УДК 543.544.14

Сорбционное разделение фенольных кислот в условиях ион-парной ОФ ВЭЖХ

Анисимович И.П., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Симаков С.В.

Белгородский государственный университет, Белгород

Селеменев В.Ф.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 3.06.2010

Аннотация

В работе показано, что переход от традиционной обращенно-фазовой ВЭЖХ на стационарной фазе Kromasil-100 5C18 к ион-парному варианту (с добавкой цетилтриэтиламмония нитрата) позволяет обратить порядок элюирования фенольных кислот (кофейной, пара-кумаровой, синаповой и феруловой). Рассмотрены особенности поведения хроматографической системы в ион-парном режиме.

Ключевые слова: ВЭЖХ, удерживание, фенольные кислоты, ион-парная хроматография

In the paper it has been shown that exploration of the ion-pair mode (by addition of cetyltriethylammonim nitrate) of reversed-phase HPLC with Kromasil-100 5C18 stationary phase permits to change to an opposite sequence of phenolic acids (caffeic, *p*-cumaric, ferulic and sinapic) elution. The particularities of the ion-pair mode are discussed.

Key words: HPLC, retention, phenolic acids, ion-pair chromatography

Введение

Фенольные кислоты как вторичные метаболиты широко распространены в растительном мире [1]. Разработка обширного спектра аналитических методов определения этих соединений связана не только с их ролью и местом в фенилпропаноидном пути метаболизма, но и с тем, что они относятся к веществам, определяющим качество продуктов питания и их органолептические свойства [1, 2]. Кроме того, современные исследования показывают заметную роль фенольных кислот в профилактике различных заболеваний [1 - 3].

К фенольных кислотам относится довольно большая группа производных бензойной и коричной кислот, поэтому наиболее приемлемыми для их индивидуального определения являются хроматографические методы: высокоэффективная (ВЭЖХ), тонкослойная (ТСХ) и газовая (ГХ) хроматография. Из них обращенно-фазовая ВЭЖХ с УФ-детектированием (если не рассматривать ВЭЖХ с масс-селективным детектированием) является наиболее быстрым и

эффективным методом. В литературе предложены как изократические, так и градиентные методы элюирования с использованием метанола или ацетонитрила в качестве компонентов водно-органических подвижных фаз [1, 2]. Во всех случаях при этом используются подкисленные подвижные фазы - для ослабления взаимодействия гидроксильных групп фенольных кислот с остаточными силанольными группами обращенно-фазового сорбента и «фиксации» степени диссоциации разделяемых компонентов. При этом полное подавление диссоциации кислот возможно только в достаточно кислых подвижных фазах, при которых стационарные октадецилсилановые фазы не отличаются высокой стабильностью. С другой стороны, ион-парная обращенно-фазовая ВЭЖХ широко используется для разделения и определения веществ, находящихся в подвижной фазе в ионизированной форме, но исследованию поведения ароматических карбоновых кислот в таких условиях посвящено лишь несколько публикаций [4]. Поэтому задача настоящей работы – исследование разделения некоторых фенольных кислот в условиях ион-парной обращенно-фазовой ВЭЖХ.

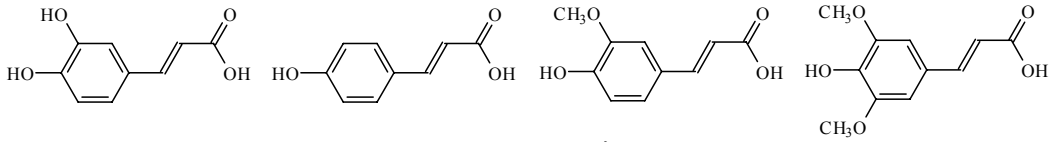
Материалы и методы исследования

В работе использована хроматографическая система, составленная из насоса Beckman 110B, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографическая колонка: 4.6×150 мм, Kromasil-100 5C18. Детектор – спектрофотометрический с варьируемой длиной волны (детектор Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5. Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Espana). В работе использованы фенольные кислоты производства Alfa Aesar, Lancaster, цетилтриэтиламмония бромид был нами синтезирован и очищен перекристаллизацией.

Результаты исследования и обсуждение

В условиях традиционной обращенно-фазовой ВЭЖХ в элюентах системы «вода – ацетонитрил (содержащих от 15 до 25 об.% CH_3CN) с добавкой 2 об.% уксусной кислоты» порядок элюирования некоторых производных *транс*-коричной кислоты (схема 1) постоянен:

t_R(кофейная к-та) < t_R(*пара*-кумаровая к-та) < t_R(синаповая к-та) < t_R(феруловая к-та).



кислоты

Воспользуемся методом анализа относительного удерживания [5] для построения карты разделения данных кислот - в координатах «логарифм фактора удерживания *i*-ой кислоты относительно логарифма фактора удерживания *пара*-кумаровой кислоты», рис.1. Линия тренда для синаповой кислоты пересекает линию тренда для феруловой кислоты в более слабых элюентах (справа) и *пара*-кумаровой кислоты (пунктирная линия на рисунке) - в более сильных элюентах (слева), т.е.

порядок элюирования может быть изменен – либо при смене состава подвижной фазы, либо при переходе к стационарным фазам других производителей. Но в целом порядок элюирования может быть аппроксимирован порядком увеличения logP – (десятичного) логарифма коэффициента распределения веществ в системе несмешивающихся растворителей: октанол-1 – вода, широко используемый в направлении «Количественная взаимосвязь между свойством – строением веществ, QPSR, [6]. При этом сами (предположительные) параметры logP определяют, используя обращенно-фазовую ВЭЖХ по нескольким различным подходам или с использованием целого ряда специализированных программных пакетов, позволяющих предсказать этот параметр (обозначаемый как CLogP) [7]:

Параметры logP и CLogP некоторых фенольных кислот*

№	Кислоты:	кумаровая	кофейная	феруловая	синаповая
1	logP(exp)	1.46	1.15	1.51	-
2	ALOGPs	1.74	1.67	1.58	1.63

* Данные получены интерактивно на сайте www.vcclab.org/lab/**alogp**s/

Отметим, что характер относительного удерживания рассматриваемых кислот почти не изменяется при переходе к другой хроматографической системе – на основе стационарной фазы Диасфер-100-С18 при более высоком содержании уксусной кислоты, т.е. в условиях традиционной обращенно-фазовой хроматографии возможности изменения селективности разделения кислот весьма ограничены.

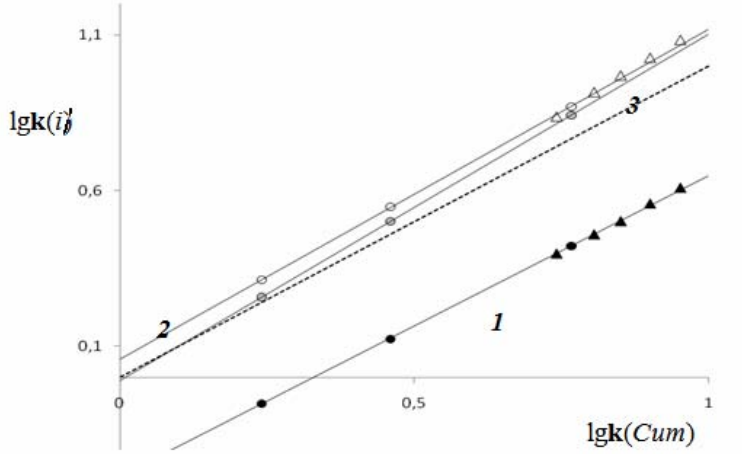


Рис.1. Удерживание кофейной, феруловой и синаповой кислот относительно *пара*-кумаровой

Линии тренда для: 1 –кофейной, 2 – феруловой и 3 – синаповой кислот. Экспериментальные данные: кружки – для системы ацетонитрил – 2% CH_3COOH - вода и хроматографическая колонка 150×4.6 мм Kromasil 100-5C18; треугольники - для системы ацетонитрил – 5% CH_3COOH - вода и хроматографическая колонка 150×4.6 мм Диасфер-110-С18, 5 мкм.

В то же время, если уменьшение pH подвижной фазы, как отмечалось выше, связано с риском быстрого разрушения сорбента, то создание подвижных фаз со средами, близкими к нейтральной, создает условия, при которых степень ионизации кислот будет значительной (pK кислот находится в пределах 4.5 ÷ 5.0). В этом случае можно воспользоваться ион-парными добавками для изменения удерживания сорбатов.

И действительно, переход к ион-парному варианту хроматографии позволил изменить порядок элюирования фенольных кислот на обратный, рис.2.

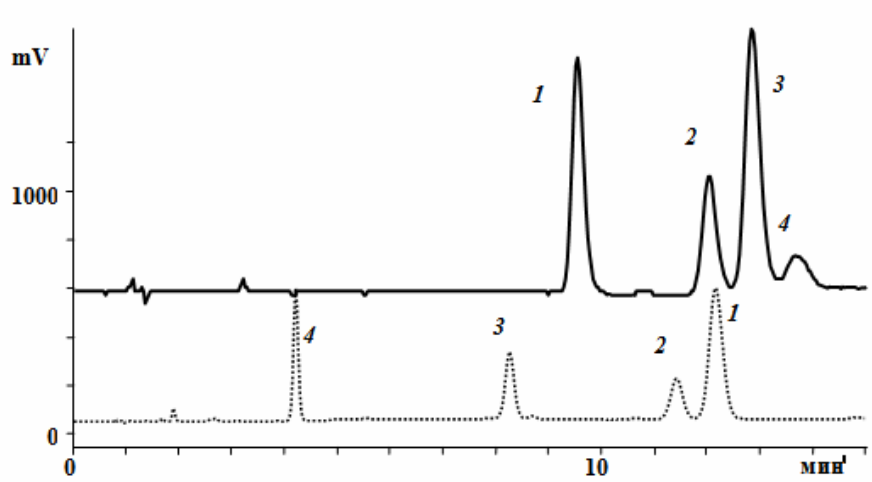


Рис.2. Удерживание кофейной, *пара*-кумаровой и феруловой и синаповой кислот в условиях ион-парной обращено-фазовой ВЭЖХ

Кислоты: 1 – синаповая, 2 – феруловая, 3 – пара-кумаровая и 4 – кофейная. Хроматографическая колонка 150×4.6 мм Kromasil 100-5C18, подвижная фаза: $5{,}24 \cdot 10^{-3}$ М по цетилтриэтиламмонию нитрату, 31.4% CH_3CN и 2 % фосфатного буфера (pH=5.5). Пунктиром – разделение тех же кислот в подвижной фазе системы ацетонитрил – уксусная кислота – вода (измененная временная шкала)

При этом пики синаповой, феруловой и *пара*-кумаровой кислот по-прежнему оставались симметричными, и лишь пик кофейной кислоты был заметно более уширенным. Следовательно, выбирая тип и концентрацию ион-парной добавки, pH подвижной фазы (что определит долю кислот, присутствующих в подвижной фазе в ионизированной форме) и количество органического модификатора, можно направленно изменить времена удерживания фенольных кислот.

У обращено-фазового варианта имеется еще одна особенность – медленный выход хроматографической системы на стационарный режим, рис.3

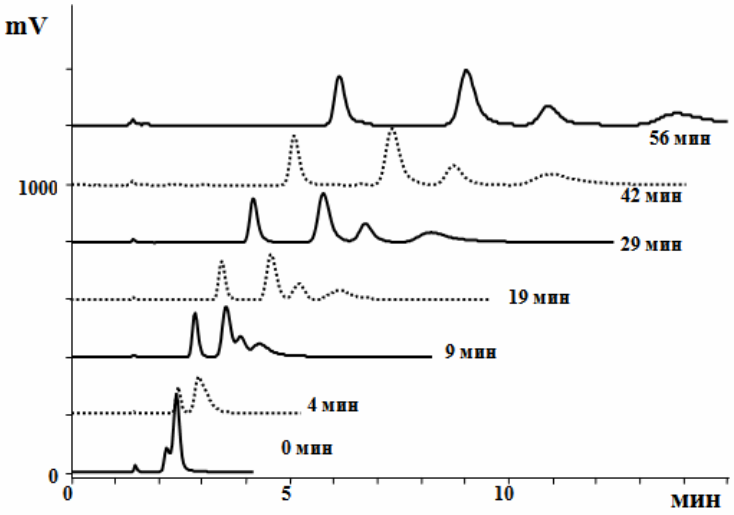


Рис.3. Изменение удерживания фенольных кислот при разработке хроматографической системы во времени

Колонка 150×4.6 Kromasil 100-5C18; подвижная фаза $1.7 \cdot 10^{-3}$ триэтилцетиламмония нитрата в водном растворе, содержащем 20 об.% CH_3CN и 10 об.% 1М фосфатного буфера с pH=5.47.

Такой медленный выход хроматографической системы в режим можно рассматривать как свидетельство преобладания ионообменного (или нестехиометрического [8]) механизма над ион-парным (стехиометрическим),

поскольку медленные процессы образования / разрушения / сорбции / десорбции ионных пар должны сказаться только в уширении пиков. К сожалению, нам не удалось обнаружить работ по исследованию поведения аналогичного набора кислот в условиях анионообменной хроматографии. Однако в работе [9] приводятся экспериментальные данные о том, что добавление гидроксильной группы в положение 4 ароматического кольца ароматических карбоновых кислот приводит к росту времен удерживании, а при дополнительном введении метокси-группы в положение 3 наблюдается еще большее уменьшение удерживания. Ослабление сорбции продолжается при введении еще одной метокси-группы в положение 5, что полностью согласуется с полученными в настоящей работе результатами и с предположением об ионообменном характере сорбции.

Список литературы

1. Stalikas C.D. Phenolic Acids and Flavonoids: Occurrence and Analytical Methods / In «Free Radicals and Antioxidant Protocols» (Methods in Molecular Biology 610). Ed. R.M. Uppu et al. Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LLC. 1998, 2010. - Chapter 5. – P. 65-90.
2. Fleuriet A., Macheix J.-J. Phenolic acids in fruits and vegetables / In «Flavonoids in health and disease». Second edition. Revised and expanded. Ed. Catherine Rice-Evans,Lester Packer. Marcel Deckker, Ink., New York. – 2003. – P. 1-42.
3. Hollman P.C.H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? // J. Sci. Food Agric. – 2001. – V.81. – P. 842-852.
4. Kawamura K.; Okuwaki A., Verheyen T.V., Perry G.J. Separation of Aromatic Carboxylic Acids Using Quaternary Ammonium Salts on Reversed-Phase HPLC. 1. Separation Behavior of Aromatic Carboxylic Acids // Separation Science and Technology, Volume 41, Issue 2 February 2006 , pages 379 - 390
5. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ // Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80. - С. 511-516.
6. Katritzky A.R., Karelson M., Lobanov V.S. QSPR as a means of predicting and understanding chemical and physical properties in terms of structure // Pure Appl. Chem. – 1997. - V.69. – P. 245-248.
7. Дейнека В.И. Метод анализа относительного удерживания в ВЭЖХ. Определение, применения и роль параметра lgP системы н-октанол – вода. Ж. физ. химии. - 2006. - Т.80. - С. 1083-1088.
8. Cecchi T. «Ion-pair chromatography and related techniques» (Analytical chemistry series). CRS Press Taylor and Francis. 2010. – P. 29-39.
9. Katz S., Pitt W.W., Jr., Johnes G., Jr. Sensitive fluorescence monitoring of aromatic acids after anion-exchange chromatogramphy of body fluids // Clin. Chem. – 1973. – V.19. - P. 817-820.

Анисимович Ирина Петровна – ассистент кафедры общей химии Белгородского государственного университета

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного университета

Anisimovich Irina P., assistant, Belgorod State University, E-mail: anisimovich@bsu.edu.ru

Deineka Victor I. Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod State University, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского университета

Симаков Сергей Вадимович – к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгордского университета

Селеменев Владимир Федорович – д.х.н., профессор, зав.кафедрой аналитической химии Воронежского государственного университета

Deineka Ludmila A. Ph.D. (Chemistry), reader, Belgorod State University, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Simakov Sergey V. Ph.D. (Chemistry), reader, Belgorod State University, E-mail: simakov@031.ru

Selemenev Vladimir F. – Dr.Sci. (Chemistry) professor of Voronezh State University, Voronezh, E-mail: common@anch.vsu.ru

УДК 667. 5. 032.

Определение параметров удерживания флавоноидов методом тонкослойной хроматографии

Беланова Н.А., Карпов С.И., Селеменев В.Ф., Чепелева Е.О.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 30.04.2010 г.

Аннотация

Определены наиболее оптимальные системы хроматографирования для флавоноидов ((+)-катехина, кверцетина, рутина, нарингина). Показано влияние полярности растворителя на разделение флавоноидов методом ТСХ.

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

Optimal elution systems are determined for chromatographic separations of flavonoids ((+)-catechin, quercetin, rutin, naringin). It has been shown the influence of solvent polarity on the separation of flavonoids by TLC.

Keywords: TLS method, flavonoide, (+)-catechin, quercetin, rutin, naringin

Введение

В настоящее время флавоноиды пользуются непрерывно возрастающим вниманием исследователей. Это обусловлено в значительной степени их ценностью для медицины как источников противовоспалительных, противоопухолевых препаратов [1].

В настоящее время для определения флавоноидов применяют такие методы, как спектрофотометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, титриметрический метод определения, капиллярный электрофорез, тонкослойная хроматография [1-3]. Наиболее экспрессным из них является хроматография в тонком слое сорбента.

Эксперимент

Цель работы: выбор условий определения флавоноидов методом тонкослойной хроматографии.