



УДК 667.5.032.

Оптимизация разделения некоторых флавоноидов методом ТСХ

Беланова Н.А., Карпов С.И., Селеменев В.Ф., Чепелева Е.О.,
Дроздова Н.В., Афиногенов Ю.П.

ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 31.08.2011 г.

Аннотация

Методом тонкослойной хроматографии определены параметры удерживания рутина, нарингина, (+)-катехина, кверцетина в системах элюирования на основе амилового спирта и этилацетата. Рассмотрено изменение параметров хроматографирования флавоноидов в зависимости от полярности элюента по Снайдеру, параметру Гильдебранда, диэлектрической проницаемости. Немонотонность изменения параметров удерживания флавоноидов от полярности среды в рамках одной из шкал демонстрирует необходимость учета природы растворителя, влияющего на взаимодействия флавоноидов с неподвижной фазой. Состав системы элюирования в меньшей степени влияет на удерживание агликонов флавоноидов (кверцетин и (+)-катехин). Замена неподвижной фазы на полиамид приводит к инверсии порядка удерживания гликозидированных форм и агликонов.

Ключевые слова: тонкослойная хроматография, флавоноиды, (+)-катехин, кверцетин, рутин, нарингин

Thin-layer chromatography retention parameters are defined for several flavonoids (rutin, naringin, (+)-catechin, quercetin) in systems based on amylo and ethyl acetate as the elution system. The change in the chromatographic parameters of flavonoids is considered, depending on the polarity of the eluent by Snyder, Hildebrand parameter, the dielectric constant of solvents. The nonmonotonic variation of the flavonoids retention demonstrates necessity to consider not only the polarity of the mobile phase, but also the nature of the solvent that affects the interaction of flavonoids with the stationary phase. Composition of the solvent system does not significantly affect on the retention of aglycones of flavonoids (quercetin and (+)-catechin) if normal silica uses as a stationary phase. Replacement of the stationary phase for polyamide leads to an inversion of the order of mass transfer for glycosidic and aglycones.

Keywords: TLC, flavonoids, (+)-catechin, quercetin, rutin, naringin

Введение

Метод тонкослойной хроматографии в настоящее время активно применяется для качественного и полуколичественного анализа органических соединений в фармакологии, биохимии и медицине. Это связано с такими неоспоримыми преимуществами ТСХ как простота и легкость проведения эксперимента, низкая стоимость оборудования.

Процесс разделения в тонкослойной хроматографии зависит от состава подвижной и неподвижной фазы. Причем наиболее сильным влиянием может обладать состав подвижной фазы, обусловленный широким выбором растворителей и распределением их по силе и селективности. При этом варьируется взаимодействие в системе сорбент - сорбат - растворитель и изменяются условия хроматографического разделения веществ. Выбор и состав подвижной фазы определяется элюирующей способностью растворителей, их полярностью, а также протонодорными и протоноакцепторными свойствами. Полярность растворителя - суммарный эффект взаимодействий между молекулами, обуславливающий способность растворителя сольватировать молекулы растворенного вещества и поверхность неподвижной фазы [3]. Полярность подвижной фазы является ключевым свойством, позволяющим управлять хроматографическими и другими сепарационными процессами [3]. Формой оценки полярности растворителей являются элюотропные ряды - перечень растворителей, расположенных в порядке возрастания элюирующей способности, которая может быть охарактеризована различными параметрами: адсорбционной силой растворителя (ϵ^0), параметром полярности по Снайдеру (R'), диэлектрической проницаемостью (ϵ_r), параметру растворимости Гильдербранда (δ_r) и т.д. [2, 3].

Флавоноиды пользуются непрерывно возрастающим вниманием исследователей. Это обусловлено в значительной степени их ценностью для медицины как источников противовоспалительных, противоопухолевых препаратов. Данные соединения могут находиться в образцах в различных концентрациях в смеси представленной соединениями, относящимися к разным группам. В литературе приведены данные по определению флавоноидов методом тонкослойной хроматографии. При разделении флавоноидов применяются системы элюирования на основе н-бутанола, уксусной кислоты, этилацетата и т.д. [6, 7]. При этом выбор подвижной фазы основан лишь на результатах полученных экспериментально. Полярность растворителя как одного из факторов влияющих на разделение и элюирующую способность определяется суммарным эффектом основных типов межмолекулярных взаимодействий: дисперсионного, индукционного, донорно-акцепторного и диэлектрического, а преимущественное проявление какого-либо из них - его селективностью и возможность хроматографического определения флавоноидов, обладающих различной структурой.

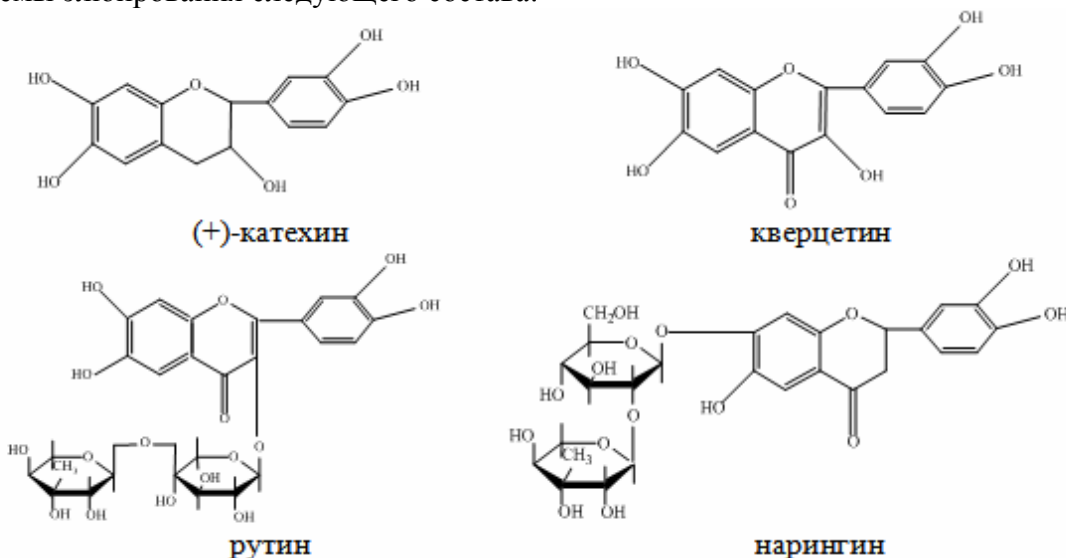
Цель данной работы: оптимизация разделения некоторых флавоноидов при совместном присутствии методом тонкослойной хроматографии. Изучение влияния состава и свойств подвижной фазы на разделение веществ полифенольной структуры.

Эксперимент

Объектами исследования в данной работе являлись (+)-катехин ((+)-Catechin hydrate «Sigma-Aldrich», Германия), кверцетин (ООО «Катроса», Россия), рутин (Rutin «Acros», Германия), нарингин (Naringin «Sigma-Aldrich», Германия). Хроматографирование проводилось на пластинках «Sorbfil-ПТСХ-П-А», «Sorbfil-ПТСХ-АФ-А», «Fluka Poluamid 6». Анализируемые вещества наносили на пластинки в виде спиртовых растворов. Концентрация флавоноидов составляла 2,5 мг/мл. Объем наносимой пробы составлял 1 мкл.

Анализ полифенольных веществ осуществляли в нормально-фазовом режиме ТСХ. Для приготовления подвижных фаз применяли амиловый спирт (х.ч.),

этилацетат (х.ч.), уксусную кислоту (х.ч.) и дистиллированную воду. Подвижные фазы готовились смешиванием компонентов в указанных соотношениях непосредственно перед применением. Хроматографические камеры предварительно насыщались парами растворителей в течение 30 мин. В работе использовали системы элюирования следующего состава:



- этилацетат - уксусная кислота - вода (10:20:60; 20:70:10; 40:20:40; 50:25:25; 55:20:20; 60:15:15; 60:20:20; 70:20:10; 70:15:15; 80:10:10; 80:15:5; 90:5:5);

- амиловый спирт - уксусная кислота - вода (10:30:60; 20:30:40; 30:30:40; 40:30:20; 40:30:10; 50:40:10; 50:24:26; 50:25:25; 50:26:24; 55:30:15; 60:20:20; 70:15:15; 80:10:10; 90:5:15).

Обсуждение результатов

Для определения флавоноидов наиболее часто применяют хроматографические методы: планарную хроматографию (бумажную и тонкослойную), высокоэффективную жидкостную хроматографию. Метод тонкослойной хроматографии является в данном случае наиболее простым и доступным.

Под оптимизацией разделения в ТСХ понимают выбор условий эксперимента, которые позволяют провести удовлетворительное разделение данного образца на пластине [1]. Для этого возможно варьирование составом подвижной и неподвижной фазы. Изменение состава подвижной фазы наиболее экономичный способ повышения качества хроматографической методики [2].

Многообразие флавоноидов предполагает необходимость их предварительного разделения с учетом их хроматографических свойств, природы взаимодействий флавоноид - сорбат, флавоноид - растворитель (элюент). Изменение полярности растворителя, очевидно, приводит к необходимости учета влияния природы взаимодействий в системе сорбат - сорбент - растворитель на гликозидированные формы флавоноидов (рутин и нарингин) и агликоны (кверцетин и (+)-катехин). Для большинства используемых систем рутин и нарингин, как и следовало, ожидать лучше удерживаются силикагелем ($R_f = 0,2-0,7$), чем кверцетин и (+)-катехин ($R_f = 0,8-0,9$) (рис 1-4). При этом параметры хроматографирования рутина и нарингина зависят от состава и свойств растворителей, используемых для элюирования.

Для выбора оптимального соотношения компонентов подвижной фазы было исследовано влияние концентрации этилацетата и амилового спирта на величину R_f (+)-катехина, кверцетина, рутина и нарингина. Как свидетельствуют полученные данные (рис.1), наблюдается зависимость хроматографической подвижности гликозидированных форм флавоноидов (рутин, нарингин) от процентного содержания амилового спирта и этилацетата: увеличение содержания этилацетата и амилового спирта приводит к уменьшению относительной скорости перемещения. Наименьшую величину относительной скорости перемещения имеют рутин и нарингин, что согласуется с их строением: наличие углеводной части в составе молекулы флавоноидов обуславливает большее удерживание гликозидированных форм силикагелем на величину, равную введению одной гидроксильной группы [6].

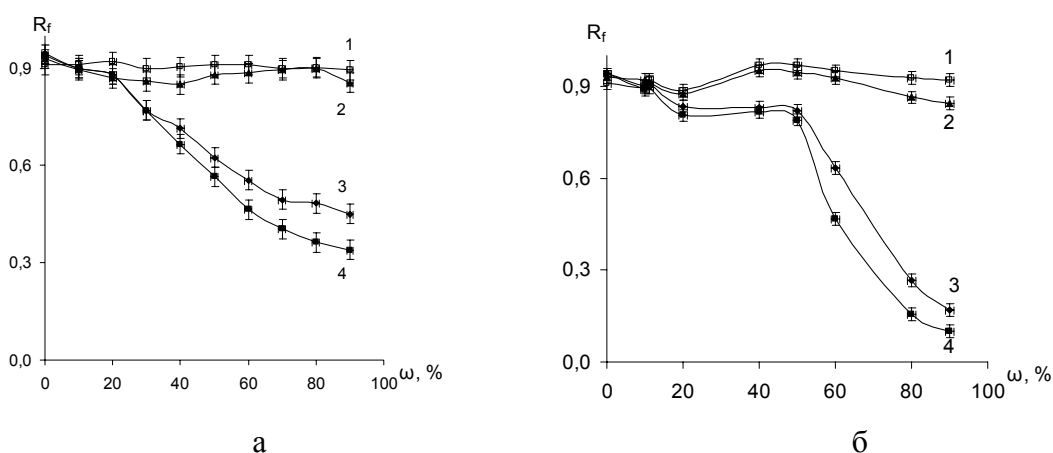


Рис. 1. Определение флавоноидов методом ТСХ при использовании подвижной фазы на основе: а - амилового спирта, б – этилацетата: (+)-катехин (1), кверцетин (2), нарингин (3), рутин (4)

При выборе наиболее подходящего соотношения компонентов подвижной фазы необходимо оценить полярность системы растворителей. Для этого используют такие параметры полярности как: ϵ_r - диэлектрическая проницаемость, P' - параметр полярности по Снайдеру, δ_T – параметр растворимости растворимости Гильдербранда.

В бинарных и многокомпонентных подвижных фазах для характеристики полярности среды можно использовать в качестве первого приближения аддитивное уравнение [4, 5]:

$$S = \sum S_i \varphi_i, \quad (1)$$

где S_i - рациональная полярность, а φ_i - объемная доля растворителя

Наиболее часто данное уравнение применяют для характеристики зависимости полярности системы по Снайдеру и параметру растворимости Гильдербранда. Параметр полярности по Снайдеру, представляющий собой сумму логарифмов коэффициентов распределения стандартных веществ (этанол, диоксана, и нитрометана) между паровой фазой и испытуемым растворителем, основан на эмпирических данных, но в последнее время используется редко [3]. Параметр растворимости Гильдербранда - квадратный корень из значения плотности энергии когезии. Общая плотность энергии когезии представляет собой сумму вкладов дисперсионных, ориентационных, индукционных, Н-связей и кислотно-основных взаимодействий. К его недостаткам относят чрезмерно большой вклад в суммарный показатель дисперсионной составляющей, которая меняется слишком незначительно при переходе от одного соединения к другому.

Как видно из рис. 2 и 3 изменение полярности подвижной фазы приводит к изменению удерживания гликозидированных форм (рутина и нарингина). Увеличение параметра полярности Снайдера при использовании систем элюирования, в которых основным компонентом являются этилацетат и амиловый спирт вначале происходит увеличение удерживания рутина и нарингина на силикагеле. При этом минимальные значения R_f данные вещества имеют в системах элюирования этилацетат – уксусная кислота – вода (80:10:10; 90:5:5) и амиловый спирт - уксусная к-та – вода (60:20:20), (50:26:24). Увеличение параметра растворимости Гильдербрanda в подвижных фазах, где основным является этилацетат, приводит к увеличению R_f рутина и нарингина. При использовании системы растворителей на основе амилового спирта наименьшие значения относительной скорости перемещения достигаются в системе элюирования амиловый спирт - уксусная к-та - вода (60:20:20), а этилацетат - уксусная к-та - вода (80:10:10).

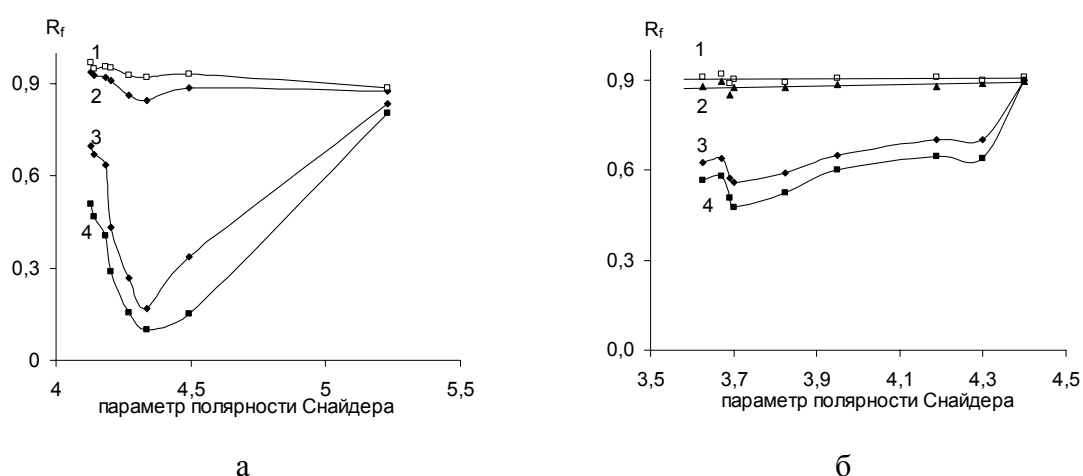


Рис. 2. Зависимость относительной скорости удерживания от параметра полярности по Снайдеру. Системы элюирования: а - на основе этилацетата, б - на основе амилового спирта: (+)-катехин (1), кверцетин (2), нарингин (3), рутин (4)

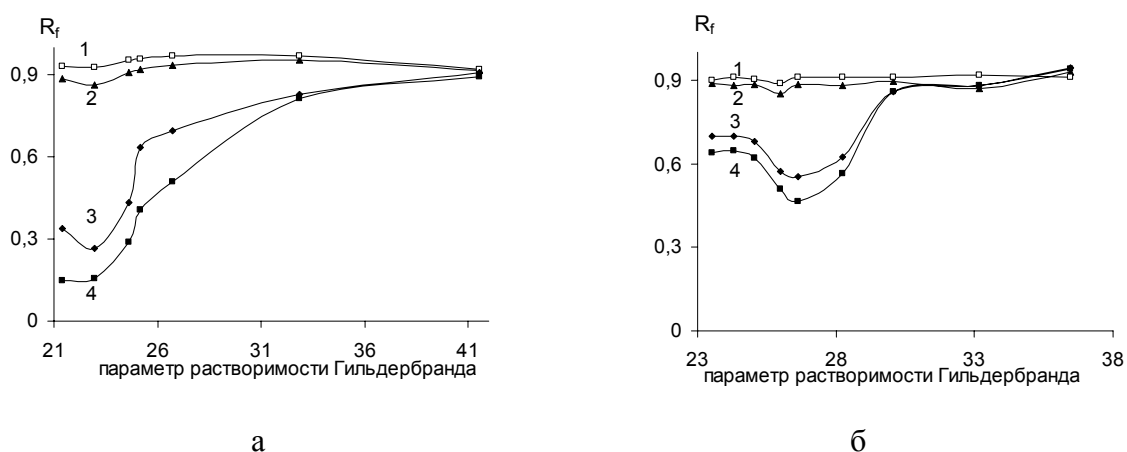


Рис. 3. Зависимость относительной скорости удерживания от параметра растворимости Гильдербрanda. Системы элюирования: а - на основе этилацетата, б - на основе амилового спирта: (+)-катехин (1), кверцетин (2), нарингин (3), рутин (4)

Диэлектрическая проницаемость, нелинейно меняющаяся величина, характеризующая способность растворителя к разделению зарядов и ориентации диполей. Линейное изменение свойств, возможно, принять, в том случае, когда основным компонентом является органический растворитель, с небольшими добавками уксусной кислоты и воды, как в нашем случае. Исходя из этого, можно произвести расчет диэлектрической проницаемости для системы растворителей по уравнению аддитивности (1) и проанализировать изменение хроматографических параметров для флавоноидов.

Изменение относительной скорости перемещения флавоноидов в зависимости от диэлектрической проницаемости указывает на значительное влияние природы органического компонента на состав элюента. Варьирование доли этилацетата приводит к росту диэлектрической проницаемости и сопровождается уменьшением удерживания гликозидов и ростом величины R_f . Изменение величины диэлектрической проницаемости на разделение агликонов и величину их R_f практически отсутствует. При использовании системы элюирования, в которой в качестве основного является амиловый спирт, зависимость относительной скорости перемещения от диэлектрической проницаемости имеет немонотонный вид. При этом наибольшее удерживание рутин и нарингина наблюдается в системе растворителей: амиловый спирт - уксусная к-та - вода (70:15:15; 60:20:20) и этилацетат - уксусная к-та - вода (80:10:10; 90:5:5).

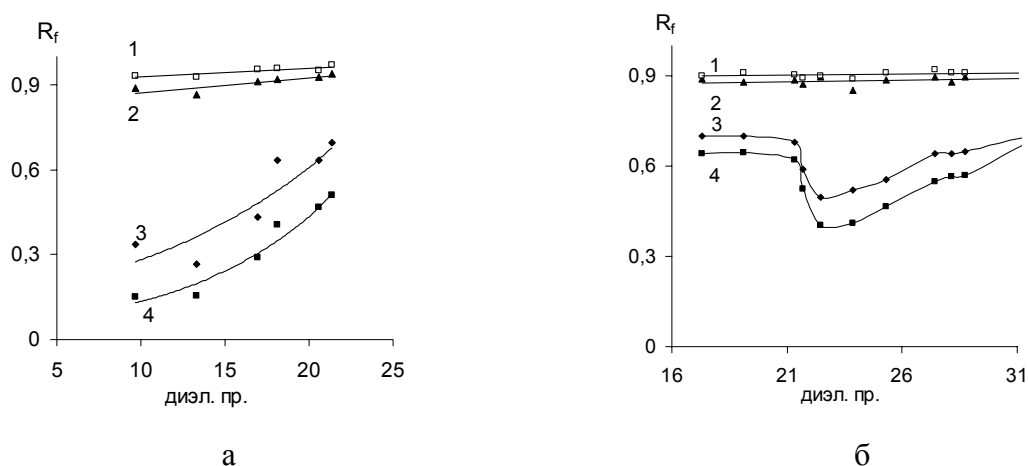


Рис. 4. Зависимость относительной скорости удерживания от диэлектрической проницаемости. Системы элюирования: а - на основе этилацетата, б - на основе амилового спирта: (+)-катехин (1), кверцетин (2), нарингин (3), рутин (4)

При рассмотрении селективности хроматографической системы по отношению к смеси флавоноидов необходимо учитывать свойства, как растворителя, так и сорбента. Варьирование составом подвижной фазы не оказывает значительного влияния на величину R_f кверцетина и (+)-катехина (рис. 1-4). Полиамид как стационарная фаза применяется для разделения фенольных соединений, при этом между фенольными гидроксильными и амидными группами образуются водородные связи [8, 9]. В нашем случае при замене неподвижной фазы с силикагеля на полиамид происходит изменение механизма удерживания флавоноидов. Относительная скорость перемещения агликонов (кверцетина и (+)-катехина) снижается, а удерживание гликозидированных форм флавоноидов наоборот уменьшается. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Значения относительной скорости перемещения некоторых флавоноидов (подвижная фаза: амиловый спирт - уксусная кислота - вода (50:25:25)), n=3, P=0.95

Неподвижная фаза	R _f , см			
	(+)-катехин	кверцетин	рутин	нарингин
силикагель	0.85±0.02	0.89±0.02	0.55±0.02	0.61±0.02
полиамид	0.28±0.03	0.27±0.03	0.69±0.02	0.81±0.02

Заключение

Оптимизация хроматографического процесса разделения флавоноидов методом тонкослойной хроматографии обуславливается изменением состава подвижной фазы. Показано, что при хроматографировании флавоноидов варьирование составом элюента сопровождается изменением удерживания рутина и нарингина и, следовательно, изменением величины R_f данных веществ. Увеличение объемной доли амилового спирта и этилацетата приводит к увеличению удерживания данных веществ. При этом разные параметры полярности растворителей устанавливают похожие порядки изменения подвижности гликозидированных форм флавоноидов. Зависимость носит немонотонный характер, при этом наименьшие значения относительной скорости перемещения, рутин и нарингин имеют в системах растворителей следующего состава амиловый спирт - уксусная к-та - вода (70:15:15; 60:20:20) и этилацетат - уксусная к-та - вода (80:10:10; 90:5:5). Увеличение объемной доли уксусной к-ты и воды при этом приводит к уменьшению удерживания нарингина и рутина и, следовательно, к увеличению величины R_f.

При хроматографировании кверцетина и (+)-катехина на пластинах для ТСХ «Sorbfil-ПТСХ-П-А» и «Sorbfil-ПТСХ-АФ-А» состав подвижной фазы практически не оказывает влияния на их скорость относительного перемещения. Замена неподвижной фазы с силикагеля на полиамид приводит к изменению механизма удерживания и уменьшению относительной скорости перемещения кверцетина и (+)-катехина и инверсии порядка удерживания гликозидированных форм (рутина и нарингина) и агликонов (кверцетина и (+)-катехина).

Список литературы

1. Гейс Ф. Основы тонкослойной хроматографии / пер. с англ., под ред. Березкина В.Г. - М.: 1999. - 348 с.
2. Рудаков О.Б., Востров И.А., Федоров С.В., Филиппов А.А., Селеменев В.Ф., Приданцев А.А. Спутник хроматографиста. - Воронеж: Водолей, 2004. - 528 с.
3. Рудаков О.Б. Применение редуцированного критерия полярности растворителей в жидкостной хроматографии // Конденсированные среды и межфазные границы, 2002, Т. 4, №2, С.140-149
4. Рудаков О.Б., Селеменев В.Ф. Физико-химические системы сорбат – сорбент – элюент в жидкостной хроматографии. - Воронеж, 2003. - 240 с.
5. Сумина Е.Г., Штыкова С.Н., Тюрина Н.В. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение. - Саратов: Изд-во Саратовского гос.ун-та, 2006. - 112 с.

6. Георгиевский В.П., Рыбаченко А.И., Казаков А.Л. Физико-химические и аналитические характеристики флавоноидных соединений. - Ростов: Изд-во Ростовского ун-та, 1988, -144 с.

7. Корулькин Д.Ю., Абилов Ж.А., Музычина Р.А., Толстиков Г.А. Природные флавоноиды. - Новосибирск: ГЕО, 2007, -232 с.

8. Запрометов М.Н. Фенольные соединения. - М.: Наука, 1993. -272 с.

9. Беккер Ю. Хроматография. Инструментальная аналитика: методы хроматографии и капиллярного электрофореза. - М.: Техносфера, 2009. -472 с.

Беланова Наталья Анатольевна – вед. инженер кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел.(4732)20-89-32

Карпов Сергей Иванович – к.х.н., доц. кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел.(4732) 20-89-32

Селеменев Владимир Федорович – д.х.н., профессор, зав. каф. аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел.(4732) 20-89-32

Чепелева Екатерина Олеговна – студентка кафедры аналитической химии Воронежского государственного университета, Воронеж, тел. (4732)20-89-32

Дроздова Наталья Владимировна - к.х.н., ведущий эксперт, ЭКС УФСКН по Воронежской области, Воронеж

Афиногенов Юрий Петрович - к.х.н., проф., кафедра общем и неорганической химии, Воронежский государственный университет, Воронеж

Belanova Natalia A. – the senior engineer department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: belanovana@mail.ru

Karpov Sergey I. – the senior lecturer of department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: karsiv@mail.ru

Selemenev Vladimir F. – the professor, head of the department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh, e-mail: common@chem.vsu.ru

Shepeleva Ekaterina O. - student of chemical faculty, Voronezh, Voronezh State University

Drozdova Natalya V. - leading expert, FDSC of Russian federation Department in Voronezh Region, Voronezh

Afinogenov Yuri P. - Prof., PhD, Department of Inorganic Chemistry Faculty of Chemistry. Voronezh, Voronezh State University