



УДК 543.544.52:615.322

О хроматографическом поведении флавоноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Блинова И.П.,
Костенко М.О., Олейниц Е.Ю.

*ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород*

Поступила в редакцию 18.10.2015 г.

В работе показано, что особенности хроматографического поведения флавоноидов различных классов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ, связанные с изменением строения каркаса молекул или с введением (или удалением) функциональных групп, могут быть выявлены при анализе карт разделения, построенных по методу относительного анализа удерживания. Выказано предположение, что эти особенности связаны с неодинаковыми механизмами сорбции из-за различий в пространственном строении молекул; это различие может быть обнаружено при анализе карт эффективности.

Ключевые слова: флавоноиды, удерживание, особенности, обращенно-фазовая ВЭЖХ, карта разделения, карта эффективности.

About chromatographic behavior of flavonoids in reversed-phase HPLC

Deineka V.I., Deineka L.A., Blinova I.P., Kostenko M.O., Oleinitz E.Yu.

Belgorod National Research University, Russia, Belgorod

It has been shown that particularities of different flavonoids retention in reversed-phase HPLC caused by basic structure alteration or by introduction (or withdrawal) of functional groups may be revealed by separation map analysis constructed by relative retention analysis method. It has been proposed that the particularities are connected with no identical sorption mechanisms because of the molecule steric structure differences; the phenomenon may be detected by analysis of the chromatographic effectivity map.

Keywords: flavonoids, retention, particularities, reversed-phase HPLC, separation map, effectivity map.

Введение

Определению флавоноидов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в научной литературе посвящено огромное количество опубликованных работ (17 500 ссылок на сайте Google Академия на пару слов «flavonoids and hplc»). Однако в подавляющем большинстве из них приводятся результаты применения ВЭЖХ при определении состава флавоноидных комплексов природных объектов. И, несмотря на серьезные усилия в определении взаимосвязи между структурой и удерживанием веществ в хроматографии [1], значительных успехов применительно к удерживанию флавоноидов нами в научной литературе не обнаружено. Проблема, по нашему мнению, связана с тем, что попытки связать

удерживание сорбатов в случайно выбранной хроматографической системе (т.е. с некоторым типом стационарной фазы и при некотором составе подвижной фазы) с каким бы то ни было параметром сорбата бесперспективны. Применение метода относительного анализа удерживания [2, 3] показывает, что линии трендов для различных веществ на карте разделения определяются двумя ортогональными факторами: положением точки конвергенции (являющейся функцией строения вещества) и наклоном линии тренда (также являющимся функцией строения вещества).

Термин «флавоноиды» объединяет более десятка классов соединений – производных с преимущественно фенилбензопирановой структурой каркаса, рис.1, с двумя ароматическими кольцами А и В, и различающихся состоянием (а иногда и строением) кольца С (и положением в нем кольца В). Если к разнообразию строения каркаса добавить разнообразие типов и положения гликозилирования, то становится понятным, почему число известных природных флавоноидов превышает 6500, поэтому возможен только ступенчатый, постепенный подход к исследованию любых свойств такой большой группы соединений.

Цель настоящей работы – разработка подхода для выявления особенностей хроматографического поведения флавоноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием метода относительного анализа удерживания.

Эксперимент

Разделение флавоноидов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. В работе использовали хроматографические колонки с обращенными фазами нескольких различных марок, но в тексте представлены данные, полученные для двух из них: 250×4.6 мм Reprosil-Pur C18-AQ (5 мкм) и 250×4.6 мм Symmetry C18 (5 мкм). Все исследования проводили в изократических режимах. Мертвое время определяли по урацилу. Хроматограммы регистрировали, хранили и обрабатывали в среде ChemStation. В работе использовали подвижные фазы трех типов:

а) 80 об. % 2 %-ного ацетатного буфера заданного рН – 20 об. % ацетонитрила;

б) серия элюентов, содержавших 2 об. % уксусной кислоты, при изменяющейся объемной доле ацетонитрила (25 ÷ 40 об. %) в смеси с водой;

в) серия элюентов, содержавших 10 об. % муравьиной кислоты, при изменяющейся объемной доле ацетонитрила (6 ÷ 12 об. %) в смеси с водой.

Во всех случаях использовали скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин. В работе использовали кверцетин, рутин, лютеолин, апигенин и нарингенин (Lancaster), дигидрокверцетин (ООО Таксифолия, Белгород), аромадендрин и цианидин-3-рутинозид выделяли из технического дигидрокверцетина и экстракта плодов черной смородины, соответственно. Для разделения использовали смеси сорбатов в одном растворе, а эффективность (как число теоретических тарелок) определяли для индивидуальных растворов. Квантово-химические расчеты выполняли в среде HyperChem 8.0 по полуэмпирическому методу AM1.

Обсуждение результатов

1. Особенности хроматографического поведения флавоноидов

Гидроксильная и карбонильная группы считаются полярными группами, рост их числа в молекуле должен приводить к росту гидрофильности сорбатов. Но для удерживания флавоноидов в ОФ ВЭЖХ все не так просто. Например, в работе [4], в которой сопоставлено удерживание 34 флавоноидов на стационарной фазе μ -Bondapak C₁₈ в подвижных фазах на основе смесей метанола с водой, подкисленной уксусной кислотой, удерживание 3,3',4',7-тетрагидроксофлаванона (фустина) оказалось меньше удерживания дигидрокверцетина (ДГК), отличающего от фустина дополнительной ОН-группой в положении 5. При этом удаление из ДГК карбонильной (также полярной!) группы сказывается в резком уменьшении удерживания (т.е. в росте полярности!?) получающихся при этом диастереомерных катехинов. В принципе, объяснить такой эффект можно, если предположить относительную липофильность связанных водородной связью карбоксильной (в положении 4) и гидроксильной (в положении 5) групп, рис. 1.

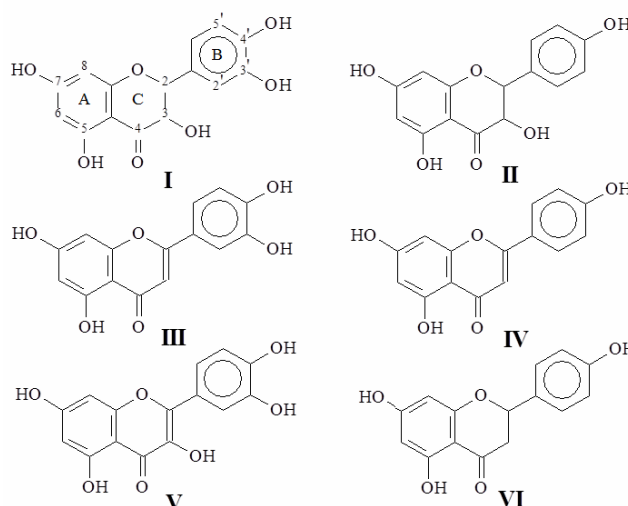


Рис. 1. Строение некоторых флавоноидов

I – дигидрокверцетин; II – аромандрин; III – лютеолин; IV – апигенин;
V – кверцетин; VI – нарингин (Gly - 2-O-(6-деокси- α -L-маннопиранозил)- β -D-глюкопиранозид).

Подобная ситуация сохраняется и в случае флавонолов: кверцетин (3,3',4',5,7-пентагидроксифлаван) удерживается сильнее физетина, у которого отсутствует ОН-группа в положении 5 (обеспечивающая внутримолекулярную связь с карбонильной группой в положении 4), хотя переход к лютеолину (у которого нет ОН-группы в положении 3) приводит к логичному росту удерживания. Следовательно, свойства флавоноидов могут изменяться неодинаково при введении одних и тех же функциональных групп в различные положения каркаса молекулы. Наконец, точечный анализ удерживания любых соединений ненадежен, поскольку часто при смене состава подвижной фазы изменяется порядок элюирования анализов.

2. Управление удерживанием флавоноидов в условиях ОФ ВЭЖХ

Для хроматографирования флавоноидов, содержащих в структуре ОН-группы, необходимо учитывать возможность диссоциации таких групп, изменяющую липофильно-гидрофильный баланс соединений. Поэтому при разработке условий определения этих соединений, прежде всего, необходимо исследовать их удерживание при различных рН. Приведенные на рис. 2 данные свидетельствуют о

том, что диссоциация ОН-групп ДГК происходит в диапазоне рН от 5.5 до 7, т.е. небольшая добавка уксусной или муравьиной кислоты (порядка 2÷5 %) является хорошим решением проблемы.

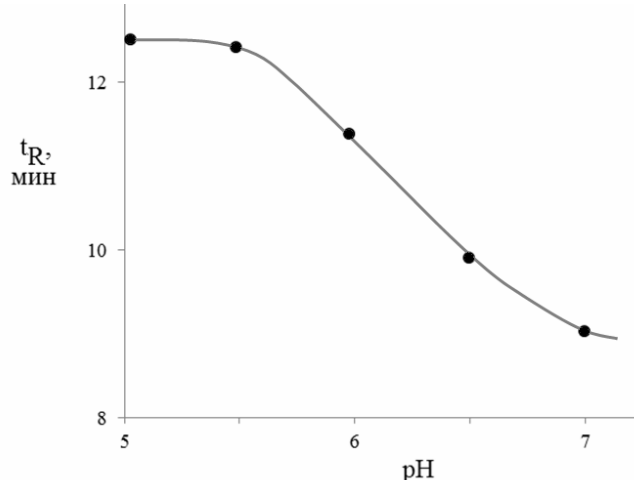


Рис. 2. Зависимость удерживания ДГК от рН подвижной фазы, содержащей 20 об.% ацетонитрила и 2% ацетатного буфера.

Колонка 250×4.6 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм. Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин.

И действительно, для подкисления подвижных фаз при определении ДГК известно использование 2% раствора уксусной кислоты в смеси с ацетонитрилом [5]; 0.5 % водном растворе H_3PO_4 в смеси с метанолом [6]; трифторуксусной кислоты при рН=3 [7]. Отметим, что по данным [7] замена ацетонитрила на метанол позволила улучшить селективность разделения двух природных диастереомеров ДГК.

В настоящей работе хроматографическое поведение ряда флавоноидов различных классов было исследовано в хроматографической системе со стационарной фазой Reprosil-Pur C18-AQ с подвижными фазами ацетонитрил – вода – 2 об. % уксусной кислоты по методу относительного анализа удерживания с ДГК в качестве реперного соединения, уравнение (1).

$$\lg k(i) = a \lg k(\text{ДГК}) + b \quad (1)$$

где k – факторы удерживания флавоноидов. В этом случае параметр a можно рассматривать как характеристику «гидрофобности» молекул (a тем больше, чем больше число и энергия парных атом-атомных дисперсионных взаимодействий), а параметр b связан и с гидрофобностью, и с гидрофильностью молекул - при близких параметрах a чем меньше параметр b , тем выше гидрофильность молекул.

В данном исследовании были использованы два флаванонола (ДГК и аромандендрин, отличающийся от ДГК отсутствием ОН-группы в положении 3'), два флавонола (лютеолин - 3',4',5,7-тетрагидроксофлавонол и апигенин - 3',5,7-тригидроксофлавонол), один флавонол (кверцетин - 3',4',3,5,7-пентагидроксофлавонол) и один флаванон (нарингенин - 3',5,7-тетрагидроксофлаванон), рис.1.

Из представленных на рис. 3 данных следует, что при переходе от ДГК к аромандендрину (удаление ОН-группы из кольца В) удерживание усилилось, что соответствует смещению точки конвергенции влево из-за предсказуемого снижения полярности. Но прямые линии трендов (1) и (2) на этом рисунке почти параллельны, т.е. поэтому гидрофобность молекул почти не изменилась.

Дегидрирование связи $C^{(2)}-C^{(4)}$, приводящее в случае триацилглицеринов к существенному ослаблению удерживания, при переходе от ДГК к кверцетину

приводит не к падению удерживания, а к существенному росту, т.е. к увеличению гидрофобности. Переход от кверцетина к лютеолину, - удаление ОН-группы из положения 3, неожиданно слабо изменяет все параметры удерживания веществ, так если бы удаляемая ОН-группа была «экранирована» в молекуле кверцетина, не участвуя в процессе сорбции на обращенной фазе.

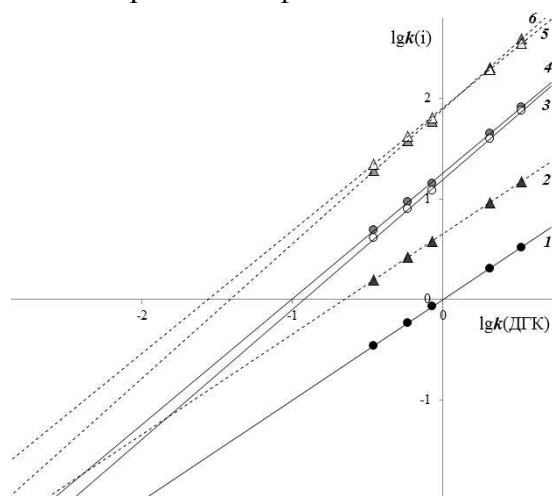


Рис. 3. Карта разделения некоторых флавоноидов

Колонка: 250×4.6 мм, Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм, элюенты содержащие ацетонитрил, воду и 2 об.% уксусной кислоты. Флавоноиды: 1 – дигидрокверцетин (ДГК), 2 – аромандрин. 3 – лютеолин, 4 – кверцетин, 5 – апигенин, 6 - нарингенин

Переход от аромандрина к апигенину, структурно эквивалентный переходу от ДГК к лютеолину, сопровождается аналогичным же изменением на карте разделения, т.е. существуют общие закономерности в системе QSRR.

Гидрирование связи C⁽²⁾-C⁽⁴⁾ в апигенине, приводящее к нарингенину, мало сказывается на удерживании, хотя тенденция к повышению полярности и к снижению гидрофобности очевидна.

Таким образом, судя по найденным изменениям в удерживании, поиск закономерностей QSRR следует проводить индивидуально в пределах одного класса флавоноидов и одной из возможных причин такой особенности флавоноидов может быть различие в механизмах сорбции в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

3. Анализ карт эффективности

Основываясь на математически корректной формуле (2) для определения числа теоретических тарелок [7], можно предложить уравнение (3), позволяющее анализировать зависимость уширения пиков (как квадрат полуширины пика) от фактора, связанного с удерживанием сорбата, т.е. при различных составах подвижных фаз элюентной системы при постоянной скорости подвижной фазы.

$$N = 8 \ln 2 (k / (k + 1)) \cdot (t_R / \Delta_{1/2})^2, \quad (2)$$

$$\Delta_{1/2}^2 = \frac{8 \cdot \ln 2 \cdot t_0^2}{N} k(k + 1), \quad (3)$$

где t_R – время удерживания сорбата, мин; t_0 – мертвое время хроматографической системы, мин; $\Delta_{1/2}$ – «полуширина» пика (т.е. ширина на половине высоты), мин; k – фактор удерживания сорбата.

Уравнение (3) является основанием для построения карт хроматографической эффективности, в которой можно сравнивать эффективность хроматографической системы по отношению к различным веществам, рис. 4. Если число теоретических тарелок хроматографической колонки является константой для данного вещества

при различных составах подвижной фазы выбранной системы, то будет получена прямолинейная зависимость по уравнению (3), но она не должна исходить из начала координат, поскольку в методе теоретических тарелок не учитываются «вихревая» и продольная диффузия.

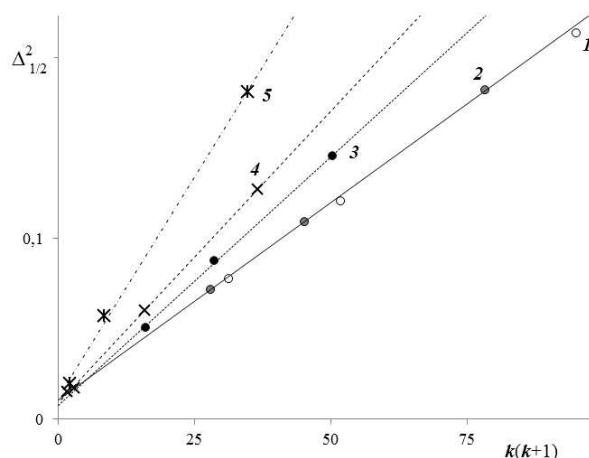


Рис. 4. Карта хроматографической эффективности для пяти флавоноидов Колонки 250×4.6 мм Symmetry C18 (5 мкм) в элюентах системы муравьиная кислота (10 об.%) – ацетонитрил – вода. Флавоноиды: 1 – лютеолин, 2 –кверцетин, 3 - дигидрокверцетин, 4 – рутин, 5 – цианидин-3-глюкозид.

По результатам исследования [9] было предположено, что основная причина относительно меньшей эффективности (по числу теоретических тарелок) хроматографических систем (ЭХС) относительно антоцианов связана с «поплавочным» механизмом удерживания. По данному механизму флавилиевый ион погружается внутрь привитой фазы, а гликозидная часть остается на поверхности в виде своеобразного «поплавка». На рис.4 данные для цианидин-3-рутинозида укладываются на прямую линию с наибольшим наклоном, т.е. с наименьшей эффективностью. Для кверцетин-3-рутинозида наклон линии тренда заметно ниже, что соответствует более высокой ЭХС по отношению к данному соединению. А поскольку гликозидные фрагменты у обоих сорбатов одинаковы, то должны существовать причины различия ЭХС по отношению к ним. По всей вероятности, этот эффект может быть объяснен существованием перехода между флавилиевой и полуацетальной (имеющей меньшее удерживание) формами.

Молекулы кверцетина и лютеолина, имеющие строение, близкое к плоскому (торсионный угол по связям между атомами в положениях 1-2-1'-6' на рис.1 равен 179°), характерному для флавилиевого иона, также могут проникать внутрь привитой фазы, и отсутствие «поплавков» упрощает десорбцию, способствуя повышению ЭХС. Но для молекулы ДГК одна из двух конформаций (торсионный угол по связям 1-2-1'-6' равен 92.5°) имеет изогнутое строение. Это, во-первых, затрудняет проникновение молекулы ДГК внутрь привитой фазы, и, во-вторых, создает условия для специфического «поплавочного» механизма, - в качестве «поплавка» может выступить кольцо В с вытекающим отсюда понижением ЭХС.

Заключение

Для определения особенностей хроматографического поведения флавоноидов в условиях обращенно-фазовой хроматографии необходим анализ карт разделения для различных составов подвижных фаз выбранной системы и карт

хроматографической эффективности, позволяющих дифференцировать флавоноиды по механизмам удерживания.

Список литературы

- 1 Héberger K. // *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1158, pp. 273-305.
- 2 Дейнека В.И. // *Ж. физ. химии*. 2006. Т. 80. № 3. С. 511-516.
- 3 Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F. // *Russian Journal of physical Chemistry A*. 2001. Vol. 75. No 2. pp. 266-271.
4. Daigle D.J., Conkerton E.J. // *J. Chromatogr.* 1982. Vol. 240, pp. 202-205.
5. Воскобойникова И.В. и др. // *Фармация*. 1992. № 6. С.74-75.
6. Храмова Е.П. // *Материалы VII конф. «Аналитика Сибири и Дальнего Востока–2004»*. С. 154.
7. Евсевлеева Л.Г., Добрынина Н.Н., Быкова Л.М. // *Изв. высших учебных заведений. Сер. Химия и химическая технология*. 2009. Т. 52. № 11. С. 42-45
8. Дейнека В.И. // *Ж. физ. химии*. 2004. Т. 78. № 1. С. 144-147.
9. Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Саенко И.И., Чулков А.Н. // *Ж. физ. химии*. 2015. Т. 89. № 7. С. 1172-1177.

References

- 1 Héberger K., *J. Chromatogr. A*, 2007, Vol. 1158, pp. 273-305.
- 2 Deineka V.I., *Russ. J. Phys. Chem.*, 2006, Vol. 80, pp. 429-434.
- 3 Karpov S.I., Matveeva M.V., Selemenev V.F., *Russian Journal of physical Chemistry A*, 2001, Vol. 75, No 2, pp. 266-271.
4. Daigle D.J., Conkerton E.J., *J. Chromatogr.*, 1982, Vol. 240, pp. 202-205.
5. Voskoboynikova I.V. et al., *Farmaciya*, 1992, No 6, pp. 74-75.
6. Hramova E.P., *Materialy VII Conf. «Analitika Sibiri I Dalnego Vostoka – 2004»*, p. 154
7. Evsevleeva L.G., Dobrynina N.N., Bykova L.M., *Izv. Vysshih Uchebnyh Zavedenij. Ser. Himiya i Himicheskaya Tekhnologiya*, 2009, Vol. 52, No 11, pp. 42-45
8. Deineka V.I., *Zhurnal Fizicheskoy Himii*, 2004, Vol. 78, pp. 144-147.
9. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N., *Russ. J. Phys. Chem.*, 2015, Vol. 89, pp. 1172-1177.

Дейнека Виктор Иванович - д.х.н., профессор, профессор кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Дейнека Людмила Александровна - к.х.н., доцент, доцент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Блинова Ирина Петровна - к.х.н., старший преподаватель кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Костенко Михаил Олегович - магистрант Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Олейниц Елена Юрьевна - студент Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

Deineka Victor I. - Dr. Sci.(Chemistry) Prof., Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod, e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. - Ph.D., Professor assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

Blinova Irena P. - Dr. Sci.(Chemistry) Professor assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

Kostenko Michael O. - undergraduate of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

Oleinitz Elena Yu. - Syudent of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod