

УДК 543.544:615.322

СОРБЦИОННО-ХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ГАЛЛОВОЙ, КОФЕЙНОЙ КИСЛОТ, РУТИНА И ЭПИКАТЕХИНА В ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТЕНИЯХ

**З.А. Темердашев, В.В. Милевская, Н.В. Киселева,
Н.А. Верниковская, В.А. Коробков**

*Кубанский государственный университет
Россия, 350040, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149
analyt@chem.kubsu.ru*

Поступила в редакцию 6 марта 2013 г.,
после исправления – 5 апреля 2013 г.

Изучены сорбционные процессы извлечения фенольных соединений из водных отваров образцов лекарственного растительного сырья (ЛРС) для их последующего хроматографического определения. На примере анализа модельных растворов и водных отваров зверобоя продырявленного и тысячелистника обыкновенного показано, что степени извлечения фенольных соединений с использованием концентрирующего патрона Диапак С18 выше по сравнению с сорбентом Диапак П (сверхсшитый полистирол) и вариантом использования жидкость-жидкостной экстракции. Оптимизированы условия сорбции и определения галловой, кофейной кислот и рутина с использованием сорбента Диапак С18.

Ключевые слова: твердофазная экстракция (ТФЭ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ), фенольные соединения, лекарственное растительное сырье.

Темердашев Зауаль Ахлоевич – доктор химических наук, профессор, зав. кафедрой аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ объектов окружающей среды, разработка аналитических схем контроля.

Более 180 опубликованных работ, в том числе ряда монографий и патентов.

Киселева Наталия Владимировна – кандидат химических наук, доцент кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – анализ объектов природного и промышленного происхождения, экологический мониторинг.

Автор более 80 опубликованных работ.

Верниковская Наталья Андреевна – кандидат химических наук, преподаватель кафедры аналитической химии КубГУ.

Область научных интересов – фенольные соединения и флавоноиды, лекарственное растительное сырье, хроматография.

Автор 4 опубликованных работ.

Коробков Владимир Алексеевич – аспирант кафедры неорганической химии факультета химии и высоких технологий КубГУ.

Область научных интересов – фенольные соединения и флавоноиды, объекты растительного происхождения, хромато-масс-спектрометрия, исследование свойств композитных материалов.

Милевская Виктория Васильевна – магистрант кафедры аналитической химии факультета химии и высоких технологий КубГУ.

Область научных интересов – фенольные соединения и флавоноиды, лекарственные растения, твердофазная экстракция, хроматография.

Введение

Наряду с синтетическими фармпрепаратами при лечении заболеваний воспалительного характера повышенным спросом пользуются лекарственные формы на основе лекарственного растительного

сырья. Практически все фитоматериалы содержат фенольные и полифенольные соединения – биологически активные вещества, обуславливающие фармакологические свойства растений. Оценку фитотерапевтического действия данных материалов проводят по содержанию веществ фенольной

природы [1]. Для определения индивидуальных фенольных соединений в этих материалах при их низких концентрациях используют обращено-фазовый вариант высокоэффективной жидкостной хроматографии (**ВЭЖХ**) [2]. Весьма сложной аналитической проблемой, требующей решения при проведении испытания такого рода материалов, является значительное влияние комплексного состава матрицы в неочищенных растительных экстрактах на результаты анализа. Для устранения этих недостатков, как правило, используется предварительная очистка и концентрирование фенольных веществ с применением способов, отличающихся вариантами исполнения и эффективностью. Среди них можно отметить методы жидкость-жидкостной (**ЖЖЭ**) или твердофазной экстракции (**ТФЭ**) на высокоэффективных сорбентах. Жидкость-жидкостная экстракция фенольных веществ характеризуется меньшими показателями степеней извлечения целевых компонентов, большим расходом растворителя и временными затратами [3, 4]. Одним из актуальных вариантов твердофазной экстракции является экстракция на полимерах с молекулярными отпечатками (**ПМО**) фенольных соединений. Однако использование ПМО требует индивидуального сорбента для каждого конкретного случая, кроме того, такие полимеры не применяются для целей группового концентрирования [5]. Поэтому в последние годы для определения низких содержаний компонентов и увеличения селективности способа концентрирования широкое применение находит предварительное сорбционное извлечение фенольных компонентов, в частности метод ТФЭ. Данный подход является наиболее эффективным и универсальным способом выделения, очистки и концентрирования веществ фенольной природы из достаточно сложных по составу растительных образцов, что позволяет значительно упростить процедуру анализа и улучшить метрологические характеристики метода [6].

Целью данной работы являлось изучение процессов сорбционного извлечения фенольных веществ из матриц ЛРС для последующего их хроматографического определения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования служили образцы ЛРС: травы зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), травы тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), цветки календулы аптечной (*Calendula officinalis* L.), листья подорожника большого (*Plantago major* L.) и кора дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) («Фитофарм», Анапа), приобретенные в аптечной сети. В качестве стандартных образцов использовали фенольные соединения: галловая кислота, кофейная кислота, рутин, (-)-эпикатехин («Сигмабиосинтез», Россия; содержание чистого вещества не менее 99 %). Рабочие растворы

готовили по точным навескам растворением исходных веществ в воде или ацетонитриле сорта 0 («Криохром», Россия).

Для приготовления водных экстрактов навеску ЛРС массой 2.0000 г помещали в коническую колбу (500 мл) с обратным холодильником, заливали горячей дистиллированной водой, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор (отвар [1]) фильтровали через вату в мерную колбу на 250 мл, сырье промывали водой несколько раз, доводили водой до метки. Затем раствор перемешивали и перед анализом аликвоту фильтровали через мембранный фильтр SFCA с диаметром пор 0.45 мкм (Corning, Германия).

Идентификацию и определение фенольных компонентов в ЛРС проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-спектрофотометрическим детектированием на основе диодной матрицы (**ВЭЖХ-УФ-ДМД**) на хроматографе «Shimadzu LC 20 Prominence» (Япония); УФ-детектор SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Колонка Zorbax SB C18 (150×2.1 мм, 5 мкм, Agilent, США). Для приготовления буферного раствора использовали дигидрофосфат калия (х.ч.), необходимое значение pH = 2.80 устанавливали добавлением раствора фосфорной кислоты. Условия хроматографирования представлены в работе [7].

Исследования экстрактов проводили методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором Shimadzu GCMS-QP2010 Plus (Япония) с использованием колонки HP-Ultra 2 (25 м × 0.32 мм, толщина 0.52 мкм; Agilent, США), газ-носитель – гелий. Условия хроматографирования были опубликованы в работе [8]. Перед анализом водный экстракт пропускали через концентрирующий патрон, целевые компоненты десорбировали порцией ацетонитрила, элюат сушили в токе азота и растворяли сухой остаток в 1 мл ацетонитрила [9], затем образец подвергали дериватизации N,O-бис-(триметилсилил)-трифторацетамидом. При идентификации веществ использовали технологию поиска путем сравнения полученного масс-спектра неизвестного соединения с масс-спектром из библиотеки NIST 0.5, Willey 8.

В качестве концентрирующих материалов использовали патроны Диапак C18 («Биохиммак», Россия), заполненные сорбентом на основе октадецилсилана (размер частиц 40-63 мкм, диаметр пор 6 нм), и Диапак П («Биохиммак», Россия), заполненные сорбентом на основе сверхсшитого полистирола (ССПС) (размер частиц 50-100 мкм, диаметр пор 1-100 нм). Подготовку патрона осуществляли по методике, рекомендованной в работе [10], путем его последовательного промывания 10 мл ацетонитрила и 100 мл дистиллированной воды. Для получения динамических кривых водный раствор соответствующего фенольного соединения пропускали через патрон с заданной

скоростью. Содержание аналита в каждой порции элюата контролировали методом ВЭЖХ-УФ-ДМД.

Эффективность экстракционного процесса аналитов оценивали с использованием различных способов пробоподготовки: с применением патронов Диапак С18, Диапак П (ССПС). Для извлечения фенольных соединений из травы тысячелистника обыкновенного и травы зверобоя продырявленного водные отвары ЛРС пропускали через патроны Диапак С18 и Диапак П. Затем компоненты десорбировали 30 мл ацетонитрила, полученный элюат сушили в токе азота, после чего сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила. Для проведения жидкость-жидкостного извлечения аналитов проводили экстракцию с использованием этилацетата. Для этого к водному отвару анализируемого образца добавляли этилацетат в соотношении 1 : 1, встряхивали в течение 10 мин, затем оставляли для разделения слоев на 15 мин, 1 мкл полученного экстракта вводили в систему ГХ-МС.

Для оптимизации условий извлечения определяемых компонентов концентрирующими патронами изучали десорбцию фенольных веществ при минимальном объеме элюента. Для этого предварительно через патрон пропускали по 1 мл водных или ацетонитрильных растворов галловой и кофейной кислот с концентрацией 100 мкг/мл и рутина с концентрацией 50 мкг/мл с заданным значением рН, которое варьировали в пределах от 2.0 до 4.0 с шагом 0.5. Вещества элюировали с сорбента ацетонитрилом с заданной скоростью. Содержание определяемого компонента контролировали в каждой фракции десорбата методом ВЭЖХ-УФ-ДМД.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сложность процедуры анализа образцов ЛРС связана с необходимостью учета влияния их многокомпонентной матрицы [11]. Поэтому в процессе пробоподготовки с применением ТФЭ изучали возможность концентрирования аналита

и очистки пробы на сорбирующем патроне в условиях мешающего влияния матрицы.

На первом этапе оценивали степень количественного извлечения сорбируемых компонентов фенольной природы (в частности галловой кислоты, кофейной кислоты и кверцетина – представителей бензойных, гидроксикоричных кислот и флавоноидов соответственно) на сорбентах с применением метода ВЭЖХ с диодно-матричным детектированием. Степени извлечения фенольных соединений на сорбентах Диапак С18 и Диапак П составили соответственно: $83 \pm 2 \%$ и $81 \pm 5 \%$ для галловой, $71 \pm 7 \%$ и $67 \pm 8 \%$ для кофейной кислот, $99 \pm 2 \%$ и $64 \pm 8 \%$ для кверцетина. Разница в степенях извлечения целевых компонентов обусловлена, по-видимому, отличиями во взаимодействии между сорбирующим материалом и аналитами, а полнота десорбции определяемых веществ зависит от количества остаточных силанольных групп Si-OH на поверхности силикагеля [11]. Относительно малая величина степени извлечения кверцетина с сорбента на основе сверхсшитого полистирола по сравнению с С18 связана с наличием дополнительных индукционных взаимодействий между матрицей сорбента и сорбируемым компонентом, что обусловлено подобием их химической природы. Исходя из полученных количественных характеристик, для осуществления группового концентрирования дальнейшие исследования проводились на патроне с привитой октадецильной фазой.

Установление параметров сорбционного процесса. На процесс сорбции компонентов в динамическом режиме влияют следующие параметры: рН среды, скорость подачи растворителя, уровень содержания определяемого компонента в образце. Для установления оптимальных условий процедуры ТФЭ нами варьировался каждый из указанных показателей в системе «сорбент - целевой компонент» при постоянстве значений других.

Предварительно были получены динамические кривые на модельных водных растворах галловой и кофейной кислот с концентрацией 100 мкг/мл и рутина с концентрацией 50 мкг/мл (рис. 1),

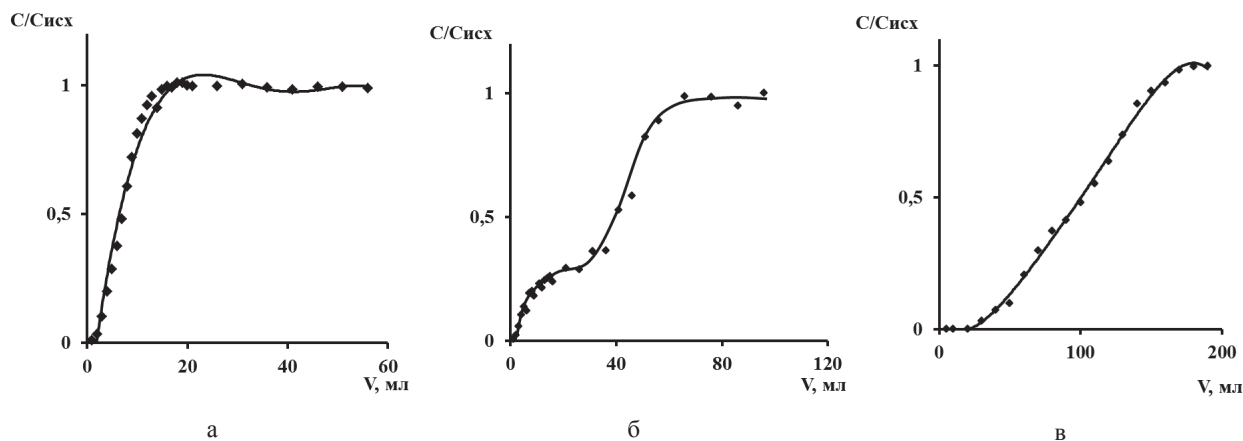


Рис. 1. Динамические кривые сорбции фенольных соединений: а – галловой кислоты (с концентрацией = 100 мкг/мл); б – кофейной кислоты (100 мкг/мл); с – рутина (50 мкг/мл). Скорость подачи раствора 1 мл/мин, патрон Диапак С18, $n = 2$

Таблица 1

Степени извлечения аналита (R , %) при различных значениях pH ($V = 1$ мл/мин; $C_{\text{галл. кисл.}} = 10$ мкг/мл, $C_{\text{коф. кисл.}} = 20$ мкг/мл, $C_{\text{рутин}} = 25$ мкг/мл) ($n = 4$, $P = 0.95$)

Аналит	Значение pH				
	4.0	3.5	3.0	2.5	2.0
Галловая кислота	87 ± 7	84 ± 8	100 ± 6	80 ± 7	63 ± 8
Кофейная кислота	68 ± 5	82 ± 9	106 ± 7	64 ± 7	52 ± 9
Рутин	68 ± 12	80 ± 7	103 ± 7	70 ± 8	43 ± 8

по которым установлены объемы «до проскока» на уровне 5 % для галловой и кофейной кислот и рутина, которые составляют 0.25 мл, 0.75 мл и 28.00 мл соответственно.

Содержание фенольных соединений зависит от морфологических особенностей ЛРС, условий произрастания и составляют для галловой кислоты менее 1 мг/г, кофейной кислоты – около 2 мг/г, а для рутина – 3 мг/г сухого сырья [8, 12-16]. Поэтому представлялось необходимым для галловой, кофейной кислот и рутина получить динамические кривые при более низких концентрациях. Условия получения динамических кривых оставались неизменными на фоне уменьшения концентрации фенольного соединения. В результате были получены динамические кривые при различных концентрациях, сравнительный анализ которых привел к выводу, что сорбционная форма кривой при переходе к растворам с концентрацией веществ, соответствующей уровню их содержания в реальных образцах, остается неизменной.

Известно, что форма фенольных веществ (молекулярная или ионная) может существенно влиять на их поведение на октадецилсилане [11, 17], поэтому изучалось влияние pH на степень извлечения фенольных компонентов. Согласно полученным данным (табл. 1), для извлечения галловой, кофейной кислот и рутина оптимальным значением является pH = 3.0, при котором наблюдаются максимальные степени извлечения: 100 ±

6 %, 106 ± 7 %, 103 ± 7 % для всех трех веществ соответственно.

Высокие значения степеней извлечения аналитов при низких pH свидетельствуют о подавлении диссоциации фенольных соединений, что повышает их сродство к неполярному сорбенту. Однако при pH < 2.5 наблюдается снижение количества извлекаемого аналита, что объясняется, по-видимому, малой химической стойкостью силикагеля при пониженных pH [18, 19]. В области нейтральных и щелочных pH происходит диссоциация молекул фенольных соединений, что отрицательно сказывается на значениях степеней извлечения. На основании анализа кривых десорбции фенольных соединений можно заключить, что для извлечения из концентрирующего патрона, заполненного сорбентом С18 ($m = 2$ г), каждого компонента требуется сравнительно малые количества элюента (ацетонитрила) – 3-4 мл, что является безусловным преимуществом применяемого подхода.

В процессе ТФЭ аналита, наряду с разделением, возможно концентрирование определяемых веществ. Анализ полученных динамических кривых сорбции фенольных соединений показал, что в этих условиях ($V = 1$ мл/мин; pH = 3; $C_{\text{галл. кисл.}} = 100$ мкг/мл, $C_{\text{коф. кисл.}} = 100$ мкг/мл, $C_{\text{рутин}} = 50$ мкг/мл) концентрируется только рутин (объем «до проскока» составляет 28 мл) (рис. 1). Возможность повышения степени концентрирования других фенольных веществ на сорбенте С18 оценивалась путем варьирования

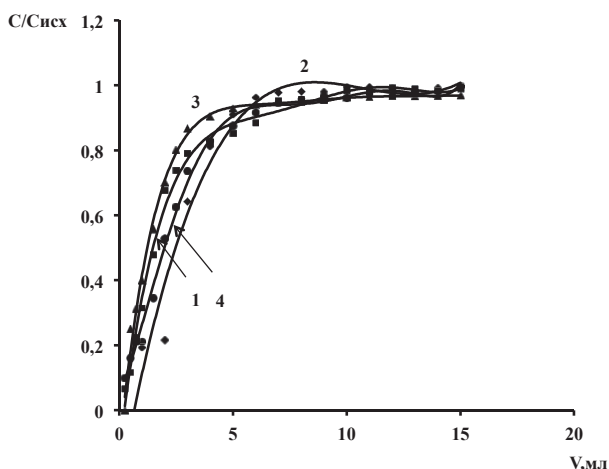


Рис. 2. Динамические кривые сорбции галловой кислоты на патроне Диапак С18 при различных скоростях потока, мл/мин: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 1.5, 4 – 2.0

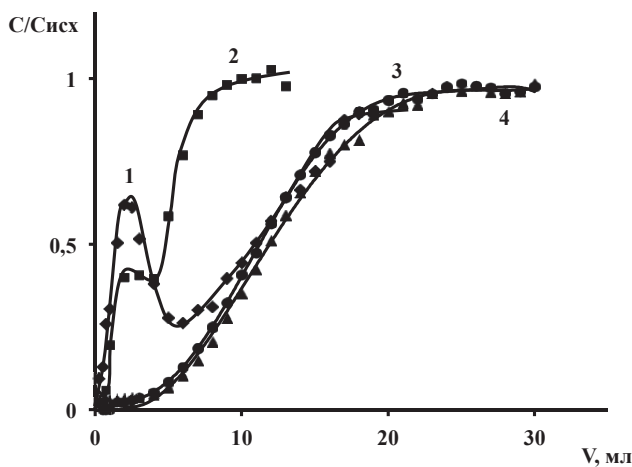


Рис. 3. Динамические кривые сорбции кофейной кислоты на патроне Диапак С18 при различных скоростях потока, мл/мин: 1 – 0.5, 2 – 1.0, 3 – 1.5, 4 – 2.0

скорости подачи модельных растворов с низкими концентрациями галловой кислоты (10 мкг/мл) и кофейной кислоты (20 мкг/мл) в пределах от 0.5 до 2.0 мл/мин с шагом 0.5 через патрон (рис. 2, 3). Нижняя граница значения скорости подачи раствора ограничена аппаратными возможностями. Увеличение скорости подачи растворителя более 2.0 мл/мин приводит к уменьшению «объема до проскока».

При увеличении скорости пропускания сорбционный профиль галловой кислоты не меняется, для кофейной кислоты при скорости 0.5 и 1.0 мл/мин наблюдается наличие двух сорбционных максимумов, а при 1.5 и 2.0 мл/мин – только одного. В последнем случае (при малой скорости потока), по-видимому, сначала преобладает мономолекулярная адсорбция кофейной кислоты на поверхности С18, а затем происходит образование полимолекулярных слоев за счет межмолекулярного взаимодействия с последующей десорбцией аналита [20]. С увеличением скорости пропускания раствора этот эффект, по-видимому, нивелируется. Низкие значения объемов «до проскока» значительно затрудняют концентрирование гидрофильной галловой кислоты из водных растворов с применением сорбента С18, а концентрирование кофейной кислоты при пропускании раствора со скоростью 2.0 мл/мин возможно из объема не более 4.0 мл.

В оптимизированных условиях сорбционного извлечения фенольных соединений изучали возможность их концентрирования из водных отваров ЛРС. При концентрировании галловой кислоты из водного экстракта коры дуба черешчатого [21] происходит потеря целевого аналита на стадии сорбции. Кофейная кислота в составе календулы аптечной не подвергается концентрированию в условиях анализа реального объекта из-за слабого удерживания на сорбенте, а также влияния на сорбционную емкость многочисленных компонентов матрицы растительного образца. Рутин, который содержит гидрофобные А и Б кольца, связанные трехчленным углеродным фрагментом, характерным для данной группы веществ, эффективно концентрируется на октадецилсилане. Гидрофобность

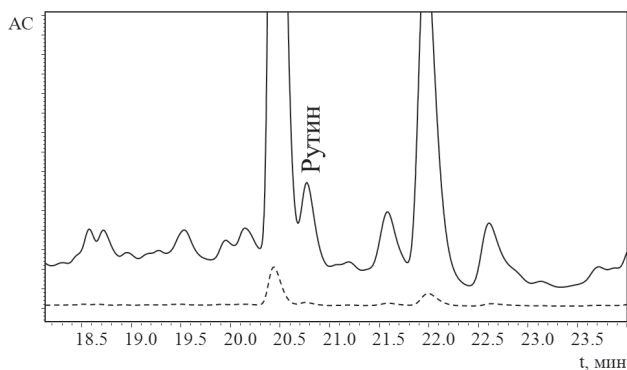


Рис. 4. Хроматограммы водного отвара листьев подорожника большого до (---) и после (—) концентрирования на патроне Диапак С18

рутина обеспечивает наличие неспецифических взаимодействий с неполярной углеводородной фазой сорбента, в результате, структурные особенности позволяют молекуле рутина в большей степени удерживаться на поверхности силикагеля, что определяет возможность его концентрирования примерно в 19 раз. Данный факт подтверждается хроматограммой водного отвара листьев подорожника большого до и после концентрирования на патроне С18 (рис. 4).

Изучалась возможность концентрирования (-)-эпикатехина из водного отвара травы зверобоя продырявленного (рис. 5), содержание которого в данном растительном образце подтверждено ранее [8]. Концентрирование низких содержаний (-)-эпикатехина примерно в 12 раз обеспечивается его сравнительно высоким сродством к поверхности модифицированного силикагеля и возможностью образования внутримолекулярных водородных связей между гидроксильными группами заместителей во втором и третьем положениях, а также ослаблением неспецифического взаимодействия между (-)-эпикатехином и подвижной фазой, и, как следствие, увеличением дисперсионных взаимодействий аналита с неполярной неподвижной фазой [17].

В целях оценки возможности устранения матричного влияния и достижения полноты извлечения аналитов в условиях хроматографического анализа изучены три способа пробоподготовки исходного ЛРС с использованием концентрирующих патронов, заполненных сорбентами на основе силикагеля с привитой фазой С18 и ССПС, а также этилацетатной экстракции аналита. Оценку эффективности способов пробоподготовки проводили для травы зверобоя продырявленного по трем основным компонентам: рутину, (-)-эпикатехину, протокатеховой кислоте; и по пяти компонентам для травы тысячелистника обыкновенного: кофейной кислоте, трем соединениям группы кофеилхинных кислот и лютеолину. Количественную оценку содержания вышеуказанных соединений определяли по внешнему стандарту – феруловой кислоте (табл. 2, 3).

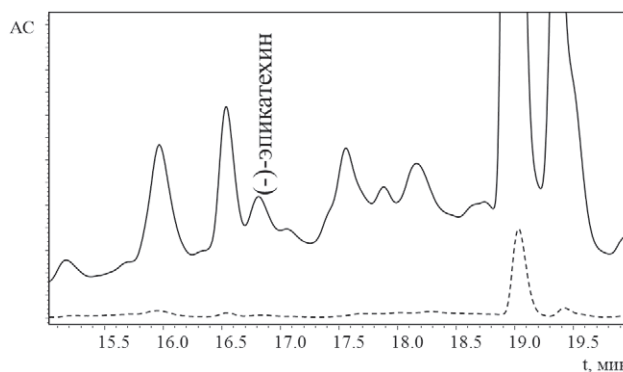


Рис. 5. Хроматограммы водного отвара травы зверобоя продырявленного до (---) и после (—) концентрирования на патроне Диапак С18

Таблица 2

Содержания фенольных соединений в водном отваре травы зверобоя продырявленного ($n = 3, P = 95 \%$).

Название вещества	Отвар	С 18		ССПС		Этилацетатная экстракция	
	<i>m</i> , мг/г	<i>m</i> , мг/г	<i>R</i> , %	<i>m</i> , мг/г	<i>R</i> , %	<i>m</i> , мг/г	<i>R</i> , %
Рутин	5.1 ± 0.1	2.50 ± 0.02	49	0.09 ± 0.01	1.8	0.41 ± 0.02	8
(-)-эпикатехин	0.78 ± 0.02	0.66 ± 0.02	85	н.о.	н.о.	0.30 ± 0.04	39
Протокатеховая кислота	0.29 ± 0.04	0.31 ± 0.06	104	н.о.	н.о.	0.30 ± 0.04	103

Примечание: «н.о.» – не обнаружено.

Данные табл. 2 и 3 показывают, что в экстракте, полученном после пропускания через сорбент С18, обнаруживаются все компоненты, идентифицированные в исходном отваре со сравнительно высоким содержанием (от 50 % и выше). В то же время в экстракте, полученном после элюирования через ССПС, (-)-эпикатехин и протокатеховая кислота в траве зверобоя продырявленного находятся ниже пределов их обнаружения, а в траве тысячелистника обыкновенного содержания кофейной, 5-О-кофеилхинной, 3-О-кофеилхинной, 3,4-О-дикофеилхинной кислот и др. соединений находятся в значительно меньших, по сравнению с исходным водным экстрактом, количествах, что свидетельствует о существенных потерях целевых компонентов в процессе сорбции аналитов. Это объясняется высокой сорбционной активностью сверхсшитого полистирола по отношению к определяемым веществам [11]. При использовании жидкость-жидкостной экстракции в этилацетатном экстракте также обнаруживаются меньшие содержания фенольных веществ, что обусловлено

невысоким распределением данных компонентов в среде этилацетата.

Таким образом, применение сорбента с привитой фазой С18 для пробоподготовки является наиболее оптимальным и может быть реализовано в рамках ВЭЖХ-анализа.

ТФЭ, наряду с концентрированием аналита, обеспечивает снижение содержания матричных компонентов в пробе, что особенно актуально для ЛРС, в составе которого наряду с фенольными кислотами и флавоноидами содержатся сахара, хлорофилл, липиды, терпены, алкалоиды, сапонины, смолы, каротиноиды, воски и другие продукты метаболизма [22, 23]. В ходе исследований методом ГХ-МС оценивали эффективность использования сорбентов для очистки водных экстрактов лекарственных растений от матричных компонентов (рис. 6, 7). После пропускания водного отвара травы тысячелистника обыкновенного через сорбенты С18 и ССПС на хроматограмме отсутствуют сахара (D-галактозы, D-глюкозы, β-L-галактопиранозы, гексапиранозы и др.), которые элюируются водой.

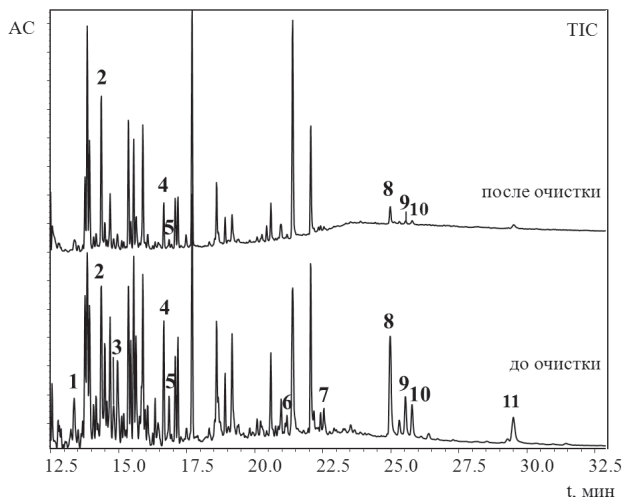


Рис. 6. Хроматограммы водного отвара травы тысячелистника обыкновенного до и после очистки на С18: 1 – глюконовая кислота, 2 – шикимовая кислота, 3 – D-галактоза, 4 – инозитол, 5 – кофейная кислота, 6 – D-фруктоза, 7 – 6,7-дигидроксикумарин, 8 – 5-О-кофеилхинная кислота, 9 – 4-О-кофеилхинная кислота, 10 – 3-О-кофеилхинная кислота, 11 – глюкopiранозид гидрохинона. TIC – total ion current (полный ионный ток)

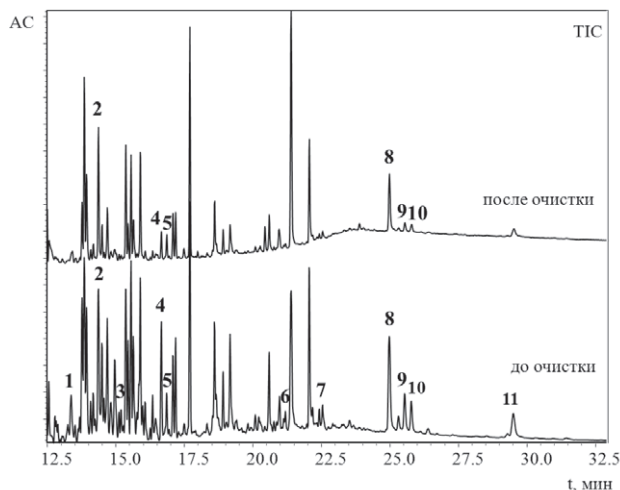


Рис. 7. Хроматограммы водного отвара травы тысячелистника обыкновенного до и после очистки на ССПС: 1 – глюконовая кислота, 2 – шикимовая кислота, 3 – D-галактоза, 4 – инозитол, 5 – кофейная кислота, 6 – D-фруктоза, 7 – 6,7-дигидроксикумарин, 8 – 5-О-кофеилхинная кислота, 9 – 4-О-кофеилхинная кислота, 10 – 3-О-кофеилхинная кислота, 11 – глюкopiранозид гидрохинона. TIC – total ion current (полный ионный ток)

Таблица 3

Содержания фенольных соединений в водном отваре травы тысячелистника обыкновенного ($n = 3$, $P = 95\%$).

Название вещества	Отвар	С 18		ССПС		Этилацетатная экстракция	
	m , мг/г	m , мг/г	R , %	m , мг/г	R , %	m , мг/г	R , %
Кофейная кислота	0.108 ± 0.004	0.10 ± 0.03	93	0.075 ± 0.006	69	0.098 ± 0.002	91
5-О-кофеилхинная кислота	0.27 ± 0.02	0.22 ± 0.01	82	0.11 ± 0.03	41	н.о.	н.о.
3-О-кофеилхинная кислота	2.7 ± 0.3	2.03 ± 0.01	77	0.9 ± 0.1	33	0.010 ± 0.002	0.4
3,4-О-дикофеилхинная кислота	0.83 ± 0.06	0.67 ± 0.05	81	0.31 ± 0.01	37	0.08 ± 0.01	10
Лютеолин	1.5 ± 0.1	1.0 ± 0.1	67	0.43 ± 0.02	29	0.53 ± 0.06	35

Примечание: «н.о.» – не обнаружено

Отсутствие в экстракте сопутствующих компонентов матрицы позволяет получить хроматограмму с меньшим количеством пиков, что обеспечивает лучшее разрешение и селективность определения. В оптимизированных условиях пробоподготовки фенольные соединения практически количественно извлекаются в экстракт, и представляется возможным идентификация и определения исследуемых аналитов методом ГХ-МС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучены сорбционные процессы извлечения фенольных соединений из водных отваров ЛРС для их последующего хроматографического определения. На примере анализа модельных растворов и водных отваров зверобоя продырявленного и тысячелистника обыкновенного показано, что степени извлечения фенольных соединений с использованием концентрирующего патрона Диапак С18 выше по сравнению с сорбентом Диапак П (сверхсшитый полистирол) и вариантом использования жидкость-жидкостной экстракции. Оптимизированы условия сорбции и определения галловой, кофейной кислот и рутина с использованием сорбента Диапак С18.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фармакопея СССР. Изд. 11. Вып. 2. Москва, 1990.
2. Evaluation of the antioxidant properties of fruits / M. Garcia-Alonso et [al.] // Food Chem. 2004. № 84.Р. 13-18.
3. Zgorka G., Kawka S. Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations // J. Pharmaceut. and Biomed. Anal. 2001. № 24. P. 1065-1072.
4. Suarez B., Picinelli A., Mangas J. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders // J. Chromatogr. A. 1996. № 727. P. 203-209.

5. Кудринская В., Дмитриенко С., Золотов Ю.А. Синтез и исследование сорбционных свойств полимеров с молекулярными отпечатками кварцетина // Вестник Московского университета. Сер. 2. Химия. 2009. V. 50. № 3. P. 156-163.
6. Сапрыкин Л.В., Сапрыкина Л.В. Методология аналитического применения твердофазной экстракции // Сорбционные и хроматографические процессы. 2007. Т. 7, Вып. 3. С. 397-409.
7. Темердашев З.А., Фролова Н.А., Колычев И.А. Определение фенольных соединений в лекарственных растениях методом обращено-фазовой ВЭЖХ // Ж. аналит. химии. 2011. V. 66. P. 417-424.
8. Определение фенольных соединений и флавоноидов в водных экстрактах лекарственных растений / З.А. Темердашев и [др.] // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. 2011. № 11. С. 22–26.
9. Сорбционное извлечение фенольных соединений из водных экстрактов лекарственных растений / З.А. Темердашев и [др.] // Тез. Докл. III Всероссийского симпозиума с международным участием «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии». Краснодар, 2011. С. 142.
10. Разделение и определение фенолкарбоновых кислот методом капиллярного зонного электрофореза с предварительным динамическим концентрированием на сверхсшитом полистироле / О. Медведева и [др.] // Ж. аналит. химии. 2004. Т. 59, № 7. С.752–759.
11. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка // Сорбционные и хроматографические процессы. 2004. Т. 4. Вып.1. С. 5-28.
12. Quantitative HPLC determination of phenolic compounds in Yarrow / R. Benetis et [al.] // J. Pharmaceut. Chem. 2008. V. 42, № 3. С. 51-54.
13. Kivilompolo M., Huuhtyläinen T. On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction–liquid

chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs // J. Chromatogr. A. 2009. № 1216. P. 892-896.

14. Leucuta S., Vlase L., Gocan S. Determination of Phenolic Compounds from *Geranium sanguineum* by HPLC // J. Liq. Chromatogr. & Relat. Technol. 2005. № 28. P. 3109-3117.

15. Thabti I., Elfalleh W., Hannachi H. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS // J. Funct. Foods. 2012. № 4. P. 367-374.

16. Carvalho I. S., Cavaco T., Brodelius M. Phenolic composition and antioxidant capacity of six artemisia species // Ind. Crops Products. 2011. № 33. P. 382-388.

17. Шафигулин Р.В. Физико-химические особенности сорбции гетероциклических соединений природного и синтетического происхождения в условиях ОФ ВЭЖХ / [Электронный ресурс]: diss.rsl.ru, 2007.

18. Шатц В. Д., Сахартова О. В. Высокоэффективная жидкостная хроматография: Основы те-

ории. Методология. Применение в лекарственной химии. Рига: Зинатне, 1988. 390 с.

19. Стыскин Е.Л., Ициксон Л.Б., Брауде Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. М.: Химия, 1986. 288 с.

20. Смирнова, О. В. Исследование адсорбции и десорбции феноксикарбоновых кислот на поверхности кремнезема // Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. 2008. Т. 6, № 1. С. 291-302.

21. О влиянии биологически активных веществ на антиоксидантную активность фитопрепаратов / Е.И. Шкарина и [др.] // Химико-фармацевтический журн. 2001. Т. 35, № 6. С. 41-47.

22. Naczki M., Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis // J. Pharmaceut. and Biomed. Anal. 2006, № 41. P. 1523-1542.

23. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis / G. Romanik et al. // J. Biochem. Biophys. Meth. 2007. № 70. P. 253-261.

SORPTION-CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF GALLIC, CAFFEIC ACIDS, RUTIN AND (-)-EPICATECHIN IN HERBS

Z.A. Temerdashev, V.V. Milevskaya, N.V. Kiseleva,
N.A. Vernikovskaya, V.A. Korobkov

Kuban State University
149 Stavropolskaya St., 350040 Krasnodar, Russia
analyt@chem.kubsu.ru

The sorption processes of solid-phase extraction of phenolic compounds from water extracts of medicinal herbs followed by chromatographic technique have been studied. Using model aqueous solutions and water extracts of *Hypericum perforatum* and *Achillea millefolium* the Diapak C18 recoveries overcome versus Diapak P (hypercross-linked polystyrene) and liquid-liquid extraction technique. The conditions of sorption extraction and determination of gallic acid, trans-caffeic acid and rutin using the sorbent Diapak C18 were optimized.

Key words: solid-phase extraction (SPE), high-performance liquid chromatography (HPLC), phenolic compounds, medicinal herbs.