

УДК 543.42.062

ОСОБЕННОСТИ РАЗДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ МЕТОДОМ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ НА КОЛОНКЕ Luna 5u C18(2)

С. Г. Дмитриенко, А.В. Степанова, В.А. Кудринская, В.В. Апяри

(кафедра аналитической химии; e-mail: dmitrienko@analyt.chem.msu.ru)

Исследовано хроматографическое поведение ряда флавоноидов: кверцетина, нарингенина, хризина, морины, рутина и нарингина на колонке Luna 5u C18(2) и выбраны условия их разделения. Сопоставлены особенности удерживания от гидрофобности флавоноидов. Показано, что при использовании подвижной фазы, содержащей 25% ацетонитрила и 75% 0,1%-го водного раствора H_3PO_4 , возможно разделение рутина, морины, кверцетина и нарингенина (время анализа 28 мин). Показано, что при использовании подвижной фазы, содержащей 50% ацетонитрила, возможно разделение кверцетина, нарингенина и хризина (время анализа 8 мин) или морины, нарингенина и нарингина (время анализа 8 мин). Проведено определение кверцетина в пищевом концентрате полифенолов винограда «Эноант» и в вытяжках лекарственных растений.

Ключевые слова: флавоноиды, ВЭЖХ, Luna 5u C18(2), сверхсшитый полистирол.

В настоящее время заметно возрос интерес к определению кверцетина и других флавоноидов в различных объектах, что связано с их высокой антиоксидантной, антимуtagenной и антиканцерогенной активностью, а также рядом других полезных свойств, которыми обладают эти соединения [1]. Кверцетин вводят в состав биологически активных добавок (БАД) и лекарственных препаратов, наряду с другими флавоноидами он присутствует во многих растениях и пищевых продуктах. Согласно литературным данным для идентификации, разделения и определения флавоноидов применяют в основном обращенно-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [2, 3]. В качестве коммерчески доступных неподвижных фаз чаще всего используют силикагели с привитыми алкильными радикалами, как правило C_{18} : Nova-Pak C_{18} [4], Hypersil BDS C_{18} [5], C18 Kromasil 100 [6], Sunfire C18 [7], Acquity VEN-C18 [8], Agilent Eclipse XDB-C18 [9].

Цель настоящей работы – исследование удерживания и выбор условий разделения на колонке Luna 5u C18(2) ряда флавоноидов: кверцетина, нарингенина, хризина, морины, рутина и нарингина без и после сорбционного выделения этих соединений на микроколонке, заполненной сверхсшитым полистиролом.

Экспериментальная часть

Объекты исследования, реагенты и аппаратура

Объектами исследования служили кверцетин (дигидрат, «Sigma», 98%), нарингенин («Acros»,

97%), морин (гидрат, «Acros»), хризин («Acros», 99%), рутин («Acros», 97%) и нарингин («Acros», 97%). Исходные (0,001–0,01 М) растворы этих соединений готовили растворением их точных навесок в ацетоне (кверцетин, нарингенин, хризин) или этаноле (морин, рутин, нарингин). Рабочие растворы готовили разбавлением исходных непосредственно перед использованием.

Хроматографическую часть работы выполняли на жидкостном хроматографе «Цвет-Яуза-04» со спектрофотометрическим детектором ($\lambda = 255$ нм). Разделение проводили в обращенно-фазовом варианте ВЭЖХ. Использовали хроматографическую колонку Luna 5u C18(2) (150×3,0 мм, 5 мкм). В качестве подвижной фазы применяли водно-ацетонитрильные смеси с добавлением фосфорной кислоты. Объем пробы составлял 20 мкл, ввод пробы осуществляли с помощью петли дозатора. Скорость потока составляла 0,5 мл/мин. Дистиллированную воду для приготовления элюента дополнительно очищали с помощью системы очистки воды «Millipore». Элюент дегазировали в ультразвуковой ванне «Branson 1510R-DTH» (США). Значение pH контролировали на иономере «Эксперт 001» (Россия).

Методика сорбционного выделения и концентрирования флавоноидов

Для группового динамического сорбционного концентрирования флавоноидов (ФЛ) использовали концентрирующую микроколонку (30×4 мм), запол-

ненную 0,055 г сверхсшитого полистирола (ССПС, патроны Диапак П-3, ЗАО «БиоХимМак», Россия) и перистальтический насос (ЛАБ-НП-1). Сорбцию проводили из 25 мл водных растворов ФЛ ($c_{\text{HCl}} = 0,1 \text{ M}$). Перед использованием колонку промывали 0,1 M раствором соляной кислоты. Скорость пропускания раствора через колонку составляла 0,33 мл/мин.

Результаты и их обсуждение

Удерживание флавоноидов на колонке Luna 5u C18 (2)

Изучено удерживание индивидуальных флавоноидов на хроматографической колонке Luna 5u C18(2). В качестве элюентов использовали смеси ацетонитрила и 0,1%-го водного раствора H_3PO_4 (рН 3,5) с соотношением компонентов 25:75 и 50:50. Фосфорную кислоту вводили в систему для подавления диссоциации флавоноидов. Анализ полученных данных (табл. 1) показал, что для соединений родственной структуры (морин, кверцетин, нарингенин) удерживание увеличивается по мере увеличения параметра гидрофобности соединений в следующем порядке:

морин < кверцетин < нарингенин.

Та же закономерность наблюдается и для флавоноидов, содержащих гликозидные остатки: более гидрофобный нарингин удерживается сильнее, чем рутин. Из изученных соединений менее всего удерживается рутин: при увеличении содержания ацетонитрила в подвижной фазе до 50 об.% время выхода этого соединения совпадает с «мертвым» временем. Установлено, что удерживание соединений возрастает по мере уменьшения содержания ацетонитрила в

подвижной фазе. Так, например, рутин практически не удерживается на колонке при содержании ацетонитрила в подвижной фазе более 30%, а время выхода хризина (или нарингина) увеличивается от 6,4 до 108 мин при уменьшении содержания ацетонитрила от 50 до 25%.

На основании анализа данных по влиянию состава подвижной фазы на удерживание ФЛ сделан вывод (табл. 2), что в исследуемой хроматографической системе за приемлемое время анализа (менее 40 мин) возможно разделение следующих смесей ФЛ:

1) при соотношении в подвижной фазе ацетонитрила и 0,1%-го водного раствора H_3PO_4 25:75, рН 3,5:

рутин, морин, кверцетин, нарингенин (время анализа 28 мин);

2) при соотношении в подвижной фазе ацетонитрила и 0,1%-го водного раствора H_3PO_4 50:50, рН 3,5:

кверцетин, нарингенин, хризин (или нарингин)

(время анализа 8 мин);

морин, нарингенин, хризин (или нарингин)

(время анализа 8 мин).

Методика определения флавоноидов

Разработаны два варианта определения флавоноидов методом ВЭЖХ: без предварительного сорбционного концентрирования на микроколонке (вариант I); с предварительным сорбционным концентрированием на микроколонке, заполненной ССПС (вариант II).

Вариант I. Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, содержащих от 1 до

Таблица 1

Хроматографические параметры удерживания флавоноидов на колонке Luna 5u C18 (2) (скорость потока подвижной фазы 1мл/мин, $\lambda = 255 \text{ нм}$)

| Соединение | Соотношение в подвижной фазе ацетонитрила и 0,1%-го водного раствора H_3PO_4 (рН 3,5) | | | |
|------------|---|-------|-------|-------|
| | 25:75 | | 50:50 | |
| | k' | N^* | k' | N^* |
| Рутин | 0,87 | 14800 | 0,41 | – |
| Морин | 6,61 | 11000 | 1,34 | 5860 |
| Кверцетин | 10,72 | 27300 | 1,16 | 14000 |
| Нарингенин | 18,28 | 31000 | 1,60 | 34200 |
| Нарингин | 63,52 | 50200 | 3,55 | 45300 |
| Хризин | 68,68 | 55200 | 3,49 | 47500 |

*Число теоретических тарелок на 1 м колонки.

Т а б л и ц а 2

Выбор подвижной фазы для разделения смесей флавоноидов

| Смесь флавоноидов | Элюент | Время анализа, мин |
|--|--|--------------------|
| Рутин, морин, кверцетин, нарингенин | Ацетонитрил + 0,1%-й водный раствор H ₃ PO ₄ (25:75, pH 3,5) | 28 |
| Кверцетин, нарингенин, хризин (или нарингин) | Ацетонитрил + 0,1%-й водный раствор H ₃ PO ₄ (50:50, pH 3,5) | 8 |
| Морин, нарингенин, хризин (или нарингин) | Ацетонитрил + 0,1%-й водный раствор H ₃ PO ₄ (50:50, pH 3,5) | 8 |

Т а б л и ц а 3

Характеристика методик определения рутина, кверцетина, морина и нарингенина методом ВЭЖХ без (I) и с (II) предварительным концентрированием на микроколонке, заполненной 0,055 г ССПС, из 25 мл водного раствора

| Соединение | Диапазон значений определяемого содержания, мкг/мл | | C _{мин} , мкг/мл | |
|------------|--|--------|---------------------------|------|
| | I | II | I | II |
| Рутин | 1–50 | 0,05–2 | 0,3 | 0,02 |
| Морин | 1–50 | 0,05–2 | 0,3 | 0,02 |
| Кверцетин | 0,5–50 | 0,04–2 | 0,2 | 0,01 |
| Нарингенин | 3–50 | 0,2–2 | 1,0 | 0,04 |

Т а б л и ц а 4

Результаты определения рутина, морина, кверцетина и нарингенина в модельных растворах, приготовленных на основе дистиллированной воды, без (I) и после (II) концентрирования из 25 мл (n = 3, P = 0,95)

| Соединение | Найдено, мкг/мл | | s _r | |
|------------|-----------------|-------------|----------------|------|
| | I* | II** | I* | II** |
| Рутин | 10,5 ± 0,7 | 0,46 ± 0,05 | 0,03 | 0,04 |
| Морин | 10,2 ± 0,5 | 0,43 ± 0,04 | 0,02 | 0,04 |
| Кверцетин | 10,0 ± 0,6 | 0,40 ± 0,04 | 0,02 | 0,04 |
| Нарингенин | 10,0 ± 0,5 | 0,39 ± 0,02 | 0,02 | 0,03 |

*Введено по 10 мкг/мл каждого соединения; **введено по 0,4 мкг/мл каждого соединения.

50 мкг/мл соединений в 50%-м этаноле, и в выбранных оптимальных условиях проводили анализ полученных растворов методом ВЭЖХ. Характеристики методики приведены в табл. 3. Правильность и воспроизводимость результатов определения методом ВЭЖХ подтверждены методом «введено – найдено». Результаты представлены в табл. 4.

Вариант II. Для построения градуировочных графиков готовили серию растворов, содержащих от 0,25 до 2 мкг/мл каждого соединения в присутствии 0,1 М HCl. Далее проводили сорбционное концен-

трирование соединений, пропуская по 25 мл каждого раствора через микроколонку, заполненную ССПС. Установлено, что в выбранных условиях рутин сорбируется на 90±4%, а остальные ФЛ – на 95–99%. Десорбцию соединений проводили 1 мл этанола в противотоке. Элюент анализировали методом ВЭЖХ. На рис. 1 приведена хроматограмма модельной смеси компонентов после сорбционного концентрирования из 25 мл водного раствора. Характеристики методики приведены в табл. 3. Правильность и воспроизводимость результатов определения методом

ВЭЖХ подтверждены методом «введено– найдено». Результаты представлены в табл. 4.

Определение кверцетина в вытяжках лекарственных растений

Проведено определение кверцетина в пищевом концентрате полифенолов винограда «Эноант», этанольной настойке боярышника, шелухе лука и листьях монарды дудчатой (бергамота).

В случае пищевого концентрата «Эноант» и этанольной настойки боярышника аликвотные части анализируемых образцов переносили в колбы емкостью 25 мл, добавляли этанол до общей концентрации 25 об.%, 0,5 мл 5 М раствора соляной кислоты

и воду до объема 25 мл. Далее поступали согласно методике построения градуировочного графика. Для приготовления этанольных вытяжек из шелухи лука и высушенных листьев монарды к 0,5 г каждого образца добавляли по 40 мл 50%-го этилового спирта и помещали в ультразвуковую ванну на 1 ч (60°C). Затем экстракты отфильтровывали через бумажный фильтр в колбу емкостью 50 мл, добавляли этанол и воду в соотношении 1:1 и проводили хроматографическое определение. В качестве примера на рис. 2 приведена хроматограмма этанольной вытяжки шелухи лука. Результаты определения, представленные в табл. 5, свидетельствуют о правильности результатов и хорошей воспроизводимости методики.

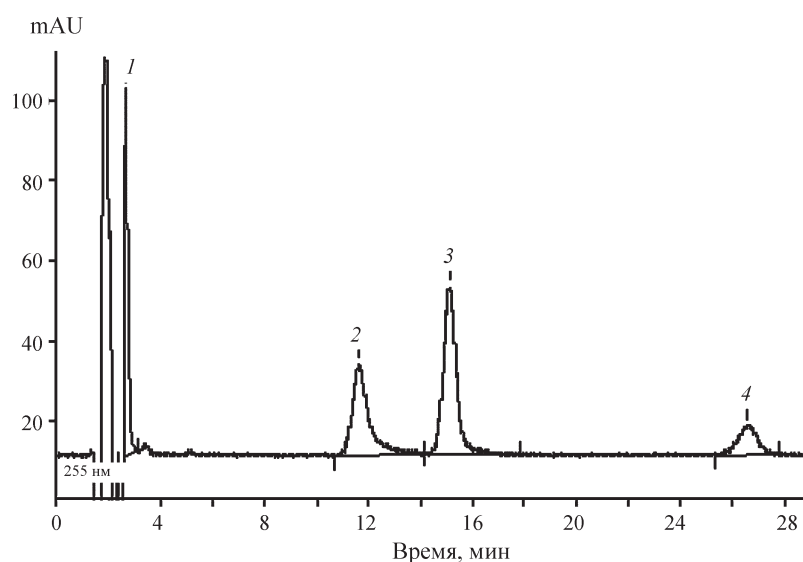


Рис. 1. Хроматограмма модельной смеси флавоноидов после концентрирования на микроколонке, заполненной ССПС. 1 – рутин; 2 – морин; 3 – кверцетин, 4 – нарингенин. Концентрация каждого компонента в исходном растворе составляла 0,8 мкг/мл. Подвижная фаза – ацетонитрил : 0,1%-ный водный раствор H_3PO_4 (25:75, об., pH 3,5)

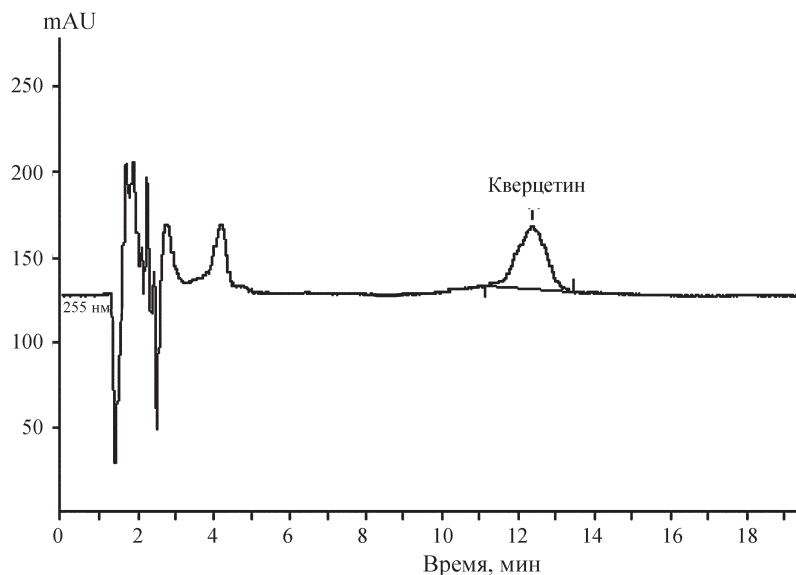


Рис. 2. Хроматограмма этанольной вытяжки шелухи лука

Таблица 5

Результаты определения кверцетина в различных объектах ($n = 3, P = 0,95$)

| Образец | ВЭЖХ | | Спектроскопия диффузного отражения | |
|---|-------------------------|-------|------------------------------------|-------|
| | найдено, мкг/мл (*мг/г) | s_r | найдено, мкг/мл (*мг/г) | s_r |
| Пищевой концентрат полифенолов винограда «Эноант» | 18±2 | 0,04 | 23±5 | 0,08 |
| Этанольная настойка боярышника (ООО «Гиппократ») | 14±1 | 0,03 | 14±2 | 0,05 |
| Шелуха лука | 8,7±0,9* | 0,05 | 9±1* | 0,05 |
| Листья монарды дудчатой (бергамота) | 0,6±0,1* | 0,08 | 0,73±0,07* | 0,04 |

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Яшин Я.И., Рыжнев В.Ю., Яшин А.Я., Черноусова Н.И. Природные антиоксиданты. Содержание в пищевых продуктах и их влияние на здоровье и старение человека. М., 2009.
2. Дмитриенко С. Г., Кудринская В. А., Аняри В. В. // ЖАХ. 2012. 67. № 4. С. 340.
3. Кочетова М. В., Семеновская Е. Н., Ларионов О. Г., Ревина А. А. // Успехи химии. 2007. 76. С. 88.
4. Alonso-Salces R. M., Barranco A., Corta E., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F. // Talanta. 2005. 65. P. 654.
5. Wang S.-P., Huang K.-J. // J. Chromatogr. A. 2004. 1032. P. 273.
6. Kočevar N., Glavač I., Injac R., Kreft S. // J. Pharm. Biomed. Anal. 2008. 46. P. 609.
7. Chen S., Wu B.-H., Fang J.-B., Liu Y.-L., Zhang H.-H., Fang L.-C., Guan L., Li S.-H. // J. Chromatogr. A. 2012. 1227. P. 145.
8. Sultoft S.M., Christensen J. H., Nielsen J., Knuthsen P. // Talanta. 2009. 80. P. 269.
9. Wu H., Chenc M., Fand Y., Elsebaeia F., Zhua Y. // Talanta. 2012. 88. P. 222.

Поступила в редакцию 20.05.12

PECULIARITIES OF FLAVONOIDS SEPARATION BY REVERSED-PHASE HIGH-PERFORMANCE CHROMATOGRAPHY ON Luna 5u C18(2) COLUMN

S.G. Dmitrienko, A.V. Stepanova, V. A. Kudrinskaya, V.V. Apyari

(Division of Analytical Chemistry)

The chromatographic behavior of several flavonoids (quercetin, naringenin, chrysin, morin, rutin and naringin) on Luna 5u C18(2) column was studied. Some peculiarities of retention depending on hydrophobicity of flavonoids were compared. It was shown that using eluent containing 25 % of acetonitrile and 75 % of 0.1 % H_3PO_4 water solution made it possible the separation of rutin, morin, quercetin and naringenin (the time of analysis is 28 min). It was shown that using eluent containing 50 % of acetonitrile made it possible the separation of quercetin, naringenin and chrysin (the time of analysis is 8 min) or morin, naringenin and naringin (the time of analysis is 8 min). The method was applied for determination of quercetin in grape polyphenol food concentrate “Enoant” and extracts from medicinal plants.

Key words: *flavonoids, HPLC, Luna 5u C18(2), hypercrossed polystyrene.*

Сведения об авторах: Дмитриенко Станислава Григорьевна – профессор кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, докт. хим. наук (dmitrienko@analyt.chem.msu.ru); Степанова Александра Викторовна – студентка химического факультета МГУ; Кудринская Вера Александровна – аспирантка кафедры аналитической химии химического факультета МГУ (vera_d@gambler.ru); Аняри Владимир Владимирович – науч. сотр. кафедры аналитической химии химического факультета МГУ, канд. хим. наук (apyari@mail.ru).