

УДК 543.544.5.068.7

ОЦЕНКА ВАРИАБЕЛЬНОСТИ ОТНОСИТЕЛЬНЫХ ВРЕМЕН УДЕРЖИВАНИЯ РЯДА ФЛАВОНОИДОВ НА ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИХ КОЛОНКАХ C18

И. В. Кудрис^{1,3}, А. Ю. Куликов², О. С. Чернышѐва³

В данной работе проведено изучение вариабельности относительных времен удерживания (RRT) для компонентов модельной смеси флавоноидов на 7 различных хроматографических колонках, заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами (C18). Установлено, что вариабельность относительных времен удерживания зависит от выбора пика стандарта и не может быть использована для целей идентификации веществ на хроматограмме. Использование нескольких веществ на одной хроматограмме для расчета RRT не приводит к существенному уменьшению вариабельности RRT.

Ключевые слова: относительные времена удерживания, вариабельность, ВЭЖХ, сорбент с привитыми октадецильными группами.

В практике современного хроматографического анализа одной из основных и первостепенных задач является идентификация определяемых соединений в многокомпонентных смесях. К таким задачам, в частности, можно отнести анализ как выделенных из растений различных классов природных соединений, так и препаратов, содержащих различного вида экстракты лекарственного растительного сырья. Биологически активные вещества, входящие в состав препаратов растительного происхождения, представлены, как правило, компонентами нескольких классов природных соединений. Для определения этих соединений в основном используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [1-4]. При этом помимо выбора оптимальных условий хроматографического разделения определяемых соединений, одной из трудоемких задач является их идентификация.

В настоящее время используют большое число методов идентификации, из которых наиболее часто применяемым и относительно надежным является способ идентификации с использованием образцов сравнения. Однако не для всех биологически активных соединений растительного лекарственного сырья можно найти стандартные образцы. Они либо отсутствуют в продаже, либо нестабильны в процессе выделения и хранения, либо очень дорогие (например, 1 мг цианидин-3O-гликозида стоит около 150 евро). В случае отсутствия стандартных образцов для идентификации используют хроматографические параметры удерживания, из которых наиболее применяемыми являются относительные времена (объемы) удерживания. Индексы удерживания, характеризующие свойства определяемых соединений, в жидкостной хроматографии, в отличие от газовой, оказались неприменимыми [4]. В качестве дополнительных критериев при идентификации рекомендуют рассматривать УФ-спектры, относительные оптические плотности при различных длинах волн или масс-спектры определяемых соединений.

Однако, как показывает практика, при воспроизведении методик, полученные значения относительных времен удерживания (RRT) часто отличаются от величин, приведенных в нормативной документации; это может приводить к неправильной идентификации и, как следствие, отбраковке препарата или субстанции [5].

Причиной этого является законодательная допустимость использования «аналогичной» хроматографической колонки, то есть колонки, отличной от указанной в нормативном документе (литературе). Аналогичными называются колонки, заполненные сорбентом одного типа (например, C18) и имеющие близкие физико-химические свойства (размер и объем пор, диаметр частиц и прочее). Однако, как это уже неоднократно отмечалось в литературе, «аналогичные» колонки зачастую не обеспечивают сопоставимых хроматографических характеристик

¹ ГП «Государственный экспертный центр МЗ Украины», лаборатория фармакокинетики (г. Харьков), ул. Астрономическая, 33, г. Харьков 61085, Украина

² ГП «Научно-экспертный фармакопейный центр», ул. Астрономическая, 33, г. Харьков 61085, Украина

³ Кафедра химической метрологии, Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, пл. Свободы, 4, Харьков 61022, Украина.

разделения веществ [6]. Оказывается, различия в физико-химических характеристиках сорбентов (объем пор, удельная площадь поверхности), а также способ производства и, что особенно важно, способ деактивации остаточных силанольных групп, приводит к существенному различию в удерживании аналитов [6].

Ведущие фармакопеи мира [1-3] не определяют критерии приемлемости для идентификации по относительным временам удерживания, то есть неизвестно в каких пределах экспериментально полученные значения относительных времен удерживания могут отличаться от значений, указанных в фармакопейных статьях или других нормативных документах.

Целью данного исследования было определить вариабельность относительных времен удерживания, полученных для модельной смеси компонентов растительного происхождения на различных хроматографических колонках, заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами (C18).

Экспериментальная часть

Хроматографическая система.

Жидкостный хроматограф Agilent 1200, состоящий из вакуумного дегазатора (G1379B), четырехканального насоса (G1311A), автосамплера (G1329A), термостата автосамплера (G1330B), термостата колонок (G1316A), УФ-детектора (G1314B). Для управления хроматографом, сбора и обработки хроматографических данных использовали программное обеспечение Chem Station (G2170BA, rev B.02.01).

Реактивы.

Хлорогеновая кислота, катехин, рутин, гиперозид, ликуразид, лютеолин, кверцетин, кемпферол с хроматографической чистотой более 98% (Acros, Бельгия). Ацетонитрил, метанол, тетрагидрофуран – «HPLC grade» (Sigma-Aldrich, Germany), ледяная уксусная кислота – чда, (Fluka, Germany).

Во всех экспериментах использовали деионизированную воду (Direct-Q5, Millipore).

Хроматографические колонки.

Для тестирования использовали 7 хроматографических колонок, заполненных сорбентом с привитыми C18 группами. Названия и некоторые характеристики используемых колонок приведены в таблице 1.

Таблица 1. Физико-химические характеристики хроматографических колонок, использованных для изучения вариабельности относительных времен удерживания

№	Хроматографическая колонка	Размер колонки, мм	Размер частиц, мкм	Диаметр пор, Å	Удельная площадь поверхности, м ² /г	Содержание углерода, %	Эндкеппинг
1	ZORBAX Eclipse XDB-C18	150×4.6	5	80	180	10	да
2	Nukleosil120-5C18	250×4.6	5	120	350	11	да
3	Kromasil 100-C18	250×4.0	5	100	340	19	да
4	LiChrosorb RP-18	250×4.6	10	100	300	17	нет
5	ZORBAX SB-C18	250×4.6	5	80	180	10	да
6	Bondapak C18	300×3.9	10	125	330	10	да
7	Hypersil AA-ODS	200×2.1	5	120	170	10	да

Приготовление тестовых смесей.

Для приготовления тестовой смеси навески хлорогеновой кислоты, катехина, рутина, гиперозид, ликуразид, лютеолина, кверцетина, кемпферола растворяли в метиловом спирте. Аликвоту полученных растворов разбавляли подвижной фазой до получения смеси компонентов с концентрациями: хлорогеновая кислота (25 мкг/мл), катехин (50 мкг/мл), рутин (150 мкг/мл), гиперозид (75 мкг/мл), ликуразид (50 мкг/мл), лютеолин (100 мкг/мл), кверцетин (100 мкг/мл), кемпферол (100 мкг/мл).

Условия хроматографического разделения.

Подвижная фаза: ацетонитрил – тетрагидрофуран – ледяная уксусная кислота – вода в соотношении 9:9:1:81 (по объему). Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин. Температура термостата колонки – 30⁰С. Объем пробы – 50 мкл. Длина волны детектирования – 282 нм.

Результаты и их обсуждение

Для оценки воспроизводимости величин относительных времен удерживания, а также расчета их вариабельности, были взяты хроматографические условия из утвержденного Фармакологическим комитетом Украины нормативного документа по контролю качества готового лекарственного средства, содержащего экстракты растительного лекарственного сырья. В методике указано, что для разделения и идентификации 10 полифенольных компонентов готового лекарственного средства используется подвижная фаза состава ацетонитрил – тетрагидрофуран – ледяная уксусная кислота – вода в соотношении 9:9:1:81 (по объему) и хроматографическая колонка, заполненная сорбентом L1 по классификации фармакопеи США.

Так как в нормативном документе не указывается торговая марка колонки, и, согласно ведущим фармакопеям [2,3], колонки марки «С18» являются аналогичными, то в качестве объектов исследования были выбраны имеющиеся в лабораториях хроматографические колонки, заполненные сорбентом на основе силикагеля с привитыми С18 группами. Все используемые колонки, несмотря на различия в их физико-химических параметрах (см. табл. 1), можно отнести к разряду колонок L1 по классификации фармакопеи США (октадецилсилан, химически привитый на пористый силикагель или керамические микрочастицы, 1,5-10 мкм в диаметре [2]) или *силикагель октадецилсилильный для хроматографии Р* по классификации фармакопеи Европы [3] и гармонизированной с ней фармакопеи Украины [1] (силикагель очень тонко измельченный с размером частиц от 3 мкм до 10 мкм, поверхность которого химически модифицирована октадецилсилильными группами).

Для хроматографического разделения в данной работе была использована модельная смесь, содержащая активные компоненты растительного происхождения сложных полифенолов, в том числе флавоноидов и их гликозидов - хлорогеновая кислота, катехин, рутин, гиперозид, ликуразид, лютеонин, кверцетин, кемпферол. Данная модельная смесь содержит вещества различной гидрофобности и частично эквивалентна пробе, полученной при анализе готового лекарственного средства, из нормативного документа по анализу которого были взяты условия хроматографирования.

Для расчета относительных времен удерживания ликуразид был выбран в качестве стандарта. Относительные времена удерживания компонентов рассчитывали как отношения среднего значения времени удерживания определяемого компонента к среднему значению времени удерживания ликуразида (стандарт). Вариабельность RRT оценивали как коэффициент вариации (фактически относительное стандартное отклонение результатов определения) для RRT компонента модельной смеси, полученного на разных хроматографических колонках. Результаты расчетов приведены в таблице 2.

Полученные значения коэффициентов вариации для RRT находятся в диапазоне от 3.4% до 23.3%, что в среднем составило 11.6%. Причем, для компонентов со временем удерживания близким к времени удерживания стандарта, значения коэффициентов вариации значительно ниже, чем для компонентов с большей разницей времен удерживания. Поэтому, для уменьшения вариабельности, расчет относительных времен удерживания был произведен для пар компонентов с минимальным различием во времени удерживания. Значения относительных времен удерживания и коэффициенты вариации для пар компонентов представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, значения коэффициентов вариации для пар компонентов составили от 2.7 до 15.7% (в среднем 7.1%).

Таким образом, вариабельность относительных времен удерживания зависит от выбора пика стандарта. Значительно более низкие значения вариабельности наблюдаются для компонентов смеси, которые элюируются вблизи пика, принятого за стандарт. Так для используемой в данной работе модельной смеси можно попробовать рекомендовать использование двух внутренних стандартов, первый использовать для компонентов, элюирующихся в начале хроматограм-

мы, второй для компонентов, элюирующихся в конце хроматограммы. Например, в качестве стандартов можно использовать пики гиперозида и кверцетина (рисунок 1).

Таблица 2. Относительные времена удерживания компонентов модельной смеси

№ КОЛОНКИ	Хлорогеновая кислота	Катехин	Рутин	Гиперозид	Ликуразид	Лютеолин	Кверцетин	Кемпферол
1	0.18	0.21	0.30	0.40	1.00	2.51	3.38	6.74
2	0.18	0.19	0.34	0.41	1.00	1.77	1.97	3.77
3	0.16	0.19	0.29	0.38	1.00	2.11	2.64	5.15
4	0.20	0.21	0.35	0.41	1.00	1.65	1.84	3.39
5	0.17	0.20	0.29	0.38	1.00	2.37	2.50	4.92
6	0.16	0.18	0.32	0.39	1.00	1.77	1.93	3.68
7	0.20	0.21	0.33	0.41	1.00	1.82	2.33	4.53
ср	0.18	0.20	0.32	0.39	1.00	2.00	2.37	4.60
SD	0.01	0.01	0.02	0.01	0.00	0.31	0.50	1.07
CV	8.1	6.1	7.0	3.4	0.0	15.5	21.0	23.3

Таблица 3. Относительные времена удерживания компонентов модельной смеси, рассчитанные для пар КОМПОНЕНТОВ

№ КОЛОНКИ	Хлорогеновая кислота – катехин	Катехин – рутин	Рутин – гиперозид	Гиперозид – ликуразид	Ликуразид – лютеолин	Лютеолин – кверцетин	Кверцетин – кемпферол
1	0.86	0.68	0.76	0.40	0.40	0.74	0.50
2	0.93	0.57	0.83	0.41	0.57	0.90	0.52
3	0.85	0.67	0.76	0.38	0.47	0.80	0.51
4	0.93	0.61	0.85	0.41	0.61	0.90	0.54
5	0.85	0.69	0.76	0.38	0.42	0.95	0.51
6	0.91	0.54	0.83	0.39	0.57	0.92	0.53
7	0.94	0.64	0.81	0.41	0.55	0.78	0.52
ср	0.89	0.63	0.80	0.39	0.51	0.85	0.52
SD	0.04	0.06	0.04	0.01	0.08	0.08	0.01
CV	4.6	8.9	4.7	3.6	15.7	9.3	2.7

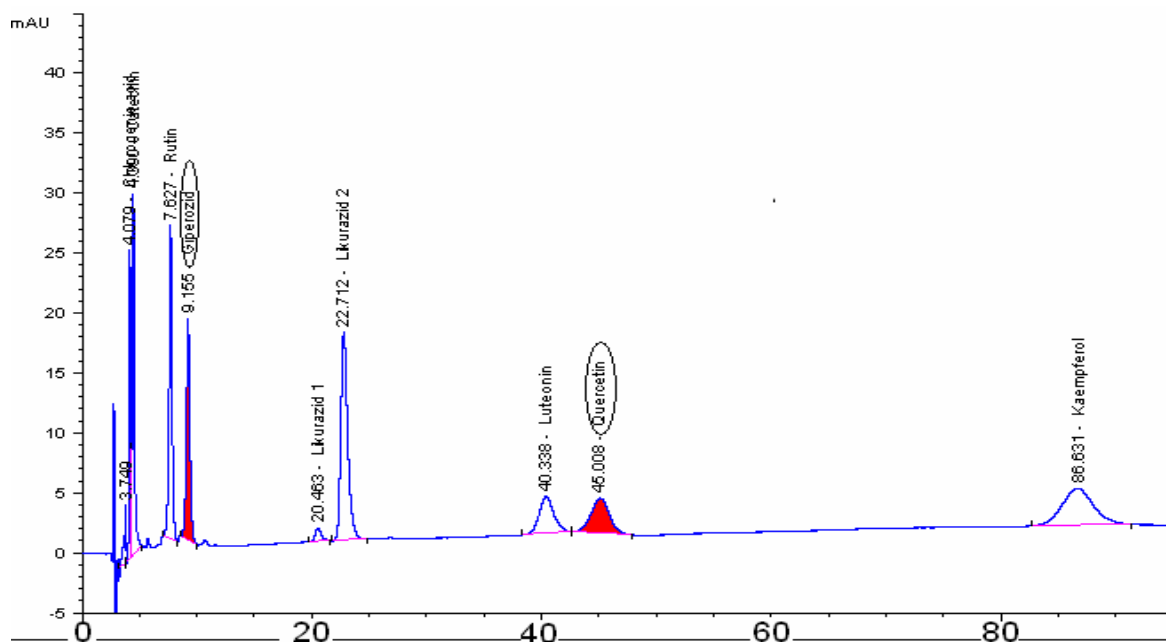


Рисунок 1. Типичная хроматограмма модельной смеси флавоноидов.

	Хлорогеновая кислота	Катехин	Рутин	Гиперозид	Ликурозид	Лютеолин	Кверцетин	Кемпферол
1	7.7	14.1	4.8	0.0	4.9	17.8	22.5	24.4
2	22.6	18.8	26.9	22.3	22.1	9.0	0.00	2.4

1. стандарт – гиперозид; 2. стандарт – кверцетин.

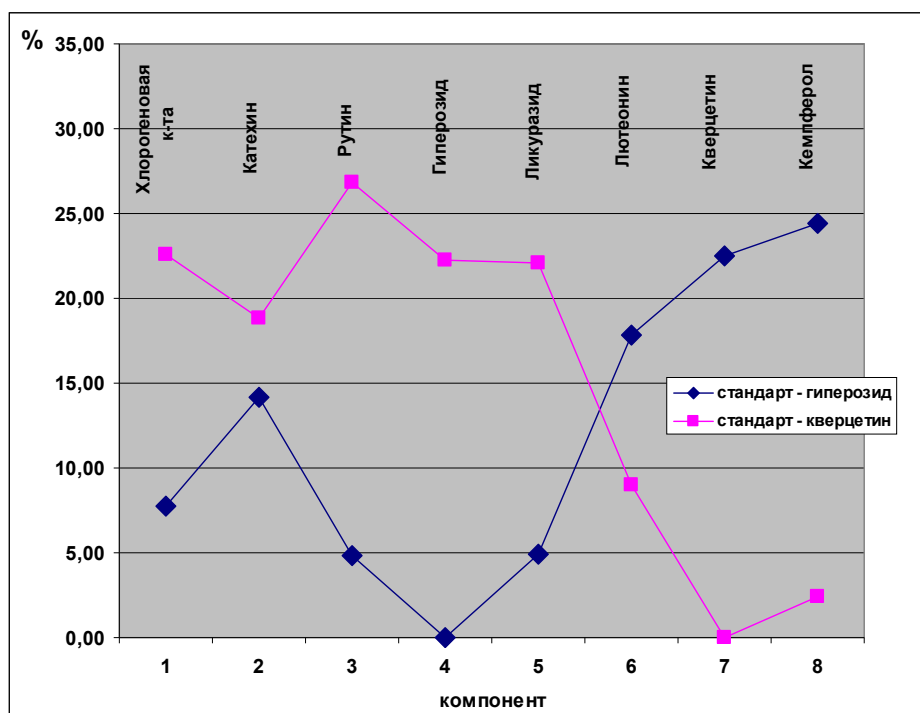


Рисунок 2. Диаграмма зависимости вариальности RRT от выбора пика стандарта.

На рисунке 2 представлена диаграмма, отражающая зависимость вариабельности RRT компонентов от выбора пика стандарта. Как видно, вариабельность RRT компонентов, элюирующихся в начале хроматограммы значительно ниже при расчете по отношению к пику гиперозида и, напротив, для компонентов, элюирующихся в конце хроматограммы, вариабельность, значительно ниже при расчете по отношению к пику кверцетина.

Для оценки возможности неправильной идентификации компонентов разделяемых смесей были рассчитаны значения пиковой емкости [10] для диапазонов идентификации компонентов, ограниченных вариабельностью их RRT. Пиковая емкость представляет собой количество разделенных хроматографических пиков компонентов, способных вместиться в заданный диапазон времени удерживания.

Используя полученные в ходе эксперимента данные RRT и их вариабельности были рассчитаны доверительные интервалы (P=90%) для средних значений RRT для каждого компонента. Затем, используя нижнюю и верхнюю границу доверительных интервалов и времена удерживания компонентов стандартов, были вычислены верхние и нижние границы диапазонов времен удерживания для идентификации определяемых компонентов (уравнение 1).

Пиковую емкость рассчитывали как отношение диапазона времени удерживания для идентификации компонентов к ширине определяемого пика у основания (уравнение 2).

$$\Delta t_r = t_{r,2} - t_{r,1} = (r_G + \Delta r_G) \cdot t_{r(st)} - (r_G - \Delta r_G) \cdot t_{r(st)}, \quad (1)$$

$$P = \frac{\Delta t_r}{w}, \quad (2)$$

где: Δt_r - диапазон времени удерживания для идентификации компонента; $(r_G + \Delta r_G)$ – верхняя граница доверительного интервала для среднего значения RRT; $(r_G - \Delta r_G)$ – нижняя граница доверительного интервала для среднего значения RRT; $t_{r(st)}$ – время удерживания компонента стандарта; P – значение пиковой емкости; w – ширина пика у основания.

Рассчитанная пиковая емкость компонентов модельных смесей для каждой хроматографической колонки представлена в таблице 5. Расчет проведен по значениям вариабельности RRT для пар компонентов; представлены значения пиковой емкости компонентов, в скобках указаны стандарты, по которым рассчитывали RRT.

Таблица 5. Рассчитанная пиковая емкость компонентов для диапазона идентификации компонентов, ограниченного вариабельностью RRT.

№ колонки	Хлорогеновая кислота (катехин)	Катехин (рутин)	Рутин (гиперозид)	Гиперозид (ликуразид)	Ликуразид (лютеолин)	Лютеолин (кверцетин)	Кверцетин (кемпферол)
1	2	3	2	1	9	11	1
2	1	3	1	1	6	6	1
3	1	2	1	1	6	7	1
4	1	3	1	1	5	5	1
5	2	4	2	1	12	11	1
6	1	3	1	1	4	4	1
7	1	1	1	1	5	6	1

Как видно из таблицы 5 для соединений флавоноидов пиковая емкость в среднем составляет 4 и достигает значений 12

Полученные данные показывают, что при воспроизведении методик анализа в диапазоне для идентификации компонентов по их относительным временам удерживания может находиться в среднем 4 разделенных хроматографических пика. В таком случае правильная идентификация интересующего компонента будет невозможна без проведения дополнительных исследований или использования других физико-химических методов.

Выводы

Проведено изучение вариабельности RRT компонентов модельной смесей, содержащей компоненты ряда флавоноидов на 7 различных хроматографических колонках заполненных сорбентом на основе силикагеля с привитыми октадецильными группами (C18). Полученные результаты показали высокую вариабельность определения RRT при использовании различных хроматографических колонок - от 3% до 23% относительного стандартного отклонения. При этом рассчитанная пиковая емкость диапазона для идентификации компонентов по их относительным временам удерживания в среднем составила 4 пика, и достигает 12 пиков, что свидетельствует о достаточно низкой надежности идентификации компонентов по их относительным временам удерживания.

Полученные результаты показывают, что только лишь относительные времена удерживания не могут быть использованы для надежной и однозначной идентификации компонентов, особенно при анализе сложных многокомпонентных матриц, они могут быть использованы лишь для информационных целей [2]. Для повышения надежности идентификации необходимо применять другие, не связанные с удерживанием, характеристики определяемых компонентов, например, такие как использование других способов детектирования, сравнение УФ спектров и/или относительных оптических плотностей при различных фиксированных длинах волн [10].

Для повышения воспроизводимости характеристик удерживания компонентов анализируемых проб, при воспроизведении хроматографических методик в условиях хроматографирования следует четко указывать торговую марку и тип хроматографической колонки, на которой была проведена разработка и валидация методики.

Литература

1. Державна Фармакопея України. 1-е вид. Державне підприємство «науково-експертний фармакопейний центр». Харків: РЕПІГ, 2001. С. 556.
2. United States Pharmacopoeia, 35th edn. The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville MD, 2012. P. 4780.
3. European Pharmacopoeia 7th edn. Council of Europe: France, Strasbourg, 2010. P. 3310.
4. Snyder L. R., Kirkland J.J., Dolan J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons: New York, 2012. P. 912.
5. Dehouck P., Visky D., Kovács Z., Noszál B., Adamsa E., Hoogmartensa J. Uncertainty Related to the Use of Relative Retention Times in Pharmaceutical Analysis. LCGC Europe. 2003, November, 1–8.
6. Lopez L.A., Rutan S.C. Comparison of methods for characterization of reversed-phase liquid chromatographic selectivity. J. Chromatogr. A. 2002, 965, 301–314.
7. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns. J. Chromatogr. A. 2002, 960 (1-2), 19–49.
8. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: III. Results obtained with Kromasil C18 columns. J. Chromatogr. A. 1999, 855 (2), 423–453.
9. Snyder L.R. Maximum resolution per unit time in liquid-solid absorption chromatography. Separation on column vs. thin layer. Anal. Chem. 1967, 39, 705–709.
10. Зенкевич И.Г., Косман В.М. Относительное поглощение при разных длинах волн – дополнительный УФ-спектральный параметр для идентификации органических соединений в обращено-фазовой ВЭЖХ. ЖАХ. 1996, 51 (8), 870 – 874.

References

1. Derjavna Farmakopeya Ukraini. 1-e vid. Derjavne pi'dprie"mstvo «naukovo-ekspertnyi farmakopeyniy centr». Harki'v: RERIG, 2001. S. 556. [in Ukrainian]
2. United States Pharmacopoeia, 35th edn. The United States Pharmacopoeia Convention Inc, Rockville MD, 2012. P. 4780.
3. European Pharmacopoeia 7th edn. Council of Europe: France, Strasbourg, 2010. P. 3310.
4. Snyder L. R., Kirkland J.J., Dolan J. W. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 3rd Edition. John Wiley & Sons: New York, 2012. P. 912.
5. Dehouck P., Visky D., Kovács Z., Noszál B., Adamsa E., Hoogmartensa J. Uncertainty Related to the Use of Relative Retention Times in Pharmaceutical Analysis. LCGC Europe. 2003, November, 1–8.
6. Lopez L.A., Rutan S.C. Comparison of methods for characterization of reversed-phase liquid chromatographic selectivity. J. Chromatogr. A. 2002, 965, 301–314.
7. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on six batches of monolithic columns. J. Chromatogr. A. 2002, 960 (1-2), 19–49.
8. Kele M., Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns: III. Results obtained with Kromasil C18 columns. J. Chromatogr. A. 1999, 855 (2), 423–453.
9. Snyder L.R. Maximum resolution per unit time in liquid-solid absorption chromatography. Separation on column vs. thin layer. Anal. Chem. 1967, 39, 705–709.
10. Zenkevich I.G., Kosman V.M. Otnositel'noe poglosch'enie pri razny'h dlinah voln - dopolnitel'ny'y UF-spektral'ny'y parametr dlya identifikacii organicheskikh soedineniy v obrasch'eno-fazovoy HELC. Journ. analit. himii. 1996, 51 (8), 870 – 874. [in Russian]

Поступила в редакцию 17 июня 2014 г.

I. V. Kudris, A. Yu. Kulikov, O. S. Chernyshova. Оцінка вариабельності відносних часів утримування ряду флавоноїдів на хроматографічних колонках C18.

В роботі проведено дослідження вариабельності відносних часів утримування (RRT) для компонентів модельної суміші флавоноїдів на 7 різних хроматографічних колонках, які заповнено сорбентом на основі силікагелю із прищепленими октадецильними групами (C18). Встановлено, що вариабельність відносних часів утримування залежить від вибору піка стандарту і не може бути застосована для цілей ідентифікації речовин на хроматограмі. Використання декількох речовин на одній хроматограмі для розрахунку RRT не призводить до суттєвому зменшенню вариабельності RRT.

Ключові слова: відносні часи утримування, вариабельність, ВЕРХ, сорбент із прищепленими октадецильними групами.

I. V. Kudris, A. Yu. Kulikov, O. S. Chernyshova. The relative retention time variability evaluation for flavonoids retention on C18 chromatography columns.

In this study the variability of the relative retention times (RRT) for the components of the flavonoids model mixture have been investigated by using 7 different chromatographic columns with octadecilsilica sorbent (C18). It was founded, that the RRT variability depends on the choice of the standard peak, and they cannot be used for substances identification on the chromatogram. The using of several substances in one chromatogram as standard for RRT calculation does not lead to considerable decreasing in RRT variability.

Key words: relative retention time, variability, HPLC, octadecyl silica sorbent.

Kharkov University Bulletin. 2014. № 1123. Chemical Series. Issue 23 (46).