

КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ВЫПУСКАЕМОЙ ПРОДУКЦИИ. РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ И БАДЫ

ОДНОВРЕМЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ РУТИНА, КВЕРЦЕТИНА И ЛЮТЕОЛИНА МЕТОДОМ ВЭЖХ-МС/МС.

Аналитические решения
Markets and Applications Programs



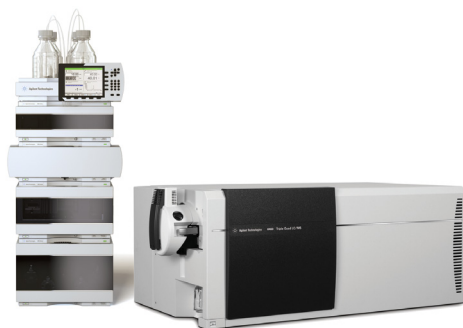
Agilent Technologies

Authorized Partner Laboratory

Авторы

А. Н. Ставрианиди
(Andrey Stavrianidi),
И.А. Родин (Igor Rodin)

Московский государственный
университет имени М.В.
Ломоносова, Химический
факультет.



Разработана и апробирована методика по одновременному определению содержания рутина, кверцетина и лютеолина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Данная методика позволяет проводить достоверную оценку содержаний трех основных флавоноидов в растительном сырье и БАДах на его основе.

Введение

Флавоноиды (и в частности рутин, кверцетин и лютеолин) входят в состав огромного числа растений и БАД-ов на их основе. Лекарственный потенциал этих соединений изучен не полностью. Существует два возможных механизма действия флавоноидов на организм человека: по одной из теорий, сами флавоноиды обладают антиоксидантными свойствами и положительно влияют на состояние сосудов и мембран клеток, оказывая сопротивление процессам старения и ракообразования, вторая теория объясняет аналогичный лечебный эффект защитной реакцией организма на флавоноиды, как инородные для человека соединения.

Содержание этих компонентов в растительных экстрактах и лекарственных средствах определяют с помощью ВЭЖХ с УФ детектированием, согласно европейской и китайской фармакопеям. Такой способ определения затруднен присутствием в экстрактах большого числа компонентов, в том числе других флавоноидов, с близкими временами удерживания и диапазоном поглощения в УФ области спектра. В связи с этим необходимо использовать современные способы детектирования, такие как масс-спектрометрическое и tandemное масс-спектрометрическое детектирование в режиме регистрации выбранных ионных реакций, для достоверной идентификации и оценки содержаний этих веществ в различных объектах. Дополнительным преимуществом селективного масс-спектрометрического детектирования в сочетании с ВЭЖХ является то, что



для каждого из флавоноидов отношения массы к заряду иона-предшественника и фрагментного иона являются специфическими. Это позволяет в большинстве случаев устранить или свести к минимуму матричные эффекты и влияние примесей в любом образце экстракта или лекарственного средства. Для расчета концентраций рутина, кверцетина и лютеолина обычно используют метод абсолютной градуировки.

Экспериментальная часть

Оборудование

Описание	Номер по каталогу
1290 Infinity Quaternary Pump	G4204A
1290 Infinity Autosampler	G4226A
1290 Infinity Thermostat	G1330B
1290 Infinity Thermostatted Column Compartment	G1316C
1290 Infinity Diode Array Detector	G4212A
6460 triple quadrupole mass spectrometer	G6460AA

Условия хроматографирования

Параметр	Значение
Колонка	Agilent ZORBAX SB C18, 4.6 × 150 mm, 5 µm (p/n 883975-902)
Подвижная фаза	Элюент А: 0.1% HCOOH в воде, Элюент Б: Ацетонитрил
Программ градиента	50 % элюента Б, 10 мин
Скорость потока подвижной фазы	1 мл/мин
Температура колонки	30 °C
Объем вводимой пробы	20 мкл
Длина волны УФ-детектирования	254 нм
AJS ESI источник ионов*	Отрицательный
Температура газа-распылителя	300 °C
AJS ESI источник ионов поток газа	7 л/мин
AJS ESI источник ионов давление газа-распылителя	0,345 МПа (50 PSI)
Температура обдувочного газа	325 °C
Скорость потока газа-распылителя	10 л/мин
AJS ESI источник ионов напряжение на капилляре	3500 В
AJS ESI источник ионов напряжение сполы	500 В
МС/МС детектирование Рутин	Мониторинг выбранных ионных реакций (МРМ) m/z (Да): 609-271 и 609-255; Напряжение фрагментатора: 247 В, Энергии соударения: 65 В (одинаковая)
МС/МС детектирование Кверцетин	Мониторинг выбранных ионных реакций (МРМ) m/z (Да): 301-179 и 301-151; Напряжение фрагментатора: 148 В, Энергии соударения: 9 и 13 В
МС/МС детектирование Лютеолин	Мониторинг выбранных ионных реакций (МРМ) m/z (Да): 285-133 и 285-132; напряжение фрагментатора: 166 В, Энергии соударения: 33 и 49 В

Пробоподготовка

Для апробации подхода использовали растительный экстракт из цветков ромашки (*Chamomillae flores*).

Реактивы

Использованы следующие реактивы рутин, кверцетин и лютеолин (98%, Phytolab, Германия), ацетонитрил (99%, Merk, США), образец растительного материала — цветки ромашки, высушенные (КрасногорскЛекСредства, Россия).

Пробоподготовка

В 15 мл пробирку помещают точную навеску 0.1 г растительного материала. Добавляют 10 мл воды и ацетонитрила в соотношении 1:1 и проводят экстракцию в ультразвуковой ванне в течение 30 минут. После центрифугирования при 16000 об/мин и фильтрования экстракт, разбавленный в 100 раз элюентом вносят пипеткой во флакон, используемый в автоматическом дозаторе (виалу). Перед анализом пипетку и флакон промывают образцом не менее трех раз.

Программное обеспечение

Agilent MassHunter Workstation серия: B.06.00 Версия: 6.0.6025.0 2012г

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлена хроматограмма образца экстракта из цветков ромашки, разбавленного в 100 раз. Использование ВЭЖХ совместно с tandemным масс-спектрометрическим детектированием в режиме регистрации выбранных ионных реакций позволило полностью разделить пики рутина и оставшихся двух флавоноидов, селективное детектирование каждого из которых проводится с помощью специфических пар ионных переходов, что позволяет проводить оценку содержаний трех аналитов при совместном присутствии.

Метрологические характеристики методики представлены в таблице 1.

Оценку повторяемости проводили анализом образца экстракта из цветков ромашки, результаты представлены в таблице. 2. Как видно из представленных данных, погрешности определения рутина, кверцетина и лютеолина не превышают 10%.

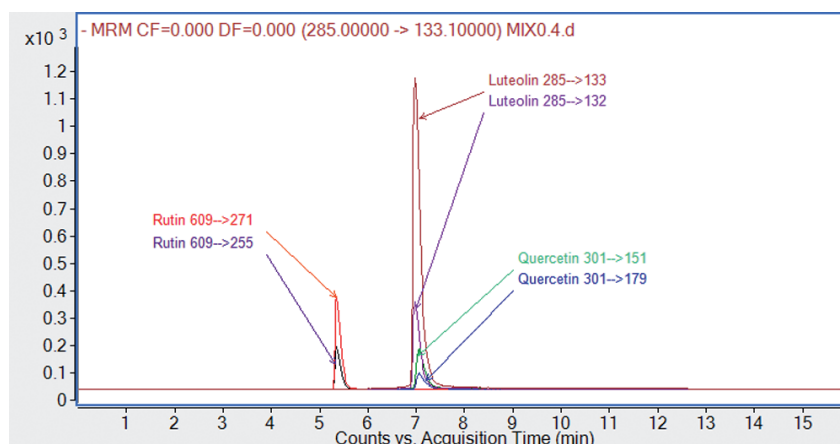


Рисунок 1. Хроматограмма образца экстракта из цветков ромашки, разбавленного в 100 раз.

Вещество	Уравнение градуировочной зависимости	Коэффициент корреляции r	Линейный диапазон, мкг/мл	s_r , %
Рутин	$S=5.3 \cdot C+590$	0.999	0.01-2.0	3.6
Кверцетин	$S=2.1 \cdot C+708$	0.996	0.02-2.0	5.4
Лютеолин	$S=12.1 \cdot C+4360$	0.998	0.01-3.0	4.6

Таблица 1. Метрологические характеристики определения рутина, кверцетина и лютеолина методом ВЭЖХ-МС/МС. $V_{\text{ввод. пробы}} = 20$ мкл. ($n=3$, $P=0.95$).

Вещество	Найдено вещества, мг/г	s_r , %	Фактическая повторяемость, %	Допустимая повторяемость, %
Рутин	4.2 ± 0.7	3.7	4	10
Кверцетин	3.0 ± 1.0	5.3	6	10
Лютеолин	6.3 ± 0.8	4.4	5	10

Таблица 2. Результаты определения ММА в образце растительного материала цветков ромашки ($n=3$, $P=0.95$).

Заключение

На примере анализа экстракта из цветков ромашки апробирована разработанная методика одновременного определения рутина, кверцетина и лютеолина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием. Показано, что данная методика имеет хорошие метрологические характеристики и позволяет достоверно идентифицировать и определять содержание флавоноидов в растительных экстрактах и продуктах на их основе.

Контакты: Agilent MAPs:
maps_agilent@agilent.com

Дополнительная информация:
<http://www.your-analytical-solution.com>

This information is subject to change without notice.

© Agilent Technologies, Inc. 2015
Published in USA, March 15, 2015
5991-5661RURU

