

ИЗУЧЕНИЕ ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОГО ПОВЕДЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ С ЦЕЛЬЮ РАЗРАБОТКИ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ К ИХ АНАЛИЗУ В УСЛОВИЯХ КАПИЛЛЯРНОГО ЗОННОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

Сенченко С.П., Компанцева Е.В.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО «ВолгГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532, Ставропольский край, г.Пятигорск, пр-т Калинина, 11), asp_nauka@mail.ru

На примере 15 флавоноидов, являющихся представителями флавонов, флаванонов, флавонолов и флаванолонов, изучены закономерности электрофоретического поведения флавоноидов в электролитах различного состава и pH в условиях капиллярного зонного электрофореза. За счет процессов комплексообразования с диольными группами флавоноидов боратный электролит по параметрам эффективности и селективности является более предпочтительным в сравнении с фосфатным и карбонатным. Установлено, что боратный электролит с pH 9,2 может использоваться в качестве исходного при разработке методик. В работе показана зависимость эффективной электрофоретической подвижности флавоноидов от их молекулярной массы и количества фенольных гидроксильных групп. Сформулированные методологические подходы по анализу флавоноидов методом капиллярного зонного электрофореза могут быть использованы при разработке методик их анализа данным методом.

Ключевые слова: капиллярный электрофорез, капиллярный зонный электрофорез, флавоноиды, флавоны, флаваноны, флавонолы, флаванололы, электрофоретическая подвижность.

DEVELOPMENT OF METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE ANALYSIS OF AROMATIC ACIDS UNDER CONDITIONS OF CAPILLARY ZONE ELECTROPHORESIS

Senchenko S.P., Kompanceva E.V.

Pyatigorsk medico-pharmaceutical institute – branch to Volgograd State Medical University, Pyatigorsk, Russia (357532, Stavropol region, Pyatigorsk, st. Kalinin, 11), asp_nauka@mail.ru

On example, of 15 flavonoids, which are representatives of flavones, flavanones, flavonols and flavanonols, the patterns of electrophoretic behavior of flavonoids in electrolytes of different composition and pH under conditions of capillary zone electrophoresis is studied. At the expense of the formation of complexes with diol groups of flavonoids borate electrolyte on the parameters of efficiency and selectivity is more preferable in comparison with phosphate and carbonate. It is established that the borate electrolyte with a pH of 9.2 can be used as a baseline when developing methods. The work shows the dependence of the effective electrophoretic mobility of flavonoids on their molecular weight and the number of phenolic hydroxyls. The methodological approaches for the analysis of flavonoids by capillary zone electrophoresis can be used in the development of techniques for their analysis by this method.

Keywords: capillary electrophoresis, capillary zone electrophoresis, flavonoids, flavones, flavanones, flavonols.

Флавоноиды – наиболее многочисленный класс природных фенольных соединений, для которых характерно структурное многообразие, высокая и разносторонняя активность и малая токсичность. Широта терапевтического действия, присущего флавоноидам, многообразие их физико-химических свойств обусловили создание большого числа препаратов на их основе. Помимо мягкого действия на организм, флавоноиды обладают ценным свойством быстрой эвакуации и отсутствием кумуляции. Флавоноидные препараты необходимы не только для лечения заболеваний, но и для профилактики различных нарушений у здоровых лиц[7].

При исследовании растительного сырья, в котором основными биологически активными веществами являются флавоноиды, необходимо наличие достоверных методик анализа, позволяющих качественно и количественно определить соответствующий флавоноид в пробе сложного многокомпонентного состава. Масс-спектрометрия (МС) в тандеме с хроматографией (ВЭЖХ) или капиллярным электрофорезом (КЭ) является методом выбора в данном случае. Однако в настоящее время эти комбинации используются только в научно-исследовательских работах по изучению состава флавоноидных соединений в различных растительных объектах [11]. Согласно нормативной документации (НД) на лекарственное растительное сырье (ЛРС) и препараты из ЛРС, анализ индивидуальных флавоноидов проводят с помощью обращенно-фазового варианта ВЭЖХ с СФ-детектором: определение рутина в гречишном траве, синенсетина в ортосифона листьях, апигенина-7-глюкозида в ромашке цветках и т.д. [4]. Вместе с тем, как и любой другой метод, ВЭЖХ не может быть универсальным в данном случае, так как структурные различия между флавоноидами могут быть достаточно незначительными и особенно большие сложности возникают при разделении веществ, имеющих близкие параметры гидрофобности. В этом случае необходимо применение особых колонок, применение сложного градиента, а также использование различного рода добавок к элюенту.

На сегодня перспективной альтернативой методу ВЭЖХ является КЭ. Среди основных преимуществ данного метода можно назвать экономичность, высокую эффективность и особенности механизма разделения веществ, так как величины отношений заряда к радиусу могут отличаться в большей степени, нежели значения коэффициента распределения ($\log P$).

В то же время метод КЭ не используется в НД на ЛРС и препараты из ЛРС, содержащие флавоноиды. Например, несмотря на наличие общей фармакопейной статьи на метод КЭ, в европейскую фармакопею не включено ни одного растительного объекта, анализ биологически активных веществ которого проводился бы с его помощью [4]. Необходимо также отметить, что на сегодня накоплен определенный научный опыт анализа флавоноидов данным методом. Так, только по данным популярного интернет-ресурса *pubmed.com* [19], число публикаций на эту тему составляет более 350.

Такая недооценка фармакопеями отчасти связана с отсутствием описанных закономерностей электрофоретического поведения, а также общих подходов к анализу флавоноидов данным методом, поскольку подавляющая часть исследований сводится к эмпирическому поиску условий анализа флавоноидов в конкретных объектах.

Значительная часть данных работ посвящена анализу именно в условиях капиллярного зонного электрофореза (КЗЭ), как самого простого варианта, где флавоноиды анализируются в щелочных электролитах с $\text{pH} \geq 8$. Выбор области pH электролита связан с

особенностями их физико-химических свойств, т.к. заряженными частицами флавоноиды могут быть только в щелочной среде, ионизируясь по фенольным гидроксилам. Об этом свидетельствуют приведенные в литературе значения pK_a для агликонов различных групп флавоноидов (табл. 1).

Таблица 1

Литературные данные значений pK_a для флавоноидов различных групп

| Группа | Флавоноид | pK_{a1} | pK_{a2} | pK_{a3} | Источник |
|------------|---------------------|-----------|-----------|-----------|----------|
| Флавоон | Апигенин | 6,60 | 9,30 | - | [8] |
| | Лютеолин | 6,90 | 8,60 | 10,30 | [8] |
| Флаванонон | Гесперетин | 6,80 | 10,40 | - | [13] |
| Флавонол | Кемпферол | 6,96 | 8,78 | 10,60 | [10] |
| | Кверцетин | 7,10 | 9,09 | 11,12 | [10] |
| Флаванол | Дигидроксикверцетин | 6,68 | 8,89 | 10,95 | [15] |

Несмотря на различие в строении, для всех групп характерны схожие области pK_a , обуславливающие использование щелочных электролитов в их анализе.

Определяющим фактором в КЗЭ является собственная или эффективная электрофоретическая подвижность (ЭЭП) частицы ($\mu_{эф}$), которая, в свою очередь, зависит от двух основополагающих факторов: заряда и радиуса частицы при условии постоянных значений вязкости (формула 1) [6].

$$\mu_{эф} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (1)$$

q – заряд иона;

η – вязкость раствора;

r – радиус иона.

В эксперименте $\mu_{эф}$ рассчитывают по разности между общей (наблюдаемой) электрофоретической подвижностью и электрофоретической подвижностью электроосмотического потока (ЭОП) по формуле 2 [6]:

$$\mu_{эф} = \frac{L_{общ} \times L_{эф}}{U} \left(\frac{1}{t_i} - \frac{1}{t_{ЭОП}} \right) \quad (2)$$

$L_{общ}$ – общая длина капилляра, см;

$L_{эф}$ – эффективная длина капилляра, см;

U – величина рабочего напряжения, вольт;

t_i – время миграции компонента, с;

$t_{ЭОП}$ – время миграции маркера ЭОП, с.

Известно, что в КЗЭ при условии постоянства параметров прибора (геометрия капилляра, температура, напряжение, длина волны) ключевыми факторами, влияющими на подвижность и соответственно на выбор условий анализа, являются состав электролита, его

pH и концентрация [2;6]. При выборе электролита определенного состава необходимо учитывать не только его достаточную буферную емкость и малое поглощение в выбранной длине волны, но также и способность вступать во взаимодействие с анализируемыми компонентами, что также может влиять на $\mu_{эф}$. Например, в литературе описана способность флавоноидов вступать в процессы комплексообразования с боратным электролитом [12; 16; 17]. Что касается pH электролита, то данный параметр является наиболее важной переменной. Величина pH ведущего электролита определяет как скорость ЭОП, так и форму нахождения компонента в растворе, поскольку он влияет на заряд самой частицы. Но если при pH 8 и более (условия анализа флавоноидов) скорость ЭОП меняется не значительно, т.к. уже достигает своего максимума [5], то влияние на заряд частиц будет определяющим, учитывая pKa флавоноидов (табл. 1). Ионная сила электролита оказывает существенное влияние на скорость потока и соответственно на скорость аналитов, причем подвижности их (наблюдаемые) будут обратно пропорциональны корню квадратному из концентрации буфера. Поэтому буферы низкой концентрации (менее 20 мМ) обеспечивают максимально быстрое разделение [6]. При этом необходимо учитывать, что увеличение концентрации не всегда повышает селективность анализа, так как возможны эффекты перегрузки и появление дополнительного уширения полос из-за тепловыделения. Кроме того, существенно увеличивается время анализа, что также является нежелательным следствием повышения концентрации электролита [2;6].

В этой связи целью настоящего исследования является: изучение закономерностей электрофоретического поведения флавоноидов в электролитах различного состава и pH и разработана их основе ряд общих подходов к анализу данной группы соединений в условиях КЗЭ.

Материалы и методы исследования

Работу вели на системе капиллярного электрофореза «Капель 103Р» (группа компаний «Люмэкс», Россия) с кварцевым капилляром (диаметр 50 мкм, $L_{обш}/L_{эф} = 60/50$ см). Детектирование осуществляли спектрофотометрически при фиксированной длине волны 254 нм, напряжение составляло +20 кВ, температура комнатная. Ввод пробы – гидродинамический, 150 мбар·с.

В работе реализовывался вариант КЗЭ, при этом использовался диапазон pH электролита от 8 до 11, т.к. в этом случае скорость ЭОП является максимальной [5]. Кроме того, флавоноиды в данной области pH способны к различной степени ионизации по фенольным гидроксилам [8;10; 13; 15].

Полностью данный диапазон охватывает только боратный буферный раствор, который для эксперимента готовился на четырех уровнях pH (8,0, 9,2, 10,0 и 10,8). В качестве

альтернативного электролита использовался карбонатный буферный раствор с pH 9,2, 10,0 и 10,8. И учитывая, что карбонатный буферный раствор готовится только в диапазоне pH от 9,2 до 11, то электролит с pH 8,0 создавали с помощью фосфатного буферного раствора. Все растворы готовили в соответствии с [3;9], с контролем полученных значений потенциометрически. Концентрация всех электролитов составляла 10 мМ.

Среди флавоноидов использовались стандартные образцы флавонов (космосин, $\geq 97\%$ (Fluka), витексин-2''-О-рамнозид, $\geq 98\%$ (Fluka), апигенин, $\geq 97\%$ (Sigma), лютеолин, $\geq 99\%$ (Fluka), диосмин (DIOSMIN FOR SYSTEM SUITABILITY CRS, European Pharmacopoeia Reference Standard), диосметин, (PhytoLab)), флавононы (нарингин, 97% («Сигмабиосинтез»)) гесперидин, 97% («Сигмабиосинтез») гесперетин, $\geq 95\%$ (Fluka)), флавонолы (астрагалин, 97% (Appli Chem), кемпферол, $> 97\%$ (PHYTOPLAN) рутин, 97-102% («Сигмабиосинтез»)) гиперозид, $\geq 97\%$ (Sigma), кверцетиндигидрат, 99,9% («Сигмабиосинтез»), флавононолы (дигидрокверцетин, $\geq 90\%$ (Sigma)).

Результаты исследования и их обсуждение

Флавоноиды анализировались двумя группами, в зависимости от наличия гидроксильной группы в третьем положении (кольцо С), т.е. одну группу составили флавоны и флаваноны, другую – флавонолы и флаванонолы. Структурные формулы анализируемых веществ представлены в таблице 2.

Изучалось влияние степени гидрирования кольца С, количества гидроксильных групп, степени гликозилирования флавоноидов на их ЭЭП в зависимости от состава и pH ведущего электролита.

Таблица 2

Структурные формулы 15 флавоноидов – представителей группы флавонов, флаванонов, флавонолов и флаванонолов

| Скелет | Радикалы | Название флавоноида (степень гликозилирования) | Аббре- виатура |
|----------------|--|---|-------------------|
| Флавоны | | | |
| | 5,7,4'-ОН | Апигенин (агликон) | Ap |
| | 5,4'-ОН-7- глюкозид | Космосин (гликозид апигенина) | Cos |
| | (5,7,4'-ОН -8- глюкорамнозид) | Витексин-2''-О-рамнозид (гликозид апигенина) | Vit |
| | 5,7,3',4'-ОН | Лютеолин (агликон) | Lut |
| | 5,7,3'-ОН,4'-ОСН ₃ | Диосметин (агликон) | Dt |
| | (5,3'-ОН-4'-ОСН ₃ - 7-рамноглюкозид) | Диосмин (гликозид диосметина) | D |

| Флаваноны | | | |
|--------------------|--|--------------------------------------|-------------|
| | 5,7,3'-ОН-4'-ОСН ₃ | Гесперетин (агликон) | Ht |
| | 5,3'-ОН-4'-ОСН ₃ -7- рамноглюкозид | Гесперидин (гликозид гесперетина) | H |
| | 5,4'-ОН-7- рамноглюкозид | Нарингин (гликозид нарингенина) | Nar |
| Флавонолы | | | |
| | 3,5,7,4'-ОН | Кемпферол (агликон) | Кемп |
| | 5,7,4'-ОН-3- глюкозид | Астрагалин (гликозид кемпферола) | Astr |
| | 3,5,7,3',4'-ОН | Кверцетин (агликон) | Quer |
| | 5,7,3',4'-ОН-3- рамноглюкозид | Рутин (гликозид кверцетина) | Rut |
| | 5,7,3',4'-ОН-3- галактозид | Гиперозид (гликозид кверцетина) | Hyp |
| Флаванонолы | | | |
| | 3,5,7,3',4'-ОН | Дигидрокверцетин (агликон) | DHQ |

На рисунках 1 и 2 представлены электрофореграммы, полученные в электролитах различных составов и рН (флавоны и флаваноны – рисунок 1; флавонолы и флаванонолы – рисунок 2).

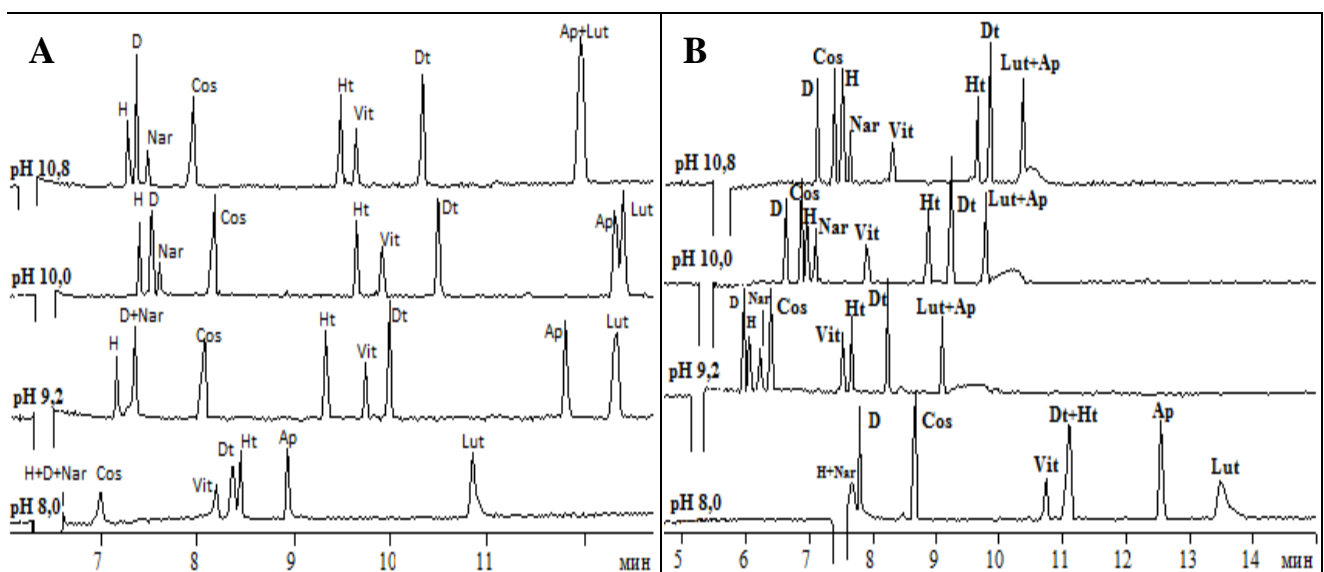


Рис.1. Электрофореграммы растворов модельной смеси флавонов и флаванолов при различных рН боратного (А), а также фосфатного (рН 8,0) и карбонатного (рН 9,2, 10,0, 10,8) электролитов (В)

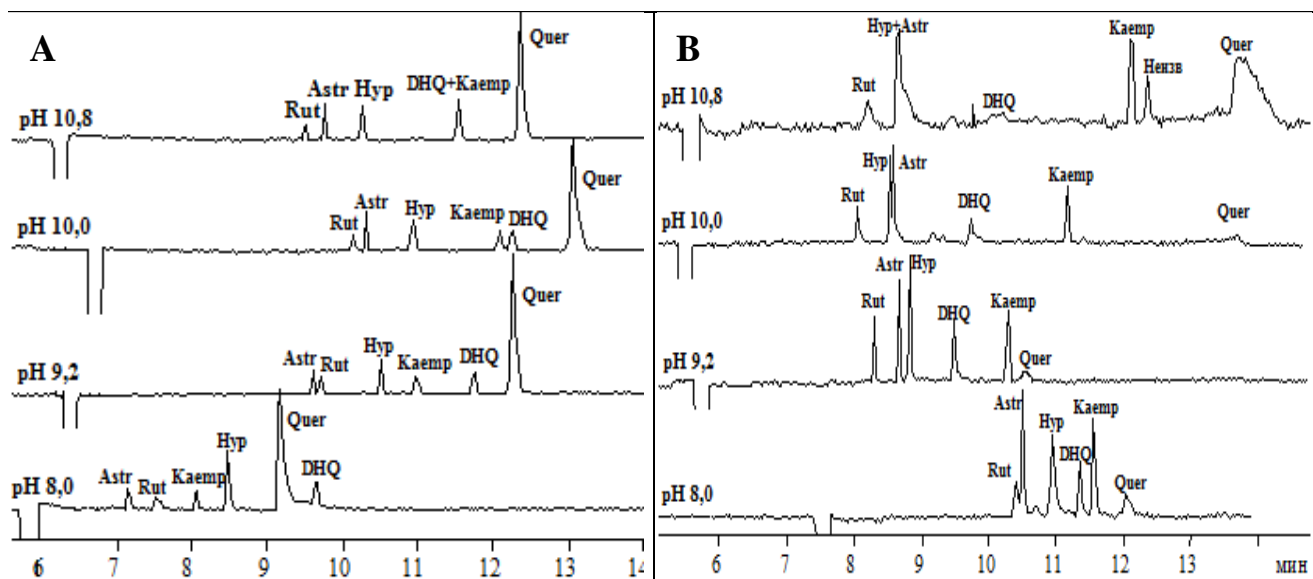


Рис.2. Электрофореграммы растворов модельной смеси флавонолов и флаванололов при различных рН боратного (А), а также фосфатного (рН 8,0) и карбонатного (рН 9,2, 10,0, 10,8) электролитов (В)

Анализ рисунка 1 показывает, что гесперидин, диосмин и нарингин при рН 8 обладают незначительной ЭЭП как в боратном, так и в фосфатном электролите. Это свидетельствует о недостаточном эффективном заряде данных соединений. С увеличением рН электролитов (и боратного, и карбонатного) для всех указанных гликозидов наблюдается увеличение ЭЭП вследствие повышения заряда. Сравнение последовательности миграции и степени разделения флавонов и флаванолов для боратного и карбонатного электролитов свидетельствует о существенных отличиях. Например, при рН 10 в боратном электролите наблюдается следующая последовательность миграции: гесперидин → диосмин → нарингин → космосин → гесперетин → витексин-2''-О-рамнозид → диосметин → апигенин → лютеолин. Тогда как для карбонатного при этом же уровне рН последовательность иная: диосмин → космосин → гесперидин → нарингин → витексин-2''-О-рамнозид → гесперетин → диосметин → апигенин+лютеолин. Также нужно отметить, что в карбонатном электролите наблюдалось размывание зоны лютеолина, в связи с чем отмечается низкая селективность анализа пары апигенин/лютеолин в данных условиях, по сравнению с боратным электролитом.

Что касается флавонолов и флаванололов, то в их анализе возможно использование ведущих электролитов в более широком диапазоне рН, так как уже при рН 8 все анализируемые соединения обладают ЭЭП, т.е. имеют достаточный эффективный заряд. Последовательность миграции флавонолов и флаванололов в целом схожа для боратного электролита в сравнении

сфосфатным и карбонатным. Однако, тем не менее, для ряда соединений наблюдается различная последовательность миграции в зависимости от состава электролита при одних и тех же значениях рН (рис. 2). Немаловажным также является тот факт, что в фосфатном и карбонатном электролите с увеличением значений рН электролита наблюдается усиление размывания зон кверцетина и дигидрокверцетина, что приводит к потере чувствительности и требует использования более высоких концентраций веществ.

В связи с этим, по результатам эксперимента, сравнивались параметры эффективности всех изучаемых соединений в боратном и карбонатном электролитах в зависимости от рН (табл.3). Этот аспект имеет значения для практического использования того или иного буферного раствора в анализе флавоноидов в растительных объектах, так как присутствие большого количества сопутствующих компонентов требует наличия достаточно высоких параметров эффективности и чувствительности методик.

Таблица 3

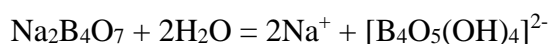
Сравнительный анализ параметров эффективности флавоноидов от рН для карбонатного и боратного электролитов

| Флавоноид | Эффективность, тыс. т.т | | | | | | | |
|--------------|---|-----|------|------|--------------------------|-----|------|------|
| | рН фосфатного (8) и карбонатного (9,2; 10,0; 10,8) электролитов | | | | рН боратного электролита | | | |
| | 8,0 | 9,2 | 10,0 | 10,8 | 8,0 | 9,2 | 10,0 | 10,8 |
| Ap | 356 | 253 | 317 | 217 | 393 | 473 | 563 | 196 |
| Cos | 507 | 232 | 232 | 282 | 102 | 166 | 259 | 208 |
| Vit | 194 | 503 | 482 | 465 | 203 | 484 | 479 | 478 |
| Lut | 50 | 149 | 109 | 43 | 199 | 197 | 455 | 196 |
| Dt | 93 | 444 | 323 | 342 | 237 | 474 | 498 | 513 |
| D | - | 320 | 406 | 418 | - | 296 | 680 | 613 |
| Ht | 92 | 366 | 263 | 275 | 413 | 497 | 542 | 559 |
| H | - | 601 | 335 | 317 | - | 442 | 654 | 658 |
| Nar | - | 764 | 585 | 597 | - | 296 | 467 | 419 |
| Kaemp | 375 | 310 | 226 | 324 | 392 | 202 | 265 | 227 |
| Astr | 544 | 452 | 422 | 414 | 543 | 637 | 619 | 570 |
| Quer | 64 | 214 | 57 | 6 | 65 | 232 | 269 | 202 |
| Rut | 242 | 498 | 339 | 31 | 60 | 448 | 243 | 322 |
| Hyp | 118 | 372 | 432 | 414 | 308 | 321 | 175 | 223 |
| DHQ | 250 | 250 | 281 | 9 | 367 | 405 | 262 | 227 |

Приведенные в таблице 3 результаты свидетельствуют, что практически для всех флавоноидов на всех уровнях рН наилучшая эффективность достигается при использовании боратного электролита. Это свидетельствует о его преимуществе при выборе ведущего электролита для анализа флавоноидов в сложных растительных объектах.

Такие различия в поведении флавоноидов в зависимости от состава электролита могут быть связаны со способностью флавоноидов вступать в процессы комплексообразования с компонентами боратного электролита, в то время как в среде фосфатного и карбонатного электролитов комплексы не образуются [14].

Известно, что при растворении тетрабората натрия в воде происходит диссоциация соли с образованием гидратированного аниона:



Гидратированный тетраборат-ион имеет сложное строение. При дальнейшем взаимодействии с водой этот сложный анион превращается в четыре молекулы $\text{B}(\text{OH})_3$ и выделяет два гидроксид-иона, которые и обеспечивают щелочную реакцию раствора. Реакция протолиза отвечает уравнению[1]:



Дигидроксисоединения в щелочных условиях образуют бораты, как показано на рисунке 3. Борная кислота (B^0), являясь кислотой Льюиса, связывает гидроксильные ионы, образуя при этом борат-анионы (B^-). Как борная кислота, так и борат реагируют с дигидроксисоединением (L), в результате чего образуется эфир борной кислоты (B^0L) имоноэфир-борат (B^-L), соответственно. Впоследствии оба эфира могут реагировать с другим дигидроксисоединением, в результате чего образуется диэфир (B^-L_2)[12].

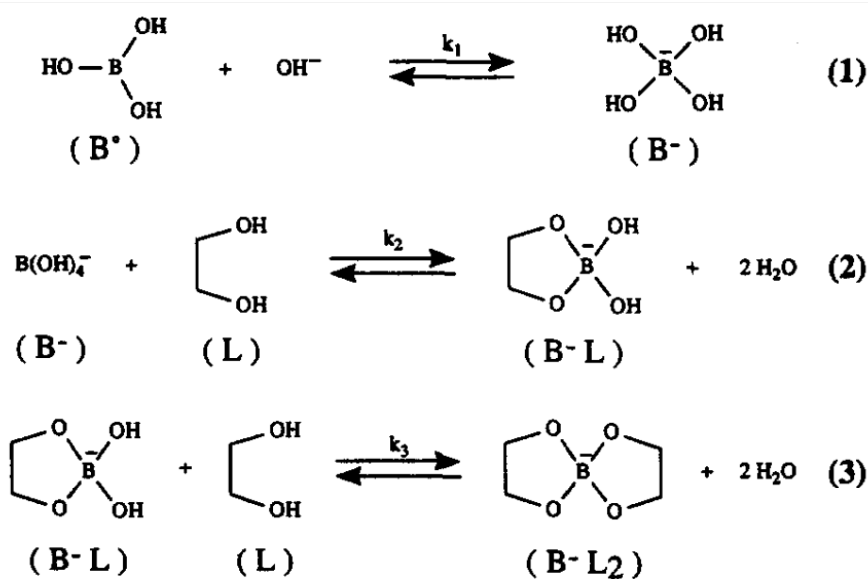


Рис.3. Равновесие между борной кислотой, борат-ионом и диолами в щелочной среде

Причем в реакцию комплексообразования могут вступать как фенольные диольные группы агликонов, так и диольные группы сахарных фрагментов гликозидов флавоноидов[12;18]. В последнее время рядом авторов комплексообразование борной кислоты и флавоноидов представляются в виде следующих продуктов взаимодействия (рис. 4)[7].

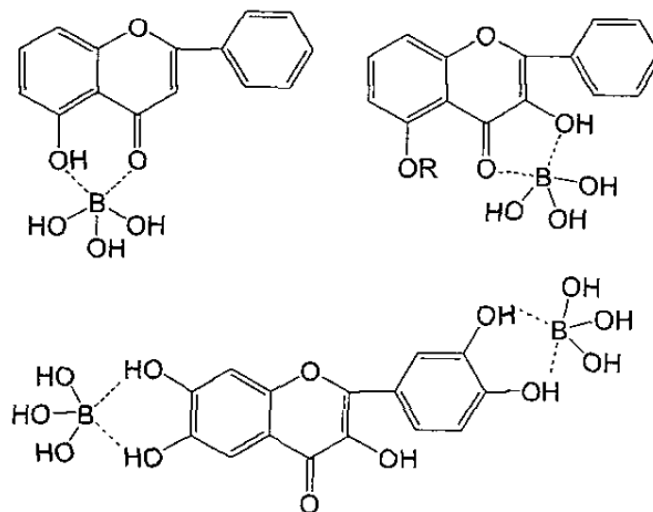


Рис.4. Продукты взаимодействия борной кислоты с флавоноидами

Таким образом, образующиеся боратные комплексы будут обладать собственной ЭЭП, отличной от ЭЭП самих флавоноидов.

Еще одним подтверждением образования комплексов может послужить сравнительное изучение изменений ЭЭП в зависимости от рН электролитов разных составов.

На рисунках 5-8 представлены графики зависимости ЭЭП ($\mu_{эф}$) от рН для электролитов разных составов.

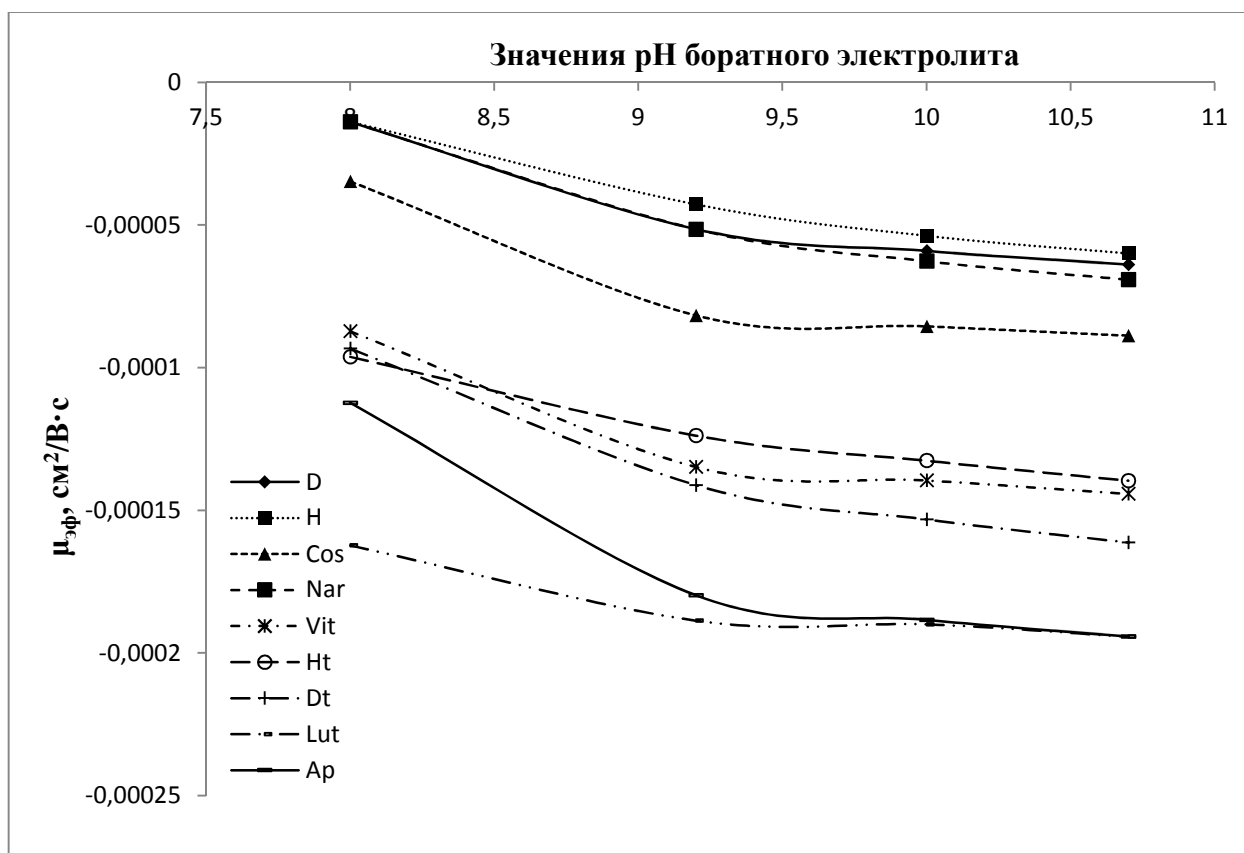


Рис.5. Графики зависимости значений $\mu_{эф}$ флавонов и флаванонов от рН боратного электролита

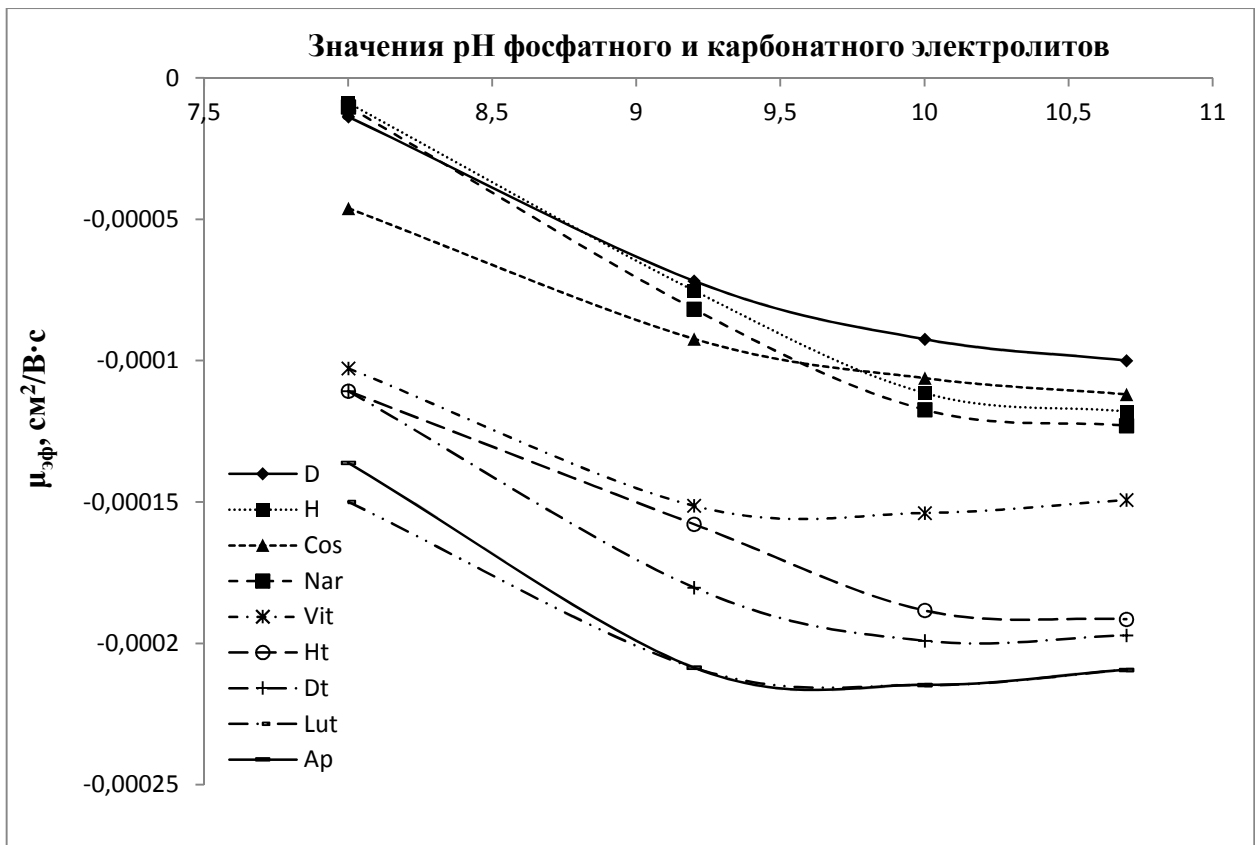


Рис.6. Графики зависимости значений $\mu_{эф}$ флавонов и флаванонов от рН карбонатного электролита (рН 9,2; 10; 10,8) и фосфатного (рН 8)

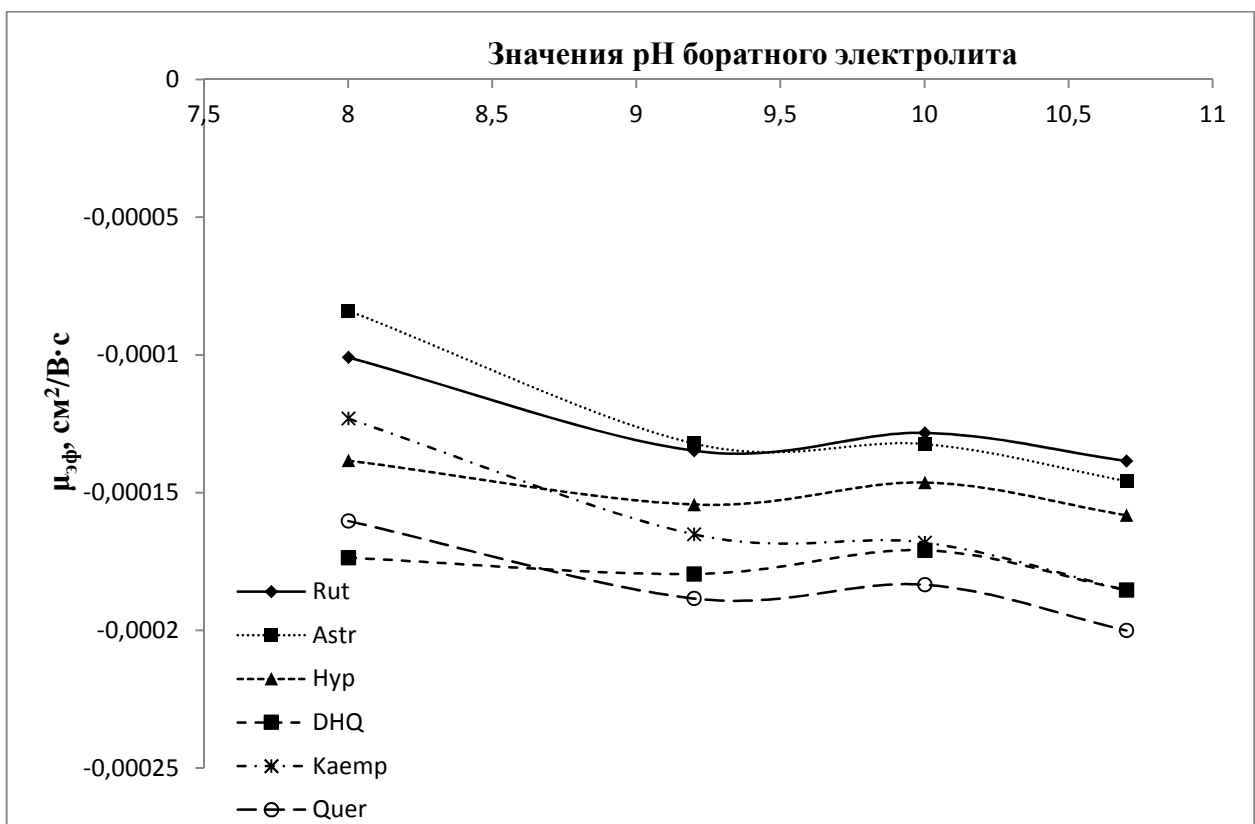


Рис.7. Графики зависимости значений $\mu_{эф}$ флавонолов и флаванонолов от рН боратного электролита

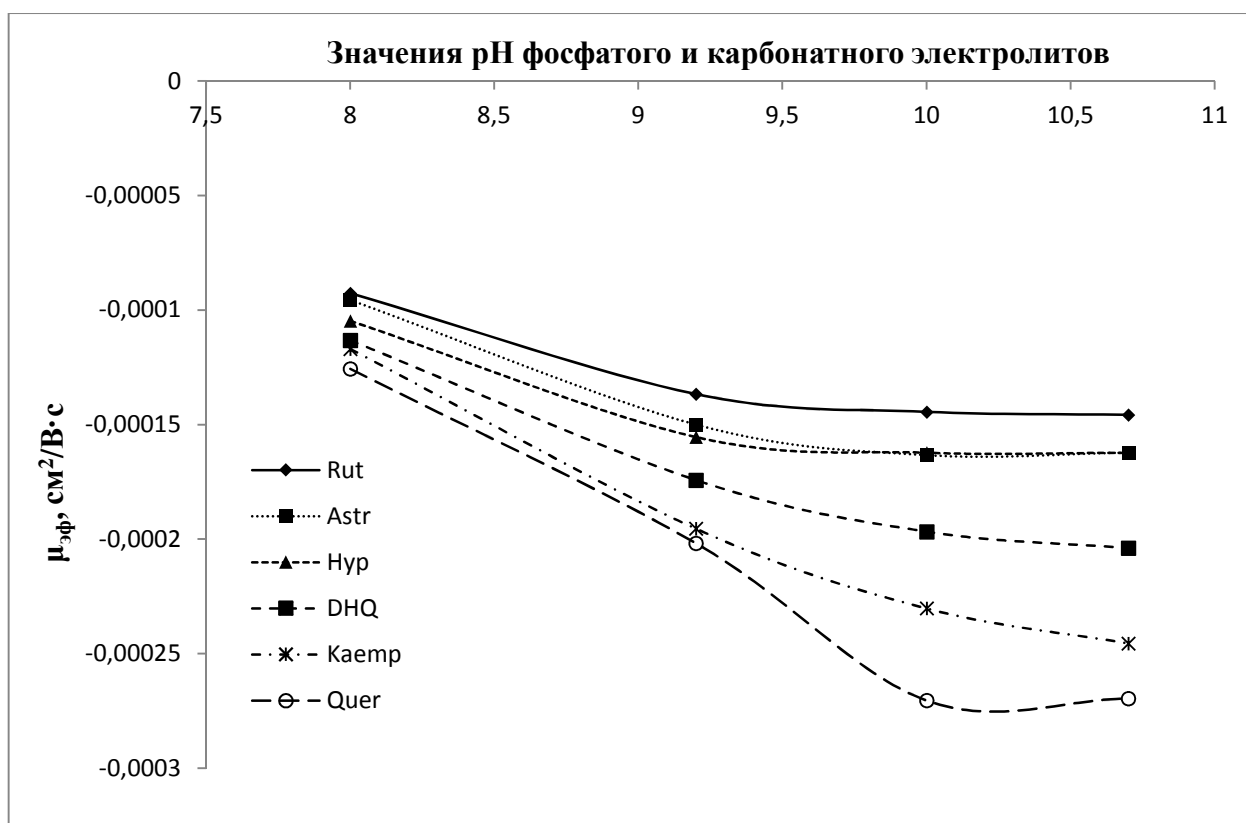


Рис. 8. Графики зависимости значений $\mu_{эф}$ флавонолов и флаванолонов от рН карбонатного электролита (рН 9,2; 10; 10,8) и фосфатного (рН 8)

Анализ данных зависимостей показывает, что для всех флавоноидов, и особенно для флавонолов и флаванолонов, при значении рН боратного электролита 9,2 и более наблюдается некая стабилизация ЭЭП, хотя при этом в ряде случаев меняется селективность анализа (например, пары рутин/астрагалин и дигидроксикверцетин/кемпферол (рис. 2А)). В то время как для фосфатного и карбонатного электролитов тренд на увеличение значений ЭЭП с ростом рН сохраняется для большинства анализируемых флавоноидов. Данное различие свидетельствует, что при рН около 9 происходит образование комплексов диольных групп флавоноидов с компонентами боратного электролита. Данные комплексы стабильны в щелочной среде и менее подвержены влиянию повышения рН среды, нежели сами флавоноиды в условиях фосфатного и карбонатного электролитов. При этом флавоноиды с ростом рН продолжают ионизироваться в большей степени, по сравнению с комплексами, что увеличивает эффективный заряд частицы и приводит к росту ЭЭП.

Анализируя поведение флавоноидов в боратном электролите, можно отметить ряд особенностей. В частности, флавоноиды мигрируют двумя зонами: сначала зона гликозидов, потом агликонов. Это связано с большим размером (радиусом) частиц гликозидов, что, соответственно, снижает их ЭЭП. Ввиду сложности определения радиуса частиц ряд источников рекомендует пользоваться значениями молекулярных масс (M.r.), для которых также выявлена взаимозависимость с ЭЭП[14]. Влияние массы (размера) частицы на

ЭЭП сохраняется и для структурно близких пар гесперидин/диосмин, гесперетин/диосметин, дигидроксикверцетин/кверцетин. Различие всего в два атома водорода позволяет разделить данные пары во всем диапазоне рН. Причем, ввиду меньшей массы диосмин, диосметин и кверцетин мигрируют после гесперидина, гесперетина и кверцетина соответственно. Исключением в данной тенденции выглядит поведение витексин-2''-О-рамнозида (М.г.=578) по сравнению, например, с космосином (М.г. = 432). Учитывая их структурную близость (оба производные апигенина), а также то, что витексин-2''-О-рамнозид является дисахаридом апигенина, в то время как космосин – моносахарид, то можно было бы ожидать миграцию витексин-2''-О-рамнозида раньше космосина. Однако на практике наблюдается обратная ситуация, причем ЭЭП витексин-2''-О-рамнозида настолько велика, что превышает таковую для некоторых агликонов (гесперетин). Это объясняется тем, что витексин-2''-О-рамнозид является С-гликозидом и соответственно гидроксил в 7 положении не замещен по сравнению с космосином. По данным литературы, наиболее «кислыми» являются 7-ОН- и 4'-ОН-группы[7]. За счет ионизации данных гидроксильных групп повышается заряд частицы, что и происходит в случае с витексин-2''-О-рамнозидом. Анализ поведения некоторых пар агликонов (апигенин/лютеолин, кемпферол/кверцетин) показывает, что лютеолин и кверцетин мигрируют после апигенина и кемпферола соответственно. Это объясняется присутствием большего количества фенольных гидроксильных групп в кольце В. Ионизация данных гидроксильных групп повышает заряд частиц и, как следствие, приводит к возрастанию значений ЭЭП.

Таким образом, по результатам проведенных исследований можно сформулировать ряд методологических подходов к анализу флавоноидов в условиях КЗЭ.

1. Для анализа флавоноидов в условиях КЗЭ целесообразнее использовать боратный электролит с рН 9,2–10,8, т.к. он, за счет процессов комплексообразования, позволяет достичь более высоких параметров эффективности и селективности.
2. Увеличение рН от 9,2 до 10,8 в целом не существенно влияет на ЭЭП большинства флавоноидов, в связи с чем этот подход применим в некоторых случаях при необходимости повышения селективности анализа.
3. Для предварительного моделирования электрофоретического поведения флавоноидов в боратном электролите необходимо учитывать, что ЭЭП возрастает с уменьшением массы (размера) веществ, а также с увеличением количества фенольных гидроксильных групп.

Выводы

Проведено изучение электрофоретического поведения 15 флавоноидов в ведущих электролитах различного состава и рН. Показано, что боратный электролит обладает преимуществом по эффективности и селективности анализа за счет процессов

комплексообразования с диольными группами флавоноидов. Установлено, что в боратном электролите при рН среды от 9,2 до 10,8 значения ЭЭП меняются, как правило, не существенно, что позволяет использовать значение рН равное 9,2 в качестве основного. В работе показана взаимосвязь ЭЭП флавоноидов от их массы (размера) и количества фенольных гидроксиллов. С использованием полученных результатов сформулирован ряд методологических подходов по анализу флавоноидов методом КЗЭ.

Список литературы

1. Боднарь И.В. Общая и неорганическая химия: лабораторный практикум для студ. спец. 1-41 01 04 Нанотехнологии и наноматериалы в электронике БГУИР / И.В. Боднарь, А.А. Позняк. – Минск: БГУИР, 2011. – 54 с.
2. Волощук А.М. Руководство по капиллярному электрофорезу / под ред. А.М. Волощука. – М.: Научный совет РАН по хроматографии, 1996. – 111 с.
3. ГОСТ 4919.2-77. Реактивы и особо чистые вещества. Методы приготовления буферных растворов. – М.:Стандартинформ, 2010. – 34 с.
4. Издание Европейской Фармакопеи на русском языке. – М.: ООО «Ремедиум», 2011. – Т.1. – 1812 с.
5. Комарова Н.В. Практическое руководство по использованию систем капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ»/ Н.В. Комарова, Я.С. Каменцев. – СПб.: ООО«Веда», 2006.–212с.
6. Новый справочник химика и технолога. Аналитическая химия.– СПб.: АНО НПО «Мир и Семья», 2002. – Ч. I. - 964 с.
7. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина и др. /Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-органической химии.–Новосибирск: Гео, 2007. - 232 с.
8. Acidochromism and Ionochromism of Luteolin and Apigenin, the Main Components of the Naturally Occurring Yellow Weld: A Spectrophotometric and Fluorimetric Study / G.Favaro, C. Clementi, A. Romani[etal.] // J. Fluoresc. – 2007. – Vol. 17. –P. 707–714.
9. Buffer solutions // OChemOnline [Электронный ресурс]. –Режим доступа: http://ochemonline.com/Buffer_solutions.
10. Determination of dissociation constants of flavonoids by capillary electrophoresis / J. Herrero-Martinez, M. Sanmartin, M. Roses [et al.] // Electrophoresis. – 2005. – Vol. 26. – P. 1886-1895.
11. Grotewold E. The Science of Flavonoids / edited by Erich Grotewold. – NY.: Springer Science+Business Media, Inc., 2006. – 273p.

12. Morin Ph. Borate complexation of flavonoid-O-glycosides in capillary electrophoresis II. Separation of flavonoid-3-O-glycosides differing in their sugar moiety / Ph. Morin, F. Villard, M. Dreux // *Journal of Chromatography*. – 1993. – Vol. 628. – P. 161-169.
13. Prediction of intestinal absorption and metabolism of pharmacologically active flavones and flavanones / H. Serra, T. Mendes, M.R. Bronzea [et al.] // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2008. – Vol. 16. – P. 4009–4018.
14. Schmitt-Kopplin, P. *Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols* / edited by Philippe Schmitt-Kopplin // *Methods in molecular biology*. – 2008. – Vol. 384. – 809 p.
15. Structure–property studies on the antioxidant activity of flavonoids present in diet / S. Teixeira, C. Siquet, C. Alves [et al.] // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2005. – Vol. 39. – P. 1099–1108.
16. Vaher M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis / M. Vaher, M. Koel // *Journal of Chromatography A*. – 2003. – Vol. 990. – P. 225–230.
17. Volpi N. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis // *Electrophoresis*. – 2004. – Vol. 25. – P. 1872–1878.
18. Weser U. Chemistry and structure of some borate polyol compounds of biochemical interest // *Structure and Bonding*. – 1967. – Vol. 2. – P. 160-180.
19. Pubmed.com. - URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

Рецензенты:

Кодониди И.П., д.фарм.н., доцент кафедры органической химии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО «ВолГМУ» Минздрава России, г. Пятигорск.

Попова О.И., д.фарм.н., профессор кафедры фармакогнозии ПМФИ – филиала ГБОУ ВПО «ВолГМУ» Минздрава России, г. Пятигорск.