

Твердофазное концентрирование фенольных соединений из водных экстрактов лекарственных растений семейств Зверобойные и Яснотковые на сорбентах различной природы

*З.А. Темердашев, Е.А. Виницкая, В.В. Милевская, Н.В. Киселева

Кубанский государственный университет,
350040, Российская Федерация, г. Краснодар, ул. Ставропольская, 149

*Адрес для переписки: Темердашев Зауаль Ахлоович, E-mail: TemZA@kubsu.ru

Поступила в редакцию 13 апреля 2020 г., после доработки – 06 мая 2020 г.

Работа посвящена твердофазному концентрированию различных типов фенольных соединений из водных экстрактов лекарственного растительного сырья семейств Зверобойные (*Hypericum perforatum* L.) и Яснотковые (*Thymus serpyllum* L., *Salvia officinalis* L.) с использованием различных сорбционных материалов для их дальнейшей идентификации. В качестве твердофазных сорбционных материалов использовали известные в аналитической практике октадецилсиликагель (**Strata C18-E**), сополимер стирола и дивинилбензола, химически модифицированный N-винилпирролидоном (**Strata X**), сополимер дивинилбензола и N-винилпирролидона, проявляющий гидрофильно-липофильную двойственность (**Oasis HLB**), а также непористый графитированный углерод (**Supelclean ENVI-Carb**). Для каждого из сорбентов получены основные сорбционные характеристики по отношению к целевым соединениям, а также их десорбционные параметры. Использование полимерных материалов Strata X и Oasis HLB позволяет извлекать из водных экстрактов растений целевые соединения при пяти-, а в случае с гидрофильно-липофильным сорбентом при 32- и 20-кратном концентрировании. Октадецилсиликагель показывает полноту десорбции флавоноидов ($R \geq 90\%$), однако по отношению к фенолкарбоновым кислотам его использование нецелесообразно ввиду низких значений степеней извлечения аналитов ($R \leq 40\%$). Достаточно универсальными сорбционными свойствами обладают гидрофильно-липофильные материалы (Oasis HLB), обеспечивающие высокие значения коэффициентов концентрирования при приемлемых значениях степеней извлечения фенолкарбоновых кислот ($R \leq 96\%$) и флавоноидов ($R \leq 91\%$). Сорбция фитокомпонентов непористым углеродным сорбентом Supelclean ENVI-Carb дает достаточно высокие характеристики, но процесс десорбции данных соединений затруднителен и требует дальнейшего изучения. Использование различных типов сорбентов показывает, что минорные компоненты, которые не детектируются в обычных условиях их хроматографического определения, могут быть сконцентрированы ТФЭ для дальнейшей их идентификации, что обеспечит расширение круга определяемых соединений в составе различных лекарственных растений. Предложенная схема ТФЭ фенольных компонентов может быть в дальнейшем использована для анализа растительных материалов других семейств.

Ключевые слова: зверобой, чабрец, шалфей, твердофазная экстракция, флавоноиды, фенольные кислоты, лекарственное растительное сырье

For citation: *Analitika i kontrol'* [Analytics and Control], 2020, vol. 24, no. 2, pp. 86-95

DOI: 10.15826/analitika.2020.24.2.002

Solid-phase concentration of phenolic compounds from the aqueous extracts of Hypericaceae and Lamiaceae families of medicinal plants on sorbents of different nature

*Z.A. Temerdashev, E.A. Vinitzskaya, V.V. Milevskaya, N.V. Kiseleva

Kuban State University,
ul. Stavropolskaia, 149, Krasnodar, 350040, Russian Federation

*Corresponding author: Zauval A. Temerdashev, E-mail: TemZA@kubsu.ru

Submitted 13 April 2020, received in revised form – 06 May 2020

The current work is devoted to the solid-phase concentration of phenolic compounds from the aqueous extracts of medicinal plant raw materials using the various sorbents for their further identification. Plants of the Hypericaceae (*Hypericum perforatum* L.) and Lamiaceae (*Thymus serpyllum* L., *Salvia officinalis* L.) families were selected as samples in this effort. For each of the sorbents, the main sorption characteristics («breakthrough volumes» and dynamic sorbents capacities) in relation to the target compounds, as well as their desorption parameters (concentration factor and recoveries) were obtained. Strata X and Oasis HLB polymeric materials allowed extracting the target compounds from the water extracts of plants at five-, and in the case of hydrophilic-lipophilic sorbent at 32- and 20-fold concentration. Strata C18-E showed complete desorption of flavonoids ($R \geq 90\%$), but in relation to the phenolic acids, its use was impractical due to the low values of recovery analytes ($R \leq 40\%$). The Oasis HLB sorbent had universal sorption properties, which provided high concentration coefficients at acceptable values of recoveries of phenolic acids ($R \leq 96\%$) and flavonoids ($R \leq 91\%$). The sorption of phytocomponents with the Supelclean ENVI-Carb sorbent gave quite high characteristics, but the process of desorption of these compounds was difficult and requires further study. The use of the various types of sorbents showed that minor components that were not detected under the usual conditions of their chromatographic determination could be concentrated by SPE for their further identification, which would provide an extension of the range of definable compounds in various medicinal plants.

Key words: St. John's wort, thyme, sage, solid phase extraction, flavonoids, phenolic acids, medicinal raw materials

ВВЕДЕНИЕ

Лекарственные растения представляют значительный интерес у исследователей благодаря многообразию фитомедицинских свойств, которые обеспечиваются наличием широкого спектра биологически активных соединений различной природы в составе растительного сырья. Уникальность зверобоя продырявленного (*Hypericum perforatum* L.), например, заключается в наличии в его составе нафтодиантронов, флороглюцинолов, флавоноидов, дубильных веществ, эфирных масел, фенолкарбоновых кислот [1, 2]. Для определения этих компонентов их извлекают в жидкую фазу различными способами экстракции: жидкость-жидкостная, ультразвуковая, микроволновая, субкритическая экстракция и другие [3-5]. Затем полученные экстракты исследуют методами газовой хроматографии (ГХ), которая чаще всего применяется для контроля содержания эфирномасличных компонентов лекарственного растительного сырья (ЛРС), и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в обращенно-фазовом варианте, преимущественно используемой для определения фенольных кислот, флавоноидов и др. [3].

Для определения минорных (низких содержания) компонентов требуется использовать методы концентрирования. Твердофазная экстракция (ТФЭ) сочетает в себе очистку экстрактов от мешающих компонентов, извлечение и концентрирование аналитов. Одним из преимуществ ТФЭ является её универсальность, широкий выбор типов сорбентов, а также малое количество используемых растворителей для десорбции соединений. Использование сорбционных материалов различной природы, помимо очистки от сложной матрицы объектов, позволяет концентрировать ранее не идентифицированные соединения, что обеспечивает расширение круга определяемых соединений в составе различных лекарственных растений [6].

Одними из самых распространенных и наиболее востребованных сорбентов для извлечения и концентрирования фенольных веществ из растительных

объектов являются сорбенты на основе октадецил-силикагеля (Диапак C18, BakerBond C18, Strata C18-E) и полимерные материалы (Диапак П, Bond Elut Plexa, Strata X, Oasis HLB) [7-11]. Химически модифицированный силикагель используют для извлечения неполярных или слабо полярных соединений [12] и очистки полученных экстрактов от соэкстрактивных веществ, опуская возможность концентрирования минорных соединений [12-14]. Для одновременной очистки экстрактов и концентрирования фенольных компонентов применяют материалы на основе сополимеров стирола и дивинилбензола. Перспективность применения гидрофильно-липофильных материалов (например, Oasis HLB) описана в ряде исследований, в которых успешно используют данный сорбент для пробоподготовки объектов с достаточно сложной матрицей (кровь, плазма, моча и т.д.) [15, 16].

Весьма привлекательным представляется применение углеродных материалов – непористого графитированного углерода (Supelclean ENVI-Carb), графитированной сажи и углеродных нанотрубок, обеспечивающих высокую сорбцию некоторых соединений [17, 18]. Данные материалы упоминаются и применяются в качестве сорбентов, в основном, для извлечения ПАУ и пестицидов из объектов окружающей среды [17, 19]. Известно также использование стеклогуглеродных электродов, модифицированных многослойными углеродными нанотрубками, для вольтамперометрического определения кверцетина в экстрактах ЛРС [20]. Однако авторы отмечают сложность работы с углеродными материалами, заключающаяся в затруднительности элюирования определенных групп соединений и возможности необратимой адсорбции компонентов [21].

Цель данной работы – твердофазное концентрирование различных типов фенольных соединений из водных экстрактов ЛРС семейств Зверобойные (*Hypericum perforatum* L.) и Яснотковые (*Thymus serpyllum* L., *Salvia officinalis* L.) с использованием различных сорбционных материалов для их дальнейшей идентификации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектами исследования были: зверобой продырявленный (*Hypericum perforatum* L.) из семейства Зверобойные, шалфей лекарственный (*Salvia officinalis* L.) и чабрец ползучий (*Thymus serpyllum* L.) из семейства Яснотковые («Травы Кавказа», Краснодарский край, г. Горячий Ключ). Для проведения исследования исходное сырье измельчали до частиц размером 0.5-1.0 мкм [22].

Растворители и стандартные образцы. Для выполнения исследований использовали деионизованную воду с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см (при 25 °С), полученную на установке Milli-Q-UV (Millipore, Франция). Экспериментальные исследования проводили с применением ацетонитрила (HPLC-S, «Biosolve BV», Netherland), муравьиной (85 %, «ЛенРеактив», Россия) и соляной («х.ч.», «Реахим», Россия) кислот, изопропилового спирта и метанола («х.ч.», «Вектон», Россия). Для идентификации анализов применяли стандартные образцы 3,4-дигидроксibenзойной, неохлорогеновой, хлорогеновой, кофейной и розмариновой кислот, (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина, кверцитрина, лютеолина-7-О-бета-D-глюкуронида и лютеолина-7-О-бета-D-глюкозида (Sigma-Aldrich, Германия).

Хроматографическое определение анализов. Хроматографическое определение фенольных соединений (ФС) проводили на хроматографе «LC20 Prominence» (Shimadzu, Япония) с дегазатором DGU-20A5, насосом LC20AD, автоматическим дозатором SIL-20A, термостатом колонок CTO-20AC и спектрофотометрическим детектором на основе диодной матрицы SPD-M20A. Подробное описание использованной методики определения ФС изложено в [23]. Разделение компонентов проводили на колонке Luna C18 100A, 250×2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США) с предколонкой C18 4×2.0 мм, 5 мкм (Phenomenex, США), температура термостатирования колонки – 40 °С, диапазон сканирования диодной матрицы – 190-800 нм. В качестве подвижной фазы для разделения компонентов использовали ацетонитрил и воду, содержащую 0.1 %-ную муравьиную кислоту. Данные обрабатывали в программной среде LCMS Solution (Shimadzu, Япония).

Установление сорбционных характеристик исследуемых материалов. Сорбционные свойства твердофазных материалов устанавливали при комнатной температуре по методу «объем до проскока» [24], величине динамической емкости, а также десорбционных (коэффициент концентрирования и степень извлечения анализов) характеристик. Степень извлечения анализов рассчитывали по формуле:

$$R = \frac{m_1}{m_2} \cdot 100,$$

где R – степень извлечения анализа, %; m_1 – масса анализа в элюате, мкг; m_2 – масса анализа в исходном экстракте, мкг.

Коэффициенты концентрирования анализов K рассчитывали по формуле:

$$K = \frac{V_{\text{экстракта}}}{V_{\text{р-ля}}},$$

где $V_{\text{экстракта}}$ – объем экстракта ЛРС, взятого для пропускания через сорбент, мл; $V_{\text{р-ля}}$ – объем растворителя, взятого для десорбции анализов с сорбента, мл.

С использованием этих параметров оптимизированы, в частности, объемы растворителя, используемые для десорбции фенольных соединений.

Расчет динамической емкости для каждого типа сорбента проводился по формуле [25]:

$$DE = \frac{C_0 \cdot V_b}{m \cdot 1000},$$

где DE – динамическая емкость сорбента, моль/г; C_0 – концентрация анализа в исходном растворе (экстракте), моль/л; V_b – «объем до проскока» анализа, мл; m – масса сухого сорбента, г.

При использовании водно-спиртовых извлечений возможна преждевременная десорбция фенолкарбоновых кислот с твердофазных сорбентов [26], поэтому для концентрирования анализов использовали водные экстракты ЛРС. Водные экстракты ЛРС получали на микроволновой системе ETHOS 1 («Milestone», Италия), которые затем подкисляли 2 %-м раствором HCl до pH = 2, контролируя pH-метром «Эксперт-001» (ООО «Эконикс-Эксперт», Россия). Полученные водные экстракты ЛРС пропускали через сорбционные патроны со скоростью 1 мл/мин, отбирая фракции в вials.

В качестве твердофазных сорбционных материалов использовали: Strata C18-E (Phenomenex, США), масса 100 мг, размер частиц 55 мкм, диаметр пор 7 нм; Strata X (Phenomenex, США), масса 100 мг, размер частиц 33 мкм, диаметр пор 85 нм; Oasis HLB (Waters, США), масса 100 мг, размер частиц 32 мкм, диаметр пор 82 нм; непористый углеродный сорбент Supelclean Envi-Carb (Supelco, США), масса 500 мг, размер частиц 37-125 мкм. Сорбенты после пропускания водных экстрактов ЛРС подвергали сушке азотом с помощью генератора азота LCMS30-1 (Dornick Hunter, США). Затем, при контролируемой скорости потока десорбирующего растворителя (1 мл/мин), регулируемого насосом LC20AD (Shimadzu, Япония), снимали десорбционные характеристики. Концентрации определяемых соединений во всех элюатах контролировали методом ВЭЖХ-ДМД. Оптимизацию процессов сорбции и десорбции фенольных веществ на изучаемых сорбентах проводили путем построения и обработки зависимостей выходных динамических кривых сорбции анализов [24].

При обсуждении результатов использовали данные по сорбционным характеристикам, полученные ранее для ряда сорбентов (Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB) с целью твердофазной экстракции фенольных кислот и флавоноидов из водных

Таблица 1

Сорбционные характеристики сорбентов при твердофазной экстракции фенольных кислот и флавоноидов из водных экстрактов зверобоя

Table 1

Sorption characteristics of sorbents in the solid-phase extraction of phenolic acids and flavonoids from water extracts of St. John's wort

Соединение	С _{аналита} в исх. экс- тракте, мкг/мл	Сорбент									
		Strata C18-E		Strata X		Strata C18-E + Strata X		Oasis HLB		Supelclean ENVI-Carb	
		V _з , мл	m _с , мкг	V _з , мл	m _с , мкг	V _з , мл	m _с , мкг	V _з , мл	m _с , мкг	V _з , мл	m _с , мкг
3,4-дигидроксибензойная кислота	3.6	1	3.6	5	18	5	18	8	28.8	15	54
Неохлорогеновая кислота	32.6		32.6		163		163		260.8		489
Хлорогеновая кислота	8.5		8.5		42.5		42.5		68		127.5
(-)-эпикатехин	9.3		9.3		46.5		46.5		74.4		139.5
Рутин	77.4		77.4		387		387		1238.4		4644
Гиперозид	54		54		270		270		864		3240
Изокверцитрин	22.5		22.5		112.5		112.5		360		1350
Кверцитрин	17.5		17.5		87.5		87.5		280		1050

Примечание: * m_с – масса соединения в объеме экстракта (V_з).

экстрактов зверобоя (табл. 1) [27, 28]. В таблицу включены экспериментальные данные с использованием комбинированного материала на основе Strata C18-E и Strata X, а также углеродного сорбента Supelclean ENVI-Carb. В табл. 1 приведены также применяемые для установления сорбционных характеристик материалов объемы водного экстракта зверобоя, а также массы целевых соединений в данном объеме экстракта. С учетом совокупности этих данных проведена определенная систематизация оптимизированных условий сорбции и десорбции фенольных веществ.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ТФЗ фенольных соединений на сорбентах Strata C18-E и Strata X. Рассчитанные значения «объемов до проскока» фенольных соединений, соответствующие уровню 10 % для сорбентов, при-

веденные в табл. 2, являются минимальными. Из представленных данных следует, что Strata C18-E не является универсальным эффективным сорбентом для извлечения всех фенольных кислот из водных экстрактов зверобоя. Хроматограммы извлечений зверобоя, полученные после пропускания 1 мл водного экстракта через сорбенты, также подтверждают недостаточную эффективность октадецилсиликагеля для концентрирования фенольных кислот (рис. 1). С другой стороны, степень извлечения флавоноидов на этом материале оказалась высока – 90, 99, 98, 105 и 79 % для (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина и кверцитрина соответственно. В отношении флавоноидов сорбент Strata C18-E обладает низкими значениями динамической емкости по сравнению с другими типами сорбентов – $(1.9 \pm 0.2) \cdot 10^{-6}$, $(0.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-6}$, $(0.31 \pm 0.05) \cdot 10^{-6}$,

Таблица 2

«Объемы до проскока» фенольных соединений зверобоя на различных типах сорбентов (pH = 2), мл (n = 3, P = 0,95)

Table 2

“The breakthrough volume” of St. John's wort phenolic compounds on different types of sorbents (pH = 2), ml (n = 3, P = 0.95)

Соединение	Сорбент			
	Strata C18-E	Strata X	Oasis HLB	Supelclean ENVI-Carb
3,4-дигидроксибензойная кислота	0.10 ± 0.05	5.0 ± 1.5	9 ± 1	20 ± 6
Неохлорогеновая кислота	0.30 ± 0.15	4 ± 1	9 ± 3	22 ± 2
Хлорогеновая кислота	0.40 ± 0.12	5 ± 3	6 ± 1	18 ± 4
(-)-эпикатехин	0.70 ± 0.14	6 ± 2	12.5 ± 1.3	16 ± 1
Рутин	0.70 ± 0.14	3 ± 1	17 ± 2	46 ± 9
Гиперозид	0.60 ± 0.18	6.0 ± 1.2	18 ± 2	42 ± 12
Изокверцитрин	0.60 ± 0.12	6.0 ± 1.2	19 ± 2	42 ± 4
Кверцитрин	0.60 ± 0.18	6.0 ± 1.2	19 ± 2	-

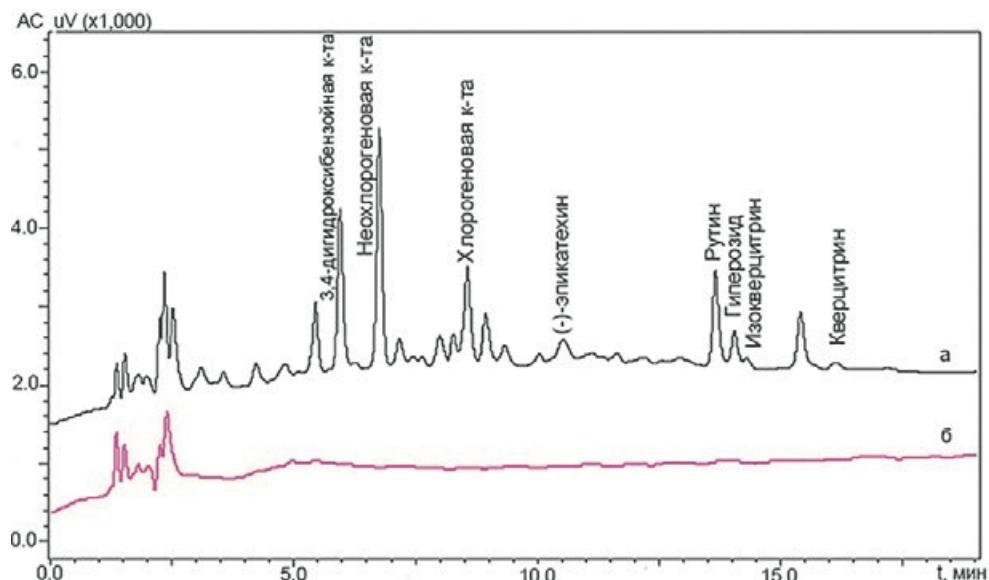


Рис. 1. Хроматограммы водных извлечений зверобоя после пропускания 1 мл водного экстракта через сорбент Strata C18-E (а) и Strata X (б)

Fig. 1. Chromatograms of St. John's wort water extracts after 1 ml was passed through Strata C18-E (a) and Strata X (б)

$(0.20 \pm 0.04) \cdot 10^{-6}$ моль/г для рутина, изокверцитрина, гиперозида и кверцитина соответственно.

Сорбент Strata X обладает более высокими характеристиками удерживания фенолкарбоновых кислот и флавоноидов по сравнению с сорбентом Strata C18-E, что подтверждается увеличением «объемов до проскока» для этих соединений (табл. 2), а также отсутствием пиков на хроматограммах, полученных при пропускании 1 мл водного экстракта зверобоя через сорбент (рис. 1). «Объемы до проскока» для флавоноидов составили от 3 до 6 мл, степени извлечения 3,4-дигидроксibenзойной, неохлорогеновой и хлорогеновой кислот составили 105-107 %, для (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина и кверцитрина – 90-112 % при концентрировании в 5 раз. Сорбент Strata X обладает наивысшим значением динамической емкости по отношению к хлорогеновой кислоте – $(2.6 \pm 0.5) \cdot 10^{-6}$ моль/г (табл. 2). Полученные результаты позволяют считать, что данный материал концентрирует ФС из экстрактов ЛРС и позволяет снизить пределы детектирования аналитов, особенно в случае «минорных» компонентов.

Концентрирование аналитов путем последовательного пропускания экстракта через сорбенты Strata C18-E и Strata X. Рассматривалась возможность повышения эффекта концентрирования компонентов различных классов путем пропускания экстракта через последовательно совмещенные Strata C18-E и Strata X. Обусловлено это тем, что октадецильный сорбент Strata C18-E имеет неплохие сорбционные характеристики по отношению к флавоноидам, а полимерный Strata X – фенолкарбоновым кислотам. В верхней части концентрирующего патрона помещался октадецильный Strata C18-E, сорбирующий, преимущественно флавоноиды, в нижней – полимерный Strata X, сорбирующий больше

фенолкарбоновые кислоты, «проскакивающие» через октадецилсилан. Полученные данные сравнили с аналогичными характеристиками, полученными для сорбента Oasis HLB. Как видно из полученных результатов (табл. 3), комбинированный сорбент достаточно близок по характеристикам к гидрофильно-липофильному материалу (Oasis HLB) в отношении фенолкарбоновых кислот, но показывает меньшие степени извлечения флавоноидов при шестнадцатикратном концентрировании аналитов. Используя совмещенный сорбент, удалось достигнуть 69, 60 и 72 % извлечения 3,4-дигидроксibenзойной, хлорогеновой и неохлорогеновой кислот соответственно. Для (-)-эпикатехина, рутина, гиперозида, изокверцитрина и кверцитрина совмещенный материал показал

Таблица 3

Степени извлечения фенольных соединений зверобоя комбинированным сорбентом (Strata C18-E+Strata X) при $K = 16$, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Table 3

Recoveries of St. John's wort phenolic compounds with the combined sorbent (Strata C18-E+Strata X) at $K = 16$, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Сорбент	
	Strata C18-E + Strata X	Oasis HLB
3,4 – дигидроксibenзойная кислота	69 ± 8	80 ± 9
Хлорогеновая кислота	60 ± 12	92 ± 18
Неохлорогеновая кислота	72 ± 11	100 ± 15
(-)-эпикатехин	41 ± 4	71 ± 7
Рутин	38 ± 9	81 ± 9
Гиперозид	32 ± 7	83 ± 10
Изокверцитрин	48 ± 10	109 ± 23
Кверцитрин	55 ± 7	87 ± 11

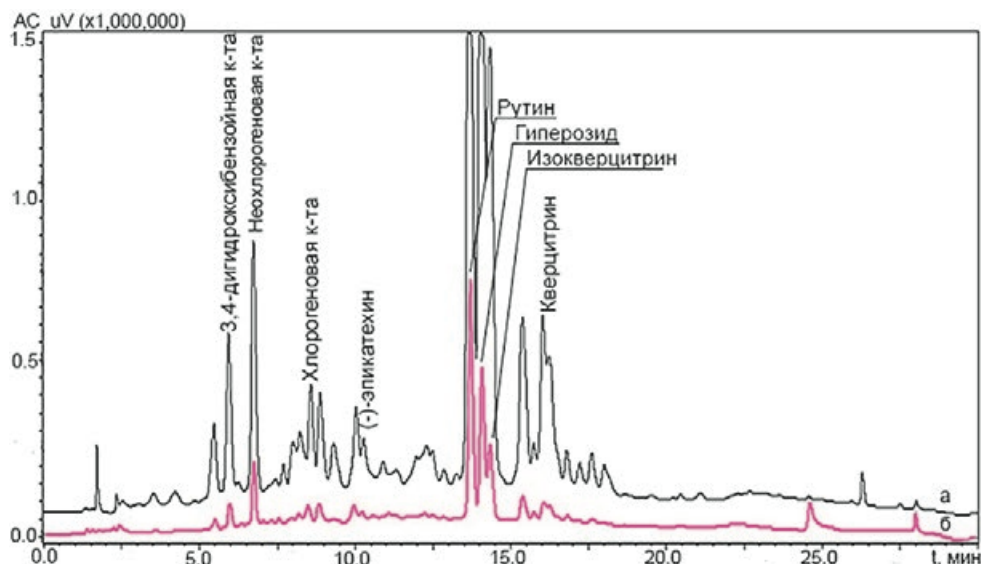


Рис. 2. Хроматограммы водных экстрактов зверобоя, прошедших через сорбенты Strata C18-E+Strata X (а) и Oasis HLB (б)

Fig. 2. Chromatograms of St. John's wort water extracts after it was passed through Strata C18-E+Strata X (а) and Oasis HLB (б)

более низкие степени извлечения — 41, 38, 32, 48 и 55 % соответственно, что значительно уступает параметрам, полученным для этих же соединений на Oasis HLB (табл. 3).

Следует отметить, что на хроматограмме элюата (рис. 2), прошедшего через совмещенный сорбент Strata C18-E + Strata X, визуализируются в диапазоне $t = 3 - 4.6$ минут ($\lambda = 268$ нм) пики ранее не регистрируемых веществ. Это означает, что использование совмещенного сорбента (Strata C18-E + Strata X) может в определенной степени позволить расширить список идентифицируемых в водном экстракте зверобоя соединений.

Концентрирование фенольных соединений на сорбенте Oasis HLB. «Объемы до проскока» целевых компонентов (6-9 мл по фенолкарбоновым кислотам и 12.5-19 мл – флавоноидам), рассчитанные для этого сорбента, выше полученных на Strata C18-E и Strata X, но уступают данным, полученным с применением непористого графитированного сор-

бента Supelclean ENVI-Carb. Однако, при пересчете значений динамических емкостей данных сорбентов по отношению к ФС к одинаковым массам, значения «объемов до проскока» для Oasis HLB и Supelclean ENVI-Carb сопоставимы. Динамическая емкость Oasis HLB относительно фенольных соединений зверобоя выше значений, полученных для Supelclean ENVI-Carb. По отношению к определяемым соединениям, за исключением рутина и хлорогеновой кислоты, динамическая емкость Oasis HLB наивысшая среди всех используемых материалов (табл. 4). На стадии десорбции аналитов метанолом Oasis HLB показал также высокие степени извлечения компонентов. Для фенольных кислот достигается 20-тикратное концентрирование и степень извлечения 74-96 %, для флавоноидов – 32-кратное концентрирование и степень извлечения 56-91 % (табл. 5).

На хроматограмме, полученной при десорбции компонентов с Oasis HLB, наблюдается не идентифицированный ранее пик на $t = 24.8$ минуты

Таблица 4

Динамическая емкость сорбентов по отношению к фенольным соединениям зверобоя ($DE \cdot 10^{-6}$, моль/г) ($n = 3, P = 0,95$)

Table 4

Dynamic capacity of sorbents in relation to the phenolic compounds of St. John's wort ($DE \cdot 10^{-6}$, mol/g) ($n = 3, P = 0.95$)

Соединение	Сорбент			
	Strata C18-E	Strata X	Supelclean ENVI-Carb	Oasis HLB
3,4-дигидроксibenзойная кислота	0.033 ± 0.001	1.7 ± 0.4	1.2 ± 0.3	2.3 ± 0.7
Неохлорогеновая кислота	0.27 ± 0.03	3.7 ± 0.4	4.5 ± 0.5	8 ± 3
Хлорогеновая кислота	0.18 ± 0.03	2.6 ± 0.5	1.5 ± 0.3	2.03 ± 0.07
(-)-эпикатехин	0.22 ± 0.02	2.2 ± 0.2	1.1 ± 0.1	4.1 ± 0.4
Рутин	1.9 ± 0.2	9.5 ± 1.1	26 ± 3	19 ± 3
Гиперозид	0.9 ± 0.1	12 ± 1	12 ± 1	26 ± 3
Изокверцитрин	0.31 ± 0.05	4.3 ± 0.6	3.7 ± 0.5	11.7 ± 1.3
Кверцитрин	0.20 ± 0.04	2.6 ± 0.5	-	4.56 ± 0.01

Таблица 5

Степени извлечения фенольных соединений из водного экстракта зверобоя различными типами сорбентов ($n = 3$, $P = 0.95$)

Table 5

Recoveries of phenolic compounds from water extract of St. John's wort by various types of sorbents ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Сорбент							
	Strata C18-E		Strata X		Supelclean ENVI-Carb		Oasis HLB	
	K	R, %	K	R, %	K	R*, %	K	R, %
3,4-дигидроксibenзойная кислота	5	27 ± 2	5	106 ± 5	6	86 ± 3	20	74 ± 5
Хлорогеновая кислота	5	40 ± 5	5	106 ± 6	6	50 ± 4	20	96 ± 6
Неохлорогеновая кислота	5	30 ± 4	5	107 ± 7	6	46 ± 5	20	77 ± 2
(-)-Эпикатехин	5	90 ± 5	5	99 ± 3	6	88 ± 3	20	68 ± 2
Рутин	5	99 ± 12	5	105 ± 3	6	37 ± 1	32	56 ± 7
Гиперозид	5	98 ± 14	5	106 ± 5	6	44 ± 2	32	64 ± 14
Изокверцитрин	5	105 ± 9	5	107 ± 8	6	55 ± 1	32	91 ± 10
Кверцитрин	5	79 ± 14	5	112 ± 13	6	72 ± 5	32	59 ± 6

Примечание: R – степень извлечения аналита метанолом, %; R* – степень извлечения аналита смесью метанол : ацетонитрил : изопропиловый спирт, %

($\lambda = 255$ нм) (рис. 2), установление структуры которого также позволит расширить список идентифицированных соединений в водном экстракте зверобоя.

Концентрирование фенольных соединений на сорбенте Supelclean ENVI-Carb. Процесс концентрирования кверцитрина на сорбенте характеризуется двумя сорбционными максимумами на его выходной динамической кривой сорбции, что нехарактерно для других типов материалов. В данном случае можем говорить о протекании процесса сорбции кверцитрина по более сложному механизму. Поэтому в табл. 5 и 6 отсутствуют расчетные данные сорбционных параметров для данного соединения. Supelclean ENVI-Carb характеризуется большими «объемами до проскока» по сравнению с Strata C18-E, Strata X и Oasis HLB (табл. 5). «Проскок» фенольных кислот на углеродном сорбенте происходит лишь после пропускания через сорбент 20 мл водного

экстракта ЛРС, а флавоноидов – 70 мл (табл. 5). Supelclean ENVI-Carb имеет наивысшие значения динамической емкости по рутину – $(26 \pm 3) \cdot 10^{-6}$ моль/г, что в 1.4 раза превышает значения, полученные для Oasis HLB, 2.7 раза – Strata X и 13 раз – Strata C18-E (табл. 4). Из данных табл. 5 видно, что этот материал позволяет извлекать из водных экстрактов зверобоя от 46 до 86 % фенольных кислот и от 37 до 88 % флавоноидов, концентрируя их в шесть раз.

Твердофазное извлечение фенольных соединений из водных экстрактов различных лекарственных растительных материалов. Отработанная на водном экстракте зверобоя схема твердофазной экстракции ФС апробирована на образцах лекарственного растительного сырья семейства Яснотковых – чабреце ползучем (*Thymus serpyllum* L.) и шалфее лекарственном (*Salvia officinalis* L.). Были получены водные экстракты лекарственных

Таблица 6

Степени извлечения фенольных соединений из экстрактов ЛРС семейства Яснотковые, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Table 6

Recoveries of phenolic compounds from medicinal plant raw materials extracts of *Lamiaceae* family, % ($n = 3$, $P = 0.95$)

Соединение	Образец							
	Чабрец ползучий (<i>Thymus serpyllum</i> L.)				Шалфей лекарственный (<i>Salvia officinalis</i> L.)			
	Strata C18-E	Strata X	Envi-Carb	Oasis HLB	Strata C18-E	Strata X	Envi-Carb	Oasis HLB
Кофейная кислота	23 ± 1	98 ± 3	61 ± 6	86 ± 4	26 ± 1	96 ± 5	50 ± 2	108 ± 21
Розмариновая кислота	71 ± 4	93 ± 5	21 ± 2	78 ± 3	69 ± 4	95 ± 3	21 ± 1	99 ± 10
Хлорогеновая кислота	13 ± 1	100 ± 1	39 ± 3	82 ± 2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Неохлорогеновая кислота	12 ± 2	94 ± 1	51 ± 2	77 ± 2	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Рутин	23 ± 1	112 ± 13	13 ± 2	94 ± 5	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.
Лютеолин-7-О-бета-D-глюкуроид	28 ± 2	95 ± 5	≤ 1	80 ± 3	23 ± 2	90 ± 8	≤ 1	97 ± 9
Лютеолин 7-О-бета-D-глюкозид	84 ± 6	110 ± 23	4 ± 2	87 ± 7	81 ± 6	87 ± 17	≤ 1.5	100 ± 12

Примечание: н.о. – соединение не обнаружено.

растений, из которых затем сорбировались ФС на Strata C18-E, Strata X, Oasis HLB и Supelclean ENVI-Carb. Десорбцию целевых соединений проводили в оптимизированных для каждого из типов сорбентов условиях. Содержание аналитов в экстрактах и элюатах контролировали хроматографически. Полученные значения степеней извлечения целевых соединений, содержащихся в водных экстрактах растительных материалов, представлены в табл. 6. Коэффициенты концентрирования аналитов сорбентами при этом составили для Strata C18-E – 2, Strata X и Supelclean ENVI-Carb – 5, Oasis HLB – 8.

Полученные результаты позволяют заключить, что, несмотря на различную растительную матрицу анализируемых объектов, характер сорбции и десорбции ФС на сорбентах приблизительно такой же, как и в случае ТФЭ ФС из экстрактов зверобоя (табл. 5). Сорбент Strata C18-E позволяет извлекать не более 13 % представителей хлорогеновых кислот, а Strata X показывает их 100 %-ное извлечение при пятикратном концентрировании. Низкие значения степеней извлечения лютеолина-7-О-β-D-глюкуронида ($\leq 1\%$) и лютеолина-7-О-β-D-глюкозида (4 % для чабреца ползучего и $\leq 1.5\%$ для шалфея лекарственного) сорбентом Supelclean ENVI-Carb могут быть объяснены недостаточным объемом экстракта для полной сорбции материалом сорбента, это требует дальнейших исследований по оптимизации данного процесса. Наиболее эффективным оказался полимерный Strata X, который показал практически 100 %-ное извлечение аналитов из водных экстрактов чабреца и шалфея.

Как видно из полученных результатов, степени извлечения фенольных соединений шалфея и чабреца из водных экстрактов достаточно близки друг к другу, несмотря на различную растительную матрицу. Использование различных типов сорбентов показывает, что минорные компоненты, которые не детектируются в обычных условиях их хроматографического определения, могут быть сконцентрированы ТФЭ для дальнейшей их идентификации. Предложенная схема ТФЭ фенольных компонентов может быть в дальнейшем использована для анализа растительных материалов - представителей других семейств.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование полимерных материалов Strata X и Oasis HLB позволяет извлекать из изученных водных экстрактов растений целевые соединения при пяти-, а в случае с гидрофильно-липофильным сорбентом – 32- и 20-кратном концентрировании с достаточно высокими значениями *R*. Стоит отметить, что октадецилсиликагель показывает полноту десорбции флавоноидов, однако по отношению к фенолкарбоновым кислотам его использование нецелесообразно ввиду низких значений степеней извлечения аналитов. Достаточно универсальными сорбционными свойствами обладают ги-

дрофильно-липофильные материалы (Oasis HLB), обеспечивающие высокие значения коэффициентов концентрирования при приемлемых значениях *R* фенолкарбоновых кислот и флавоноидов. Несмотря на весьма положительные результаты по сорбции фитоконструктивных компонентов зверобоя непористым углеродным сорбентом Supelclean ENVI-Carb, процесс десорбции данных соединений затруднителен и требует дальнейшего изучения.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования проводили при финансовой поддержке РФФИ (проект № 18-33-20009-мол_a_вед), с использованием научного оборудования ЦКП “Эколого-аналитический центр” Кубанского государственного университета.

ACKNOWLEDGMENTS

Current work was funded by RFBR according to the research project № 18-33-20009-mol_a_ved. The scientific equipment belonging to the Ecological and Analytical Center of the Kuban State University was used.

ЛИТЕРАТУРА

1. Essential Oil of *Hypericum perforatum*. The chemical composition and antimicrobial activity / L. Moleriu [et al.] // *Rev. Chim.* 2017. V. 68. P. 687-692.
2. Greenson J., Sanford B., Monti D. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature // *Psychopharmacology*. 2001. V. 153, № 4. P.402–414.
3. Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds // *Molecules*. 2013. V. 18, № 2. P. 2328–2375.
4. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis / G. Romanik [et al.] // *J. Biochem. Bioph. Methods*. 2007. V. 70, № 2. P. 253–261.
5. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables // *J. Chromatogr. A*. 2003. V. 1000, № 1-2. P. 657–691.
6. Analytical separation and detection methods for flavonoids / E. de Rijke [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2006. V. 1112, № 1-2. P. 31–63.
7. Антоцианы и другие фенольные соединения напитка иван-чая и его антиоксидантная активность / Е.Ю. Олейниц [и др.] // *Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация*. 2018. № 1. С. 7-14.
8. Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection / M. del Alamo [et al.] // *J. Chromatogr. A*. 2004. V. 1049, № 1-2. P. 97–105.
9. Phenolics and abscisic acid identified in acacia honey comparing different SPE cartridges coupled with HPLC-PDA / C. Sun [et al.] // *J Food Compost Anal.* 2016. V. 53. P. 91–101.
10. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I) / A. Andrade-Eiroa [et al.] // *TrAC*. 2016. V. 80. P. 641–654.
11. Magiera S., Zareba M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Anal Methods*. 2015. V. 8, № 10. P.2665–2674.

12. Cobzac S., Gocan S. Sample preparation for high performance liquid chromatography: recent progress // *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2011. V. 34. P. 1157-1267.
13. Kozyra M., Glowniak K. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland // *Acta Soc. Bot. Pol.* 2013. V. 82. P. 325-329.
14. Zgorka G., Glowniak K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001. V. 26. P. 79-87.
15. Simplified Solid Phase Extraction Solutions [Электронный ресурс]: <http://www.phenomenex.com>. (дата обращения: 28.10.2019).
16. Solid-phase extraction for determination of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in rat urine using high performance liquid chromatography and its application / K. Trakunram [et al.] // *Warasan Songkhla Nakharin.* 2018. V. 40, №4. P. 759-766.
17. Fontanals N., Marce R., Borrull F. Materials for Solid-Phase Extraction of Organic Compounds // *Separations.* 2019. V. 6, № 4-56. P. 1-27.
18. Cserhati T. Carbon-based sorbents in chromatography. New achievements / *Biomed. Chromatogr.* 2009. V. 23, № 2. P. 111-118.
19. ALOthman Z. A., Wabaidur S. M. Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review // *Arab. J. Chem.* 2019. V. 12, № 5. P. 633-651.
20. Ziyatdinova G., Kozlova E., Budnikov H. Poly(gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs // *J. Electroanal. Chem.* 2018. V. 821. P. 73-81.
21. Palma M., Pineiro Z., Barroso C.G. In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes // *J. Chromatogr. A.* 2002. V. 968, № 1-2. P. 1-6.
22. ФС.2.5.0015.15. Государственная Фармакопея Российской Федерации. Москва. 2018. Изд. 14. Т. 4. С. 6074-6083.
23. Экстракция и определение биологически активных компонентов зверобоя и препаратов на его основе / В.В. Милевская [и др.] // *Журнал аналит. химии.* 2016. Т. 71, № 7. С. 768-774.
24. Bielicka-Daszkiwicz K., Voelkel A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents // *Talanta.* 2009. V. 80. P. 614-621.
25. Сычев К.С., Даванков В.А. Материалы и методы пробоподготовки в хроматографии: твердофазное концентрирование и адсорбционная очистка // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2004. Т. 4, № 1. С. 5-28.
26. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends / C. Ajila [et al.] // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2011. V. 31. P. 227-249.
27. Сорбционные характеристики сорбентов для твердофазной экстракции фенольных соединений из экстрактов лекарственных растений / Е.А. Шилько [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2019. Т. 19, № 2. С. 157-167.
28. Твердофазное концентрирование фенольных веществ из водных экстрактов лекарственного растительного сырья на примере зверобоя (*Hypericum perforatum* L.) / Е.А. Шилько [и др.] // *Аналитика и контроль.* 2018. Т. 22, № 3. С. 303-314.
2. Greeson J., Sanford B., Monti D. St. John's wort (*Hypericum perforatum*): a review of the current pharmacological, toxicological, and clinical literature. *Psychopharmacology*, 2001, vol. 153, no. 4, pp. 402-414. doi: 10.1007/s002130000625
3. Khoddami A., Wilkes M., Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 2013, vol. 18, no. 2, pp. 2328-2375. doi: 10.3390/molecules18022328
4. Romanik G., Gilgenast E., Przyjazny A., Kaminski M. Techniques of preparing plant material for chromatographic separation and analysis. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2007, vol. 70, no. 2, pp. 253-261. doi: 10.1016/j.jbbm.2006.09.012
5. Robards K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2003, vol. 1000, no. 1-2, pp. 657-691. doi: 10.1016/S0021-9673(03)00058-X
6. De Rijke E., Out P., Niessen W. M. A., Ariese F., Gooijer C., Brinkman U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *Journal of Chromatography A*, 2006, vol. 1112, no. 1-2, pp. 31-63. doi: 10.1016/j.chroma.2006.01.019
7. Olejnic E. Ju., Blinova I. P., Dejneka L. A., Kul'chenko Ja. Ju., Dejneka V. I., Selemenev V. F. [Anthocyanins and other phenolic compounds of Ivan-tea drink and its antioxidant activity]. *Vestnik VGU, serija: Khmii. Biologija. Farmatsiia [Proceedings of Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy]*, 2018, no. 1, pp. 7-14 (in Russian).
8. Del Alamo M., Casado L., Hernandez V., Jimenez J. J. Determination of free molecular phenolics and catechins in wine by solid phase extraction on polymeric cartridges and liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2004, vol. 1049, no. 1-2, pp. 97-105. doi: 10.1016/j.chroma.2004.08.017
9. Sun C., Tan H., Zhang Y., Zhang H. Phenolics and abscisic acid identified in acacia honey comparing different SPE cartridges coupled with HPLC-PDA. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2016, vol. 53, pp. 91-101. doi: 10.1016/j.jfca.2016.08.006
10. Andrade-Eiroa A., Canle M., Leroy-Cancellieri V., Cerda, V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, vol. 80, pp. 641-654. doi: 10.1016/j.trac.2015.08.015
11. Magiera S., Zaręba M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. *Food Analytical Methods*, 2015, vol. 8, no. 10, pp. 2665-2674. doi:10.1007/s12161-015-0166-y
12. Cobzac S., Gocan S. Sample preparation for high performance liquid chromatography: recent progress. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2011, vol.3 4, no. 13, pp. 1157-1267. doi: 10.1080/10826076.2011.588064
13. Kozyra M., Glowniak K. Phenolic acids in extracts obtained from the flowering herbs of *Cirsium vulgare* (Savi) Ten. growing in Poland. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 2013, vol. 82, pp. 325-329. doi: 10.5586/asbp.2013.039
14. Zgorka G., Glowniak K. Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the Lamiaceae family. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2001, vol. 26, no. 1, pp. 79-87. doi: 10.1016/S0731-7085(01)00354-5
15. Simplified Solid Phase Extraction Solutions. Available at: <http://www.phenomenex.com>. (accessed 28 October 2019).
16. Trakunram K., Janchawee B., Raungrut P., Prutipanlai S. Solid-phase extraction for determination of caffeine and its dimethylxanthine metabolites in rat urine using high performance liquid chromatography and its application. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 2018, vol. 40, no. 4, pp. 759-766. doi:10.14456/sjst-psu.2018.116

REFERENCES

1. Moleriu L., Jianu C., Bujanca G., Doros G., Misca C., Ilie O., Moleriu R., Ilie A. Essential Oil of *Hypericum perforatum*. The chemical composition and antimicrobial activity. *Revista de Chimie*, 2017, vol. 68, pp. 687-692. doi: 10.37358/RC.17.4.5531

17. Fontanals N., Marce R., Borrull F. Materials for Solid-Phase Extraction of Organic Compounds. *Separations*, 2019, vol. 6, no. 4-56, pp. 1-27. doi: 10.3390/separations6040056
18. Cserhati T. Carbon-based sorbents in chromatography. New achievements. *Biomedical Chromatography*, 2009, vol. 23, no. 2, pp. 111-118. doi:10.1002/bmc.1168
19. AlOthman Z. A., Wabaidur S. M. Application of carbon nanotubes in extraction and chromatographic analysis: A review. *Arabian Journal of Chemistry*, 2019, vol. 12, no. 5, pp. 633-651. doi: 10.1016/j.arabjc.2018.05.012
20. Ziyatdinova G., Kozlova E., Budnikov H. Poly(gallic acid)/MWNT-modified electrode for the selective and sensitive voltammetric determination of quercetin in medicinal herbs. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 2018, vol. 821, pp. 73-81. doi: 10.1016/j.jelechem.2017.12.071
21. Palma M., Pineiro Z., Barroso C.G. In-line pressurized-fluid extraction-solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal of Chromatography A*, 2002, vol. 968, no. 1-2, pp. 1-6. doi: 10.1016/s0021-9673(02)00823-3
22. FS.2.5.0015.15. *Gosudarstvennaia Farmakopeia Rossiiskoi Federatsii [State Pharmacopoeia of the Russian Federation]*. Moscow, 2018, Issue 14, vol. 4, pp. 6074-6083 (in Russian)
23. Milevskaya V.V., Statkus M.A., Temerdashev Z. A., Kiseleva N.V., Butyl'skaya T.S., Shil'ko E.A. Extraction and Determination of Biologically Active Components of St. John's Wort and Its Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry*, 2016, vol.71, no.7, pp.741-747. doi: 10.7868/S0044450216070136
24. Bielicka-Daszkiwicz K., Voelkel A. Theoretical and experimental methods of determination of the breakthrough volume of SPE sorbents. *Talanta*, 2009, vol. 80, no. 2, pp. 614-621. doi: 10.1016/j.talanta.2009.07.037
25. Sychev K.S., Davankov V.A. [Materials and methods for sample preparation in chromatography: solid-phase concentration and adsorption]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy [Sorption and chromatographic processes]*, 2004, vol. 4, no. 1, pp. 5-28 (in Russian)
26. Ajila C., Brar S., Verma M., Tyagi M., Godbout S., Valero J. Extraction and Analysis of Polyphenols: Recent trends. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, vol. 31, no. 3, pp. 227-249. doi: 10.3109/07388551.2010.513677
27. Shil'ko E.A., Milevskaya V.V., Temerdashev Z. A., Kiseleva N.V. [Sorption characteristics of sorbents for solid-phase extraction of phenolic compounds from extracts of medicinal plants]. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy [Sorption and chromatographic processes]*, 2019, vol. 19, no. 2, pp. 157-167. doi: 10.17308/sorpchrom.2019.19/733 (in Russian)
28. Shil'ko E.A., Milevskaya V.V., Temerdashev Z. A., Kiseleva N.V. [Solid phase concentration of phenolic compounds from the aqueous medicinal raw plant material extracts on the example of St. John's Wort (*Hypericum perforatum* L.)]. *Analitika i kontrol' [Analytics and Control]*, 2018, vol. 22, no. 3, pp. 303-314. doi: 10.15826/analitika.2018.22.3.013 (in Russian)