном та Sc (III) з рутиним. Знайдено, що ПАР в переважній більшості випадків зменшують інтенсивність люмінесценції, за винятком додецилсульфату натрію, який викликає незначне збільшення аналітичного сигналу. Встановлено, що $I_{\text{люм}}$ сорбатів комплексів моріну і рутину збільшується в 2-3 рази в присутності бичачого сироваткового альбуміну (БСА).

В даній роботі вивчено вплив бичачого сироваткового альбуміну на інтенсивність люмінесценції сорбатів комплексів флавоноїдів в умовах отримання оптимального аналітичного сигналу.

Сироватковий альбумін [5, 6] відноситься до глобулярних білків, являє собою сополімер, до складу якого входять 585 амінокислот, що містять неполярні і полярні групи, заряд яких залежить від кислотності середовища. Можна припустити, що так само, як і в разі варфарина [7] солубілізація моріну і рутину в мікрофазу глобулярного білка, зумовлена електростатичними і гідрофобними взаємодіями, екранує флуорофор від гасіння молекулами води і знижує безвипромінювальні втрати енергії.

Матеріали й методи

У роботі використовували стандартні розчини хлоридів ітрію і скандію (1×10^{-2} моль/л, 1 мг/мл), які готували з відповідних оксидів марки «ОСЧ», шляхом розчинення їх в хлористоводневій кислоті (1:1), з подальшим видаленням її надлишку випаровуванням. Концентрацію лантанідів (III) контролювали комплексонометричним титруванням розчином комплексона III з індикатором арсеназо I в присутності уротропіну. Стандартні розчини кверцетину, моріну і рутину («Sigma-Aldrich») (1×10^{-2} моль/л) готували розчиненням точних наважок в етанолі. Розчин бичачого сироваткового альбуміну (10 мг/мл) («Sigma-Aldrich») готували розчиненням в дистильованій воді. Люмінесценцію сорбатів комплексів Y (III) і Sc (III) з поліфенольними сполуками реєстрували в області довжини хвиль – 400-600 нм за допомогою спектрометра ІСП-51 з фотоелектричної приставкою ФЕП-1 (люмінесценцію збуджували світлом ртутно-кварцової лампи СВД-120 А зі світлофільтром УФС-2, що виділяє випромінювання з $\lambda_{\text{макс}} = 365$ нм), а також спектрометра Cary Eclipse "Varian" (Австралія) з ксеноновим лампою 150-W, спектрофлуориметра "Fluorolog FL 3-22", "Horiba Jobin Yvon" (безозонова Хе лампа 450-W). Спектри збудження і люмінесценції були скориговані з урахуванням розподілу випромінювання ксенонової лампи і чутливості ФЕУ, для отримання спектрів збудження твердих зразків використовували спектрометр СДЛ-2. Джерелом збудження люмінесценції слугувала ксенонова лампа. рН розчинів вимірювали за допомогою іономіра універсального ЕВ-74, калібрування якого проводили за допомогою стандартних буферних розчинів.

Експериментальна частина

Встановлено, що використання сорбентів як твердої матриці викликає значне збільшення $I_{\text{люм}}$ комплексів Y (III) і Sc (III) з флавоноїдами ($\sim 20 \div 100$ разів). Була вивчена $I_{\text{люм}}$ комплексів на сорбентах різної природи: цеолітах, силікагелі, ксерогелі, пінополіуретані, фосфаті алюмінію, і сорбентах декстранового типу – сефадексі.

Найбільше значення $I_{\text{люм}}$ комплексу Y (III) з кверцетином виявляється на фосфаті алюмінію і силікагелі 100/160, для комплексів Y (III) з рутиним – на сефадексі G-75 і G-150. Аналогічні результати отримані і для комплексу Sc (III) з моріном. Люмінесценція не виявляється на пінополіуретані і ледь помітне випромінювання спостерігається на цеолітах і ксерогелі. Максимальна $I_{\text{люм}}$ сорбату кверцетину на фосфаті алюмінію і силікагелі спостерігається при сорбції з розчинів з рН 4,5. Оптимальними для рутину і моріну є рН 6,4 і 4,1 відповідно.

Результати та їх обговорення

Відомо [5-7], що БСА має незначну власну люмінесценцію (рис. 1) ($\lambda_{\text{збуд}} = 298$ нм, $\lambda_{\text{люм}} = 340$ нм), зумовлену присутністю в його молекулі амінокислоти триптофану. Можливість міжмолекулярного перенесення енергії в системі БСА – рутин (морін) обумовлена перекриванням спектрів люмінесценції БСА зі спектрами поглинання рутину і моріну (рис. 1).

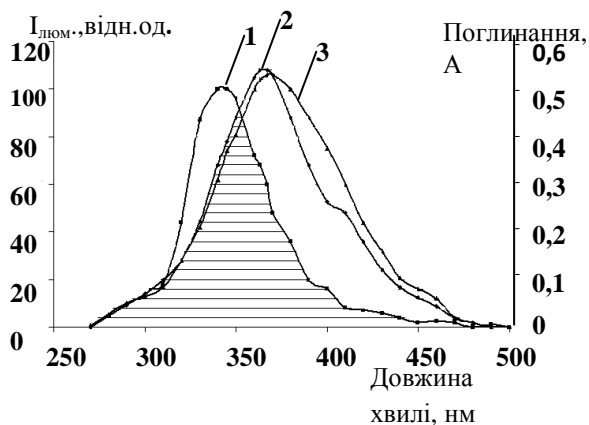


Рис. 1. Спектри люмінесценції (БСА) ($\lambda_{\text{збуд}} = 298$ нм) (1), поглинання рутину (2) ($\lambda_{\text{макс}} = 363$ нм), і моріну (3) ($\lambda_{\text{макс}} = 367$ нм); $C_{\text{рутин}} = C_{\text{морін}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л.

Для підтвердження цього факту вивчені люмінесцентні властивості БСА в присутності рутину (моріну) різної концентрації при збудженні одного компонента – сироваткового альбуміну. В умовах збудження БСА в спектрі його люмінесценції при додаванні рутину (рис. 2, а) або моріну (рис. 2, б) з'являються нові,

характерні для флавоноїдів смуги сенсibilізованої люмінесценції з $\lambda_{\text{люм}} = 453$ нм (рутин) та $\lambda_{\text{люм}} = 462$ нм (морін).

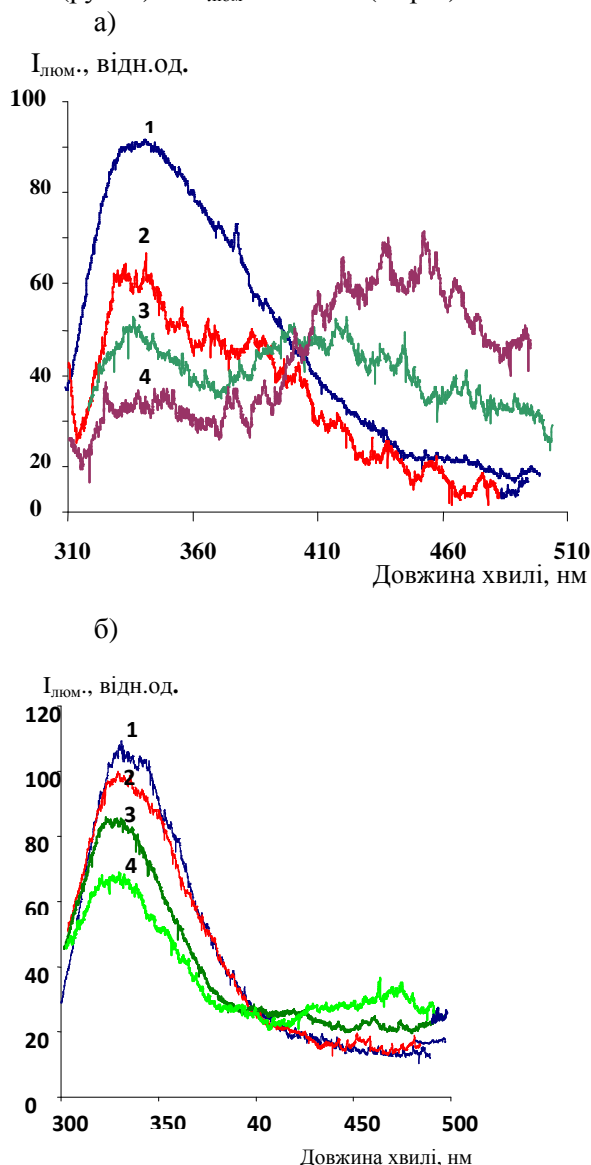


Рис. 2. Спектри люмінесценції системи БСА – рутин (а) та БСА-морін (б) в умовах збудження БСА ($\lambda_{\text{збуд}} = 298$ нм); $C_{\text{БСА}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, рН 6,4; $C_{\text{рутин}} = C_{\text{морін}}$, моль/л: $1 \cdot 10^{-6}$ (1), $5 \cdot 10^{-6}$ (2), $1 \cdot 10^{-5}$ (3), $2 \cdot 10^{-5}$ (4).

При збільшенні концентрації рутину (моріну) спостерігається зростання інтенсивності люмінесценції акцептора і одночасне зменшення люмінесценції донора БСА, що свідчить про перенесення енергії збудження від донора БСА до акцептора – рутину (моріну). На підставі цих результатів можна припустити, що збільшення інтенсивності люмінесценції рутину (моріну)

в присутності БСА відбувається в результаті міжмолекулярного перенесення енергії в системі БСА – рутин (морін).

Аналіз спектрів збудження рутину (рис. 3) показує, що в присутності альбуміну спектр збудження зростає за інтенсивністю і короткохвильова смуга зміщується bathochromно на 20 нм і має максимум при 265 нм. Значно зростає при цьому і $I_{\text{люм.}} \text{ комплексу Y(III) – рутин.}$

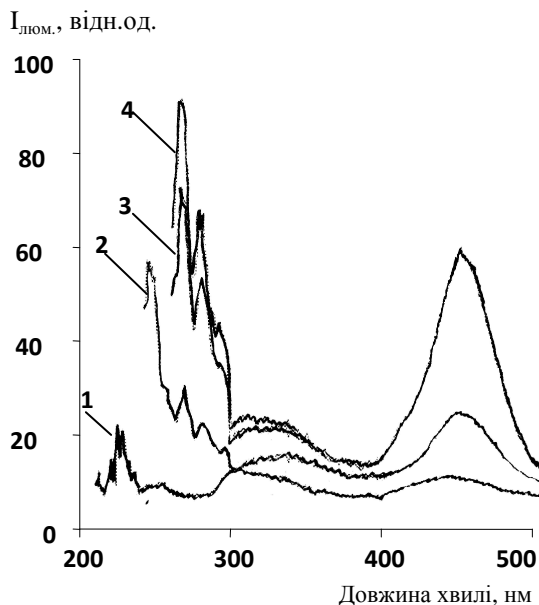


Рис. 3. Спектри збудження у розчині: рутину (1), комплексу рутину з Y(III) (2), комплексу рутину з Y(III) та альбуміном (3), комплексу рутину з Y(III), альбуміном і лаурилсульфатом натрію (4).

Зсув смуги збудження в присутності БСА і значне її збільшення за інтенсивністю може свідчити про взаємодію з БСА з утворенням комплексу Y(III) – рутин – БСА. Підтвердженням цьому є і той факт, що в розчині при рН 6,4 (при якому проходить сорбція) БСА негативно заряджений [8, 9] (його ізоелектричної точка знаходиться при рН = 4,7) і може взаємодіяти з іоном Y(III) з утворенням різнолігандного комплексу.

Дія БСА на $I_{\text{люм}}$ комплексу Sc(III) з моріном, очевидно, інша. Взаємодія в цьому випадку проходить при більш низькому значенні рН = 4,1, при якому БСА негативно не заряджений і комплексна сполука з Sc(III) не утворюється. Так у спектрах збудження комплексу Sc(III) – морін у присутності БСА смуги збудження збільшуються за інтенсивністю, але максимумами смуг не

зміщуються, що свідчить про гідрофобну взаємодію з БСА, в результаті чого комплекс екранується від молекул води і $I_{\text{люм}}$ зростає.

Максимальна інтенсивність люмінесценції сорбату комплексу рутин – $Y(III)$ в присутності БСА спостерігається в діапазоні концентрацій БСА 1-5 мг/мл (рис. 4). Аналогічна залежність характерна і для сорбату комплексу морин – $Sc(III)$ – БСА.

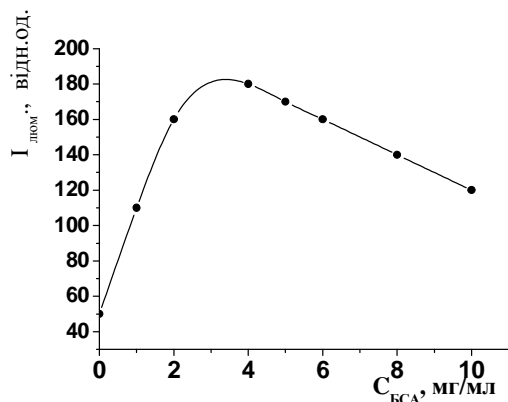


Рис. 4. Залежність $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексу рутин- $Y(III)$ -БСА від кількості БСА; $C_{\text{рутин}} = 5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, $C_{Y(III)} = 1 \cdot 10^{-2}$ моль/л.

З метою з'ясування інтервалу концентрацій флавоноїдів, в якому виконується прямолінійна залежність між їх вмістом та $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексів були побудовані градувальні графіки в оптимальних умовах комплексоутворення і сорбції.

Вивчення впливу кількості флавоноїдів на інтенсивність люмінесценції сорбату комплексів показало, що максимальна інтенсивність люмінесценції для комплексів кверцетину та рутину у фазі сорбенту спостерігається в області $(1,0-1,5) \cdot 10^{-4}$ моль/л. Для морину, як структурного ізомеру кверцетину, максимальна $I_{\text{люм}}$ становить $(0,5-1,0) \cdot 10^{-4}$ моль/л (рис. 5). При подальшому збільшенні концентрації флавоноїдів відбувається концентраційне гасіння люмінесценції сорбату комплексів.

Встановлено, що лінійна область залежності інтенсивності люмінесценції сорбату комплексів від концентрації морину спостерігається в діапазоні концентрацій $(0,005-0,02) \cdot 10^{-3}$ моль/л, для рутину $(0,005-0,01) \cdot 10^{-3}$ моль/л, для кверцетину – $(0,005-0,015) \cdot 10^{-3}$ моль/л. Інтервал визначуваних

концентрацій є достатнім для визначення вмісту та кількості флавоноїдів в рослинній сировині.

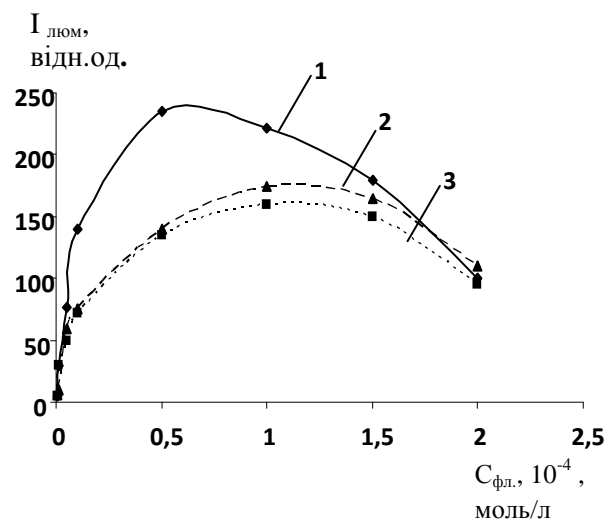


Рис. 5. Залежність $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексів $Sc(III)$ з моріном (1) при pH 4,1; $Y(III)$ з рутин (2) при pH 6,4 та з кверцетином (3) при pH 4,5 від кількості флавоноїдів; $C_{Me(III)} = 1 \cdot 10^{-3}$ моль/л.

В оптимальних умовах протікання сорбції з використанням методу обмеженого логарифмування визначено співвідношення компонентів у сорбатах комплексів Y : кверцетин (фосфат алюмінія), Y : рутин (Sephadex G-150) та Sc : морин (Sephadex G-75), яке складає $Me:R = 1:1$. В присутності бичачого сироваткового альбуміну співвідношення компонентів у комплексі Y : рутин : БСА складає 1:1:2.

Висновки

Таким чином, на підставі проведених досліджень встановлено, що введення БСА в систему $Y(III)$ – рутин та $Sc(III)$ – морин призводить до збільшення $I_{\text{люм}}$ сорбату комплексів, що обумовлено міжмолекулярним перенесенням енергії збудження від донора енергії БСА до акцептора – рутину (морину). Інтервал визначуваних концентрацій лінійної області залежності інтенсивності люмінесценції сорбату комплексів від концентрації флавоноїдів є достатнім для визначення вмісту та кількості останніх у рослинній сировині.

Список використаних джерел

1. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И., Козаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. Ростов: Изд-во Ростовского ун-та, 1988. С. 131.
2. Тараховский Ю.А., Ким Ю.А., Абдрасилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина. Пушино: *Synchrobook*, 2013. С. 311.
3. Георгиевский В.П., Комисаренко Н.Ф., Дмитрук С.Е. Биологически активные вещества лекарственных растений. Новосибирск: *Наука*, 1990. С. 336.
4. Бельтюкова С., Степанова А., Теслюк О. Применение твердофазной спектрометрии для определения антиоксидантов. Deutschland: *Palmarium academic publishing*, 2015. С. 184.
5. Huang B.X., Kim H.Y., Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15(8), 1237–1247. Doi: 10.1016/j.jasms.2004.05.004.
6. Xue P., Zhang G., Zhang J., Ren L. Interaction of Flavonoids with Serum Albumin: A Review. *Current Protein and Peptide Science*, 2021, 22(3), 217–227. Doi: 10.2174/1389203721666201109112220.
7. Смирнова Т.Д., Неврюева Н.В., Штыков С.Н. и др. Определение варфарина методом сенсibilизированной флуоресценции с применением организованных сред. *Журн. аналит. хим.* 2009, 64(11), 1142–1147.
8. Фролов Ю.Л., Сапожников Ю.М., Барер С.С., Люминесценция флавоноидных соединений. *Изв АН СССР. Сер. хим.* 1974, 10, 2364–2367.
9. Biler M., Biedermann D., Valentová K., Křen V., Kubala M. Quercetin and its analogues: optical and acido–basic properties. *Phys. Chem.* 2017, 19, 26870–26879. Doi: doi.org/10.1039/C7CP03845C.

Стаття надійшла до редакції: 10.11.2021 р.

EFFECT OF BOVINE SERUM ALBUMIN ON THE LUMINESCENT PROPERTIES OF FLAVONOIDS

Beltyukova S.V., Teslyuk O.I., Liventsova E.O.

¹*National academy of food technologies of Odessa,*

St. Kanatnaia, 112, 65039, Odessa, Ukraine; e-mail: liventsova.helen@gmail.com

²*A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorfskaya doroga 86, 65080, Odessa, Ukraine; e-mail: olgateslyuk@rambler.ru*

Flavonoids, as representatives of the class of aromatic phenols, in the structure of which have several cyclic groups and form chelates with many metal ions. Quercetin, morin and rutin belong to the group of polyphenolic compounds that actively absorb ultraviolet light and have wide absorption bands with high values of molar absorption coefficients. Quercetin and morin in ethanolic solutions show their own intense luminescence. The luminescence intensity (I_{lum}) of rutin, in the 3-oxy group of which the hydrogen atom is replaced by rhamnose, is of little importance.

In the presence of bovine serum albumin (BSA) I_{lum} sorbates of morin and rutin complexes increase 2-3 times. This work studied the effect of BSA on I_{lum} sorbates of flavonoid complexes under the conditions of obtaining the optimal analytical signal.

BSA has a slight intrinsic luminescence due to the presence of the amino acid tryptophan in its molecule. The possibility of intermolecular energy transfer in the BSA-rutin (morin) system is due to the overlap of the BSA luminescence spectra with the rutin and morin absorption bands. The study of the luminescent properties of BSA in the presence of flavonoids of different concentrations upon excitation of one component - serum albumin, showed that in the spectrum of its luminescence appear new, characteristic of flavonoids bands of sensitized luminescence. As the concentration of flavonoids grows, the I_{lum} of the acceptor increases with a simultaneous decrease in the luminescence of the BSA donor, which indicates the intermolecular transfer of excitation energy from the BSA donor to the flavonoid acceptor.

The use of sorbents as a solid matrix causes a significant increase in I_{lum} complexes Y(III) and Sc(III) with flavonoids (up to 100 times). The highest value of I_{lum} complex Y(III) with quercetin is found on aluminum phosphate and silica gel 100/160, for complexes Y(III) with rutin on dextran-type sorbent Sephadex G-75 and G-150. Similar results were obtained for the Sc(III) complex with morin.

It was found that in the presence of albumin in the excitation spectrum of the complex Y(III) – rutin hyper and bathochromic shift of the band is observed, which indicates the interaction with BSA with the formation of the complex Y(III) – rutin – BSA. The effect of BSA on the Sc(III) complex with morin has a different character, as the interaction takes place at a low pH value, at which the BSA is not negatively charged and a complex compound with Sc(III) is not formed.

The introduction of BSA into the system Ln(III) – flavonoid leads to an increase in I_{lum} of sorbates of complexes due to intermolecular transfer of excitation energy from BSA energy donor to flavonoid acceptor. The linear region of dependence of luminescence intensity sorbates of complexes on the concentration of morin is observed in the range of concentrations $(0.005-0.02) \cdot 10^{-3}$ mol/l, for rutin $(0.005-0.01) \cdot 10^{-3}$ mol/l, for quercetin – $(0.005- 0.015) \cdot 10^{-3}$ mol/l. The range of determined concentrations is sufficient to determine the content and amount of flavonoids in vegetable raw materials.

Keywords: flavonoids; luminescence; yttrium; scandium; quercetin; morin; rutin; albumin.

References

1. Georgiyevskiy V.P., Rybachenko A.I., Kozakov A.L. Fiziko-khimicheskiye i analiticheskiye kharakteristiki flavonoidnykh soyedineniy. Rostov: *Izd-vo Rostovskogo un-ta*, 1988. S. 131 (in Russ.).
2. Tarakhovskiy Yu.A., Kim Yu.A., Abdrasilov B.S., Muzafarov Ye.N. Flavonoidy: biokhimiya, biofizika, meditsina. Pushchino: *Sunchrobook*, 2013. S. 311 (in Russ.).
3. Georgiyevskiy V.P., Komisarenko N.F., Dmitruk S.Ye. Biologicheskii aktivnyye veshchestva lekarstvennykh rasteniy. Novosibirsk: *Nauka*, 1990. S. 336 (in Russ.).
4. Bel'tyukova S., Stepanova A., Teslyuk O. Primeneniye tverdogaznoy spektrometrii dlya opredeleniya antioksidantov. Saarbrücken/ *Deutschland: Palmarium academic publishing*, 2015. S. 184 (in Russ.).
5. Huang B.X., Kim H.Y., Dass C. Probing three-dimensional structure of bovine serum albumin by chemical cross-linking and mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2004, 15(8), 1237–1247. Doi: 10.1016/j.jasms.2004.05.004.
6. Xue P., Zhang G., Zhang J., Ren L. Interaction of Flavonoids with Serum Albumin: A Review. *Current Protein and Peptide Science*, 2021, 22(3), 217–227. Doi: 10.2174/1389203721666201109112220.
7. Smirnova T.D., Nevryuyeva N.V., Shtykov S.N. i dr. Opredeleniye varfarina metodom sensibilizirovannoy fluorestsentsii s primeneniyyem organizovannykh sred. *Zhurn. analit. khim.* 2009, 64(11), 1142–1147 (in Russ.).
8. Frolov Yu.L., Sapozhnikov Yu.M., Barer S.S. Lyuminesentsiya flavonoidnykh soyedineniy. *Izv AN SSSR. Ser. khim.* 1974, 10, 2364–2367 (in Russ.).
9. Biler M., Biedermann D., Valentová K., Křen V., Kubala M. Quercetin and its analogues: optical and acido–basic properties. *Phys. Chem.* 2017, 19, 26870–26879. Doi: doi.org/10.1039/C7CP03845C.