

Marta GLINKA, Marina ANTOLAK, Rafał ŁUKAJTIS, Marian KAMIŃSKI*

Politechnika Gdańska, Wydział Chemiczny, Katedra Inżynierii Chemicznej i Procesowej,
Gdansk University of Technology, Chemical Faculty, Chemical and Process Engineering Department
ul. Gabriela Narutowicza 11/12 80-233 Gdańsk, Poland

*Autor do korespondencji, e-mail: markamin@pg.gda.pl

Wpływ rodzaju kwasu jako dodatku do eluentu na parametry rozdzielania polifenoli techniką chromatografii cieczowej w odwróconych układach faz (RP-HPLC)

Streszczenie: Chromatografia cieczowa jest jedną z technik najczęściej wykorzystywanych w badaniach składu mieszanin, a także do wydzielania czystych składników z mieszanin w postaci frakcji eluatu. Z punktu widzenia współczesnej chemii, farmakologii, a także medycyny, czy biotechnologii, chromatografia pełni ważną rolę, w zakresie analityki jakościowej i ilościowej. Dzięki możliwości otrzymywania naturalnych składników biologicznie czynnych w czystej postaci z ekstraktów pochodzenia naturalnego, jak i składników mieszanin po syntezie organicznej, ma też ważne znaczenie w skali preparatywnej, i coraz większe, w skali procesowej. W celu zapewnienia efektywności procesu konieczne jest dobranie optymalnych warunków realizacji operacji rozdzielania, detekcji oraz kolekcji frakcji, w zależności od właściwości fizykochemicznych składników rozdzielanej mieszaniny. Niniejsza praca dotyczy badań nad optymalizacją warunków stosowanych przy rozdzielaniu składników jednej z grup związków chemicznych stanowiących metabolity roślinne – polifenole.

W pracy zbadano wpływ na retencję, selektywność i sprawność rozdzielania, w tym także na symetrię pików, poprzez zastosowanie dodatków do eluentu w postaci kwasów (HCl, H₃PO₄, H₂SO₄, CH₃COOH, TFA), do rozdzielania wybranych, naturalnie występujących materiałów roślinnych polifenoli w warunkach RP HPLC.

W rozdzielaniu peptydów w układach RP, w tym, w proteomice, najczęściej używanym modyfikatorem fazy ruchomej, jest kwas trifluorooctowy (TFA). Spełnia on wówczas dwie funkcje:

- ogranicza kwaśną dysocjację peptydu (na tzw. „C-końcu”), co zwiększa poziom hydrofobowości molekuł;
- solwatuje sprotonowane lub spolaryzowane, dodatnio naładowane fragmenty cząsteczki peptydu lub białka ujemnymi jonami zdysocjowanego kwasu, powodując wyraźne dodatkowe podwyższenie hydrofobowości rozdzielanych cząsteczek.

W przypadku polifenoli i warunków RP, obecny w eluencie kwas, powoduje jedynie cofnięcie dysocjacji elektrolitycznej rozdzielanych mniej lub bardziej kwaśnych związków chemicznych. Wpływa to na wyraźny wzrost hydrofobowości cząsteczek. Zwiększenie hydrofobowości skutkuje wzrostem współczynnika retencji, poprawą symetrii pików i lepszym rozdzieleniem składników mieszaniny w stosunków do warunków rozdzielania bez dodatku kwasu do eluentu. Badania tej pracy potwierdzają konieczność dodania kwasu do eluentu, w przypadku stosowania warunków faz odwróconych (RP). Pokazują, że każdy z badanych kwasów powoduje korzystne efekty, jednak, najbardziej korzystne - zwłaszcza dla celów analityki - okazuje się stosowanie niewielkiego dodatku kwasu siarkowego (VI).

Słowa kluczowe: RP-HPLC, Polifenole, Optymalizacja rozdzielania, Kwasowy modyfikator eluentu

Effects of the acid additive to the eluent on the chromatographic parameters of separation of polyphenols using reversed phase liquid chromatography (RP-HPLC)

Abstract: Liquid chromatography is the one of commonly used technique in research of mixture composition, and also for separation of pure components form of eluate fractions. From the standpoint of modern chemistry, pharmacology, medicine or biotechnology, chromatography plays an significant role in the field of qualitative and quantitative analysis. Additionally, through the possibility of isolation from natural origin extracts the biologically active components in its pure form, as well as the components of the mixture after organic synthesis, chromatography is important technique, which can be used in preparative and also in process scale. In order to provide the effectiveness of the process, it is necessary to select the optimum conditions of the separation, detection and collection of fractions, which depend on the physiochemical properties of separated components constituting the mixture. This paper, include the research related to optimization of chromatographic conditions, applied for the separation of the one group of chemical compounds, namely plant metabolites – polyphenols. In this research, effects of retention, separation selectivity and efficiency, including the symmetry of peaks, by applying the additive to the eluent in the form of acids (HCl, H₃PO₄, H₂SO₄, CH₃COOH, TFA) for separation naturally occurring in plant polyphenols under RP-HPLC conditions was investigated.

In the separation of peptides under RP conditions, including proteomics, the most commonly used acidic modifier is trifluoroacetic acid (TFA). It meets two functions:

- reduces the acid dissociation of the peptide (on the so-called “C-end”), which results in an increase hydrophobicity of the molecules;
- causes the salvation of the protonated or positively polarized fragments of the peptide or protein molecule by negative ions dissociated acid, resulting in a noticeable increase hydrophobicity of separated molecules.

In the case of polyphenols and RP conditions, the presence of acid in the eluent, cause only the withdrawal of electrolytic dissociation of separated acidic compounds. This can affect the significant increase in the hydrophobicity of the molecules. In addition, increasing hydrophobicity resulting in increase the retention rate, improvement of peak symmetry and better separation of mixture components, regarding to separation without the addition of acid to the eluent. Research, carried out in this study, confirm that it is necessary to use acid additive to the eluent, in the case of reversed phase (RP) conditions. Indicate that each of tested acids results in beneficial effects, however, the most preferred - especially for the purpose of analysis – turns out a small addition of sulfuric acid (VI).

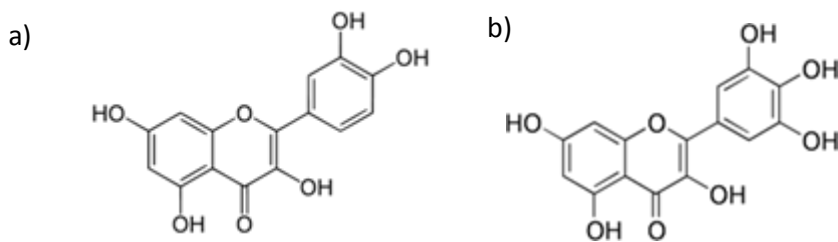
Key words: RP-HPLC, Polyphenols, Optimization of separation, Acidic eluent modifier

1. Wstęp (Introduction)

1.1. Polifenole – właściwości fizykochemiczne i wykorzystanie (Polyphenols – physiochemical properties and their applications)

Polifenole są naturalnie występującymi związkami chemicznymi, charakteryzującymi się obecnością pierścieni aromatycznych podstawionych przynajmniej dwiema grupami hydroksylowymi (–OH). Głównymi źródłami polifenoli są: owoce, warzywa, przyprawy, zioła oraz napoje tj. czerwone wino, czy zielona herbata. Ze względu na swoje właściwości farmakologiczne, w tym przeciwutleniające, polifenole wykorzystywane są jako składniki kosmetyków oraz farmaceutyków. Dieta bogata w związki z grupy polifenoli, ze względu na ich silne działanie antyoksydacyjne, może znacznie zmniejszyć ryzyko wielu schorzeń cywilizacyjnych, m.in. chorób nowotworowych oraz układu krążenia [1, 2]. Ponadto, związki te wykazują działanie przeciwalergiczne, a także przeciwzapalne [3]. Dodatkowo stwierdzono, że polifenole pochodzenia naturalnego są łatwiej przyswajalne przez organizmy żywe w porównaniu do syntetycznych przeciwutleniaczy, tj. BHA (butylohydroksyanizolu) czy BHT (butylohydroksytoluenu). Dlatego korzystne jest pozyskiwanie naturalnych polifenoli z materiału roślinnego. To z kolei wpływa na rozwój technik rozdzielania i wydzielenia tych substancji w postaci czystej w skali preparatywnej oraz procesowej.

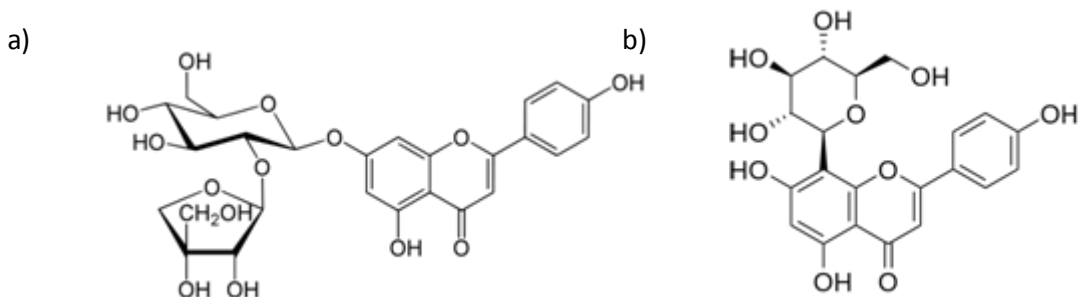
Ze względu na budowę strukturalną, polifenole można podzielić na kilka następujących podgrup: kwasy fenolowe, flawonoidy, kwasy hydroksycynamonowe [4]. Najlepiej poznaną dotychczas grupą są flawonoidy (rys. 1), ich struktura chemiczna oparta jest na układzie flawonu. Zawierają one 15 atomów węgla, które tworzą dwa pierścienie fenylove, połączone ze sobą poprzez strukturę piranu (flawanole, antocyjany) bądź pironu (flawony, flawanony, flawanole, izoflawony).



Rys. 1. Struktury molekularne dwóch flawonoidów: a) kwercetyna, b) mirycetyna.
Fig. 1. Molecular structures of two flavonoids: a) quercetin, b) myricetin.

Naturalnie występujące flawonoidy, będące przedmiotem niniejszych badań, posiadają w swojej strukturze grupy hydroksylowe znajdujące się w konkretnych położeniach. Grupy –OH, znajdujące się blisko struktury ketonu lub umiejscowione kilka obok siebie, mają kwasowy charakter, dlatego w obecności wody dochodzi do odszczepiania protonów.

Flawonoidy zwykle występują jako glikozydy flawonoidowe (rys. 2), zawierające w swojej strukturze część cukrową, rozpuszczalną w wodzie (glikozydy) oraz nie cukrową, znacznie gorzej rozpuszczalną (aglikony), jednakże oba rodzaje charakteryzują się dobrą rozpuszczalnością w alkoholach. Są to głównie O – glikozydy, bądź C – glikozydy [5].



Rys. 2. Struktury molekularne flawonoidów w postaci: a) O – glikozydu (Apiin), b) C – glikozydu (Vitexin).
Fig. 2. Molecular structure of flavonoids in the form of: a) O – glycoside (Apiin), b) C – glycoside (Vitexin).

1.2. Modyfikatory eluentów wykorzystywanych w technice wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie faz odwróconych RP-HPLC – rodzaje i funkcje stosowanych dodatków (*Modifiers of eluents used in the reversed phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) – classification and function of additives*)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa w układzie faz odwróconych (RP-HPLC) jest główną techniką wykorzystywaną obecnie do rozdzielania polifenoli pochodzących z materiałów roślinnych [5-6]. Powierzchnia sorpcyjna w tego typu układach składa się z niepolarnych, hydrofobowych łańcuchów alkilowych (np. nC18, nC8), propylonitrylowych bądź arylowych lub diarylowych, a także innych (np. C32, izo- lub fluoro-alkanów, o określonych strukturach molekuł), związanych wiązaniami kowalencyjnymi z powierzchnią nośnika (np. na drodze reakcji grup –OH na powierzchni żelu krzemionkowego z utworzeniem wiązań siloksanowych z C18, albo z innymi grupami funkcyjnymi o charakterze hydrofobowym). Fazę ruchomą zwykle stanowi mieszanina wody i składnika organicznego (najczęściej acetonitrylu (ACN) bądź metanolu (MeOH)).

W celu optymalizacji warunków rozdzielania mieszanin o złożonym składzie (np. próbki ekstraktów roślinnych) wykorzystuje się różnego typu modyfikacje układów chromatograficznych. Ma to na celu zwiększenie efektywności procesu rozdzielania, a w konsekwencji uzyskanie składników mieszaniny o jak najwyższej czystości. W układzie faz odwróconych najłatwiejszą do wykonania, a zarazem dającą znaczące rezultaty, jest modyfikacja fazy ruchomej polegająca na wprowadzeniu dodatków w ilości nie większej niż kilka procent objętościowych. Jednocześnie, nie powodującej szkodliwego działania na fazę stacjonarną. W tabeli nr 1 zestawiono najczęściej wykorzystywane przykłady modyfikatorów oraz opisano ich rolę.

Tabela 1. Zestawienie dodatków do eluentów, wykorzystywanych w chromatografii cieczowej w układach faz odwróconych (RP).

Table 1. Summary of additives to the eluents, used in reversed phase (RP) liquid chromatography.

Lp.	Rodzaj dodatku do eluentu (<i>Type of eluent additive</i>)	Przykłady (<i>Examples</i>)	Funkcje (<i>Functions</i>)	Lit. (<i>Ref.</i>)
1.	Kwasy/zasady organiczne lub nieorganiczne (<i>Organic or inorganic acids/bases</i>)	CH ₃ COOH, TFA, DMA, TMA, MEA, H ₂ SO ₄ , RSO ₂ H ⁺	- stosowane w celu "cofnięcia" dysocjacji elektrolitycznej (odpowiednio kwasowej, zasadowej) substancji rozdzielanych (<i>applied to „withdraw” electrolytic (acid/base) dissociation of separated substances</i>) - solwatacja sprotonowanych grup funkcyjnych (przez aniony posiadające hydrofobowe fragmenty cząsteczek) dla zwiększenia oddziaływań hydrofobowych z powierzchnią sorpcyjną (<i>solvation of protonated functional groups (via anions with hydrophobic moieties) to increase the hydrophobic interaction with sorption surface</i>)	[7, 8]
2.	Kompleksony (<i>Complexing agents</i>)	EDTA	- stosowane w celu kompleksowania jonów metali ciężkich, a także zmniejszenia heterogeniczności powierzchni sorpcyjnej (<i>used for the complexation of heavy metals ions and to reduce the heterogeneity of the sorption surface</i>)	[9]
3.	Środki powierzchniowo-czynne (<i>Surfactants</i>)	SDS, SLS	- micelizacja (tworzenie miceli „normalnych” bądź odwróconych) (<i>micellisation – the formation of “normal” or “reversed” micelles</i>)	[10]
4.	Sole (<i>Salts</i>)	RSO ₃ Me ⁺ , RSO ₃ H ⁺ , RR ₃ N ⁺ OH, R ₃ N ⁺ X ⁻	- tworzenie par jonowych z jonami próbki, w celu utworzenia neutralnych par jonowych (<i>the formation of ion pairs with ions contained in the sample, in order to create a neutral ion pairs</i>)	[11]

* TFA – kwas trifluorooctowy (ang. *Trifluoroacetic acid*); DMA – dimetyloamina (ang. *Dimethyloamine*); TMA – trimetyloamina (ang. *Trimethyloamine*); MEA – monoetanolamina (ang. *Monoethanolamine*); R – symbol niepolarnych, hydrofobowych grup funkcyjnych (ang. *symbol of the non-polar, hydrophobic functional group*); EDTA – kwas wersenowy (ang. *Ethylene diamine tetraacetic acid*); SDS – siarczan dodecylu sodu (ang. *Sodium dodecyl sulfate*); SLS – siarczan laurylu sodu (ang. *Sodium lauryl sulfate*); Me⁺ – kation metalu (ang. *metal cation*); X⁻ – anion niemetalu (ang. *non-metal anion*).

Do rozdzielania substancji o charakterze kwaśnym, jak ma to miejsce, np. w przypadku polifenoli, korzystne jest stosowanie kwasów, jako dodatku do fazy ruchomej, w celu obniżenia pH eluentu, tak by spełniony był następujący warunek $\text{pH} < (\text{pK}_a - 0,5 \div 1)$, jednakże przy zachowaniu wartości bezpiecznej dla fazy stacjonarnej – tzn. niepowodującej hydrolizy wiązań siloksanowych. W praktyce, za optymalną wartość uznaje się $\text{pH} \geq 2$. Obniżenie wartości pH eluentu stosowanego do rozdzielania lub analizy związków chemicznych będących słabymi kwasami powoduje cofnięcie dysocjacji elektrolitycznej a w konsekwencji wzrost hydrofobowości i siły oddziaływań z fazą stacjonarną. W poniższej tabeli przedstawiono opisane w literaturze naukowej, przykładowe warunki chromatograficzne, stosowane do rozdzielania flawonoidów obecnych w ekstraktach roślinnych techniką RP-HPLC z wykorzystaniem różnych rodzajów kwasów jako modyfikator fazy ruchomej.

Tabela 2. Zestawienie przykładowych warunków rozdzielania flawonoidów techniką RP-HPLC.

Table 2. Summary of examples of chromatographic conditions for flavanoids separation using RP-HPLC.

Ekstrahowany materiał <i>(Extracted material)</i>	Przygotowanie próbki/warunki ekstrakcji <i>(Sample preparation/extraction conditions)</i>	Warunki chromatograficzne <i>(Chromatographic conditions)</i>	Przykład oznaczanych polifenoli <i>(Example of analyzed polyphenols)</i>	Lit. <i>(Ref.)</i>
<i>Cynara cardunculus</i>	Ekstrakcja liści w 70% EtOH z dodatkiem kw asu mrów kowego (pH = 3,2) <i>(Extraction of leaves with 70% EtOH and addition of formic acid, pH = 3,2)</i>	Eluent A: H ₂ O (z dodatkiem HCOOH do pH = 3,2) Eluent B: CH ₃ CN Elucja gradientow a: 30 min: gradient liniowy od 0 do 100% B Kolumna: C ₁₈ Temperatura: 27° C V = 0,6 ml/min Detekcja: DAD	Luteolina O-lukozyd; Luteolina 7-O-malonyglukozyd; Apigenina 7-O-rutynozyd;	[12]
Oliwa z oliwek <i>(Olive oil)</i>	Ekstrakcja SPE, C ₈ , rozpuszczalniki (w kolejności użycia): — n-heksan (elucja składników niepolarnych), — acetonitryl, metanol oraz mieszanina metanol-woda (1:1 v/v) (wymywanie kolejnych frakcji składników polarnych) <i>(Extraction SPE, C₈; solvents, respectively, in the order: — n-hexane (in order to remove the non-polar fraction) — acetonitrile, methanol, methanol-water 1:1 v/v) (in order to gradually remove polar fractions)</i>	Eluent A: H ₂ O/CH ₃ COOH (98:2 v/v)/ Eluent B: CH ₃ OH/ CH ₃ CN (1:1 v/v) Elucja gradientow a: 25 min: 95 – 70% A 10 min: 70 – 60% A 5 min: 60 – 52% A 10 min: 52 – 30% A 5 min: 30 – 0% A 10 min: 0 – 95% A 5 min: 95% A Kolumna: C ₁₈ Temperatura: 25° C V = 0,5 ml/min Detekcja: DAD	Kwas 3,4-dihydroksy-fenylloctowy; Tyrosol; Oleuropeina;	[13]
<i>Ilex paraguariensis</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem gorącej wody <i>(Extraction by the using a hot water)</i>	Eluent A: H ₂ O/CH ₃ COOH (98:2 v/v) Eluent B: CH ₃ OH/CH ₃ COOH (98:2 v/v) Elucja gradientow a: 30 min: 15 – 40% B 10 min: 40 – 75% B 5 min: 75 – 85% B Kolumna: IB-SIL RP C ₁₈ Temperatura: <i>(nie podano)</i> V = 1,2 ml/min Detekcja: DAD	Rutyna; Pochodne kaw oilo;	[14]
Zielona herbata <i>(Green tea)</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem gorącej wody <i>(Extraction by the using a hot water)</i>	Eluent: H ₂ O/CH ₃ OH (70:30 v/v) + 0,1% CH ₃ COOH Kolumna: SB-C ₁₈ Temperatura: <i>(nie podano)</i> V = 1 ml/min Detekcja: DAD	Procyjanidy; Epikatechina; Katechina;	[15]

Ekstrahowany materiał <i>(Extracted material)</i>	Przygotowanie próbki/warunki ekstrakcji <i>(Sample preparation/extraction conditions)</i>	Warunki chromatograficzne <i>(Chromatographic conditions)</i>	Przykład oznaczanych polifenoli <i>(Example of analyzed polyphenols)</i>	Lit. <i>(Ref.)</i>
Suplementy diety zawierające polifenole <i>(Dietary supplements containing polyphenols)</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem metanolu <i>(Extraction by the using a methanol)</i>	Eluent A: H ₂ O/CF ₃ COOH (99,95:0,05 v/v) Eluent B: CH ₃ CN Elucja gradientowa a: 0,5 min: 95 – 80% A 1,5 min: 80 – 60% A 1,5 min: 60 – 10% A Kolumna: C ₁₈ Temperatura: 25 °C V = 1 ml/min (t = 0 min); 0,5 ml/min (t = 0,5 min); 0,4 ml/min (t = 2 min); 0,9 ml/min (t = 3,5 min) Detekcja: DAD	Rutyna; Kwercetyna; Hesperydyna;	[16]
Suplementy diety zawierające polifenole <i>(Dietary supplements containing polyphenols)</i>	Ekstrakcja z wykorzystaniem metanolu <i>(Extraction by the using a methanol)</i>	Eluent A: CH ₃ CN Eluent B: H ₂ O/CF ₃ COOH (99,95:0,05 v/v) Elucja gradientowa a: 0,5 min: 8 – 13% A 0,5 min: 13 % A 1 min: 13 – 25% A 0,5 min: 25 – 35% A 0,5 min: 35% A 1 min: 35 – 70% A 1,5 min: 70 – 80% A 0,5 min: 80 – 8% A Kolumna: RP-18e Temperatura: 20 °C V = 1,3 ml/min (t = 0-1 min); 1,2 ml/min (t = 1-3 min); 1,3 ml/min (3-4,5 min); 1,2 ml/min (4,5-5 min) Detekcja: DAD	Rutyna; Kwercetyna; Hesperydyna; Neohesperydyna; Katechiny;	[17]

Na podstawie zestawionych w tabeli nr 2 przykładów przytoczonych z literatury naukowej, można zauważyć, że istnieje wiele możliwości optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego, tak aby wyizolować związki chemiczne z grupy polifenoli z materiału roślinnego. Dotychczasowe rezultaty badań dotyczących rozdzielania mieszanin polifenoli [12-17] sugerują, że korzystniejsze jest użycie acetonitrylu który charakteryzuje się większą siłą elucji niż metanol co ma wpływ szczególnie na współczynnik retencji [16]. Zaobserwowano m.in. znaczące skrócenie czasu retencji składników mieszanin. Rezultaty innych badań dowodzą, że użycie dodatku do fazy ruchomej w postaci buforów może powodować rozkład izoflawonów o charakterze estrowym, dlatego tak istotne jest, by w tego typu rozdzielaniach zapewnić kwaśne środowisko fazy ruchomej [18]. Magiera i współpracownicy udowodnili również że wzrost pH od ok. 3 do 6 powodował zwiększenie stopnia rozmycia pików chromatograficznych, natomiast dla pH = 2,5±3 uzyskali oczekiwany poziom rozdzielania składników [16,17]. W większości przypadków zastosowań techniki RP, znacznie bardziej korzystne jest stosowanie elucji gradientowej, pozwalającej na uzyskanie wymaganego stopnia rozdzielania oraz wyższej czułości. Tego typu rozdzielania są zazwyczaj preferowane, gdy obecne w mieszaninie substancje charakteryzują się istotnymi różnicami w hydrofobowości. Jednakże do zastosowań na większą skalę (*semi*-preparatywną, preparatywną), realizacja rozdzielania w programie elucji gradientowej jest niekorzystna i może to powodować utrudnienia związane z realizacją procesu, głównie poprzez konieczność ścisłej kontroli składu eluentu oraz stosowanie dodatkowej aparatury. Należy nadmienić także, że w przypadku elucji gradientowej, proces recyrkulacji eluentu, a także regeneracji złoża kolumny jest znacznie bardziej utrudniony, niż w przypadku elucji izokratycznej, co także wywiera istotny wpływ na możliwość wykorzystania na skalę procesową. Ze względu na powyższe, w pracy badawczej przeprowadzono rozdzielania jedynie w warunkach izokratycznych z zastosowaniem ACN, jako organicznego składnika eluentu. Rozwiązanie to umożliwiło także na dokonanie jednoznacznej oceny wpływu dodatku kwasu na retencję składników (przy niezmiennym sile elucyjnej fazy ruchomej).

2. Część doświadczalna (Experimental)

2.1. Aparatura i odczynniki (Apparatus and reagents)

W celu zbadania wpływu rodzaju kwasu na retencję polifenoli, wykorzystano chromatograf ciekowy LaChrom (Merck – Hitachi, Niemcy) z czterokanałowym systemem elucji gradientowej z zaworami proporcjonującymi; pompę L-7100 oraz zawór dozujący Rheodyne Rh-7725i z pętlą dozującą o objętości 20 μ l; detektor: UV-VIS DAD L-300 z rejestracją w zakresie długości fali promieniowania: 200–360 nm oraz kolumny chromatograficzne: LiChrospher RP18 5 μ m, 250x4 mm (Merck, Niemcy), LiChrospher RP18e 5 μ m, 250x4 mm (Merck, Niemcy). Próbkę wzorców rozpuszczano w acetonitrylu oraz filtrowano z wykorzystaniem filtrów strzykawkowych (0,45 μ m, Millipore). Próbkę dozowano strzykawką o objętości całkowitej 100 μ l (Hamilton, USA).

Substancje wzorcowe: kwercetyna (Sigma Aldrich), mirycetyna (Sigma Aldrich). Pozostałe odczynniki: acetonitryl o czystości gradient grade (Merck, Niemcy), woda dejonizowana (otrzymana za pomocą aparatu Mili Q, Millipore, USA), kwas solny cz.d.a. (POCH, Polska), kwas trifluorooctowy o czystości gradient grade (Merck, Niemcy), kwas siarkowy cz.d.a. (P.P.H. Standard, Polska), kwas octowy cz.d.a. (POCH, Polska).

2.2. Metodyka badań (Research)

Każdorazowo pobierano ok. 50 μ l roztworu kwercetyny (stężenie ok. 1,8 mg/ml w acetonitrylu (ACN) lub mirycetyny (ok. 2 mg/ml w AcCN). Wprowadzono do pętli zaworu dozującego o objętości: 20 μ l. Objętość dozowania wynosiła więc wówczas 20 μ l.

Objętość dozowania V_i , w przypadku wysokosprawnej chromatografii ciekowej w skali analitycznej, powinna być jak najmniejsza. Zawsze powinna być mniejsza od wartości wyrażenia: $((V_c/N)/2)$, gdzie: V_c - objętość wypełnienia kolumny, a N - liczba pól teoretycznych kolumny. Dla kolumny o długości wypełnienia, $L_c=250$ mm i jego średnicy $d_c = 4$ mm, gdy liczba pól teoretycznych kolumny N , to ok. 5000, wynosi ok. 43 μ L. W praktyce objętość dozowania powinna, więc, mieścić się w granicach od 5 do 40 μ l. W przypadku niniejszych badań, wynosiła 20 μ l, co jest zgodne z podaną wyżej zasadą.

Rejestrację widm prowadzono w zakresie promieniowania o długościach fali: od 200 do 560 nm, z zastosowaniem detektora UV-DAD L-300. Chromatogramy uwzględnione w tej pracy wykonano dla takich długości fali, by zapewnić liniowy zakres odpowiedzi detektora.

Dokładne dane w Tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie warunków rozdzielania chromatograficznego.

Table 3. Summary of chromatographic separation conditions.

1	Substancje wzorcowe (Reference substances)	a) Kwercetyna (ang. <i>Quercetin</i>), $C = 1,8$ mg/ml b) Mirycetyna (ang. <i>Myricetin</i>), $C = 2$ mg/ml
2	Skład eluentów (Composition of eluents)	Mieszanina ACN/H ₂ O 3:7 (v/v) zakwaszana do pH = 3: <i>Mixture of ACN//H₂O 3:7 (v/v), pH adjusted to 3, with:</i> a) CH ₃ COOH (1 cm ³ na 1 dm ³ mieszaniny ACN/H ₂ O), b) H ₃ PO ₄ (1 cm ³ na 1 dm ³ mieszaniny ACN/H ₂ O), c) TFA (0,5 cm ³ na 1 dm ³ mieszaniny ACN/H ₂ O), d) HCl (1 cm ³ na 1 dm ³ mieszaniny ACN/H ₂ O), e) H ₂ SO ₄ (1 cm ³ na 1 dm ³ mieszaniny ACN/H ₂ O),
3	Kolumna Chromatograficzna (Column)	a) LiChrospher RP18e 5 μ m, 250x4 mm, $t_0 = 1,98$ min, b) LiChrospher RP18 μ m, 250x4 mm, $t_0 = 1,98$ min.
4	Natężenie przepływu eluentu (Eluent flow rate)	1 ml/min
5	Detekcja (Detection)	UV – VIS DAD

Zastosowano elucję izokratyczną z fazą ruchomą, w postaci mieszaniny dwuskładnikowej (3:7 v/v): acetonitrylu oraz wody z dodatkiem kwasu: octowego, ortofosforowego, trifluorooctowego (TFA), solnego bądź siarkowego.

Objętość dodatku kwasu wyznaczono doświadczalnie z wykorzystaniem pH-metru, tak by pH czystego roztworu wodnego wynosiło 3. W tym celu do 1 dm³ wody dodawano porcjami znaną objętość kwasu, kontrolując by pH nie przekraczało wymaganej wartości. Następnie sporządzono roztwory eluentów ACN/H₂O (3:7 v/v) z dodatkiem analogicznej do wyznaczonej ilości dodatku danego kwasu na 1 dm³ mieszaniny (tabela 3). Rozdzielanie wykonano w temperaturze pokojowej (20°C). Natężenie przepływu eluentu ustawiono na 1 ml/min

3. Wyniki i dyskusja

(Results and discussion)

Analiza wpływu dodatku różnych kwasów do fazy ruchomej na parametry rozdzielania chromatograficznego, została przeprowadzona z użyciem dwóch naturalnie występujących w materiale roślinnym polifenoli z grupy flawonoidów: kwercytiny oraz mirycetyny. Związki te posiadają właściwości słabych kwasów (pK_a ≈ 6,5) [19], szczególnie ze względu na obecność hydroksylowych grup funkcyjnych obecnych w ich strukturze. W przypadku tego typu związków chemicznych dodatek kwasu do eluentu ma wpływ na cofnięcie ich dysocjacji elektrolitycznej, a tym samym na wzrost ich hydrofobowości [20]. Równanie 1, przedstawia schematyczną reakcję dysocjacji kwasu w środowisku wodnym:



gdzie:

H_xA – kwas,

H₃O⁺ – jon hydroniowy,

A^{x-} – anion reszty kwasowej.

W przypadku słabych kwasów, dysocjacja zachodzi jedynie w pewnym, ograniczonym stopniu. W tego typu roztworach ustala się równowaga między częścią zdysocjowaną a niezdisocjowaną, co oznacza, że liczba zdysocjowanych cząsteczek jest identyczna jak liczba cząsteczek powstałych w wyniku połączenia się jonów. Stosunek stężeń powyższych indywiduów chemicznych pozwala na wyznaczenie stałej dysocjacji (K_a), wyrażonej równaniem nr 2:

$$K_a = \frac{[H_3 O^+]^x [A^{x-}]}{[H_x A] [H_2 O]} \quad (2)$$

gdzie:

[] – stężenie poszczególnych indywiduów chemicznych (cząsteczki/jony), [mol/dm³]

Alternatywnie do wartości K_a, można posługiwać się parametrem pK_a, określającym w sposób ilościowy moc kwasu. Zależność stałą dysocjacji, a mocą kwasu przedstawia równanie (3):

$$pK_a = -\log[K_a], \quad (3)$$

natomiast pH wyrażane jest jako zależność:

$$pH = -\log[H_3 O^+] \quad (4)$$

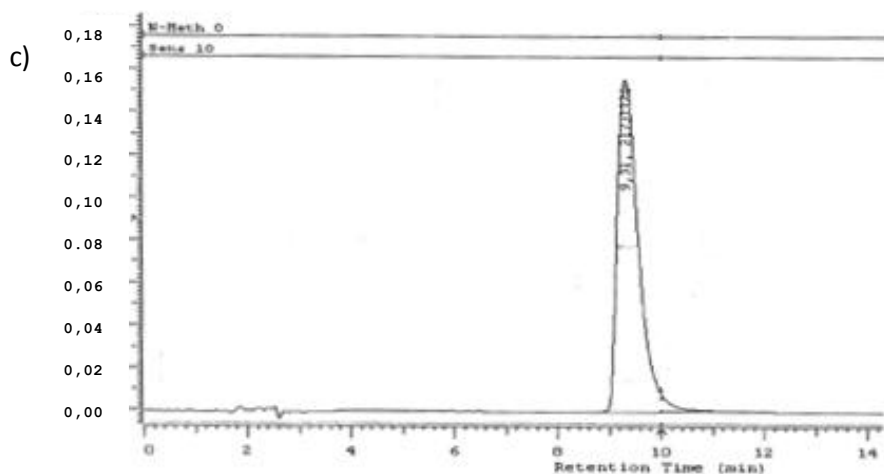
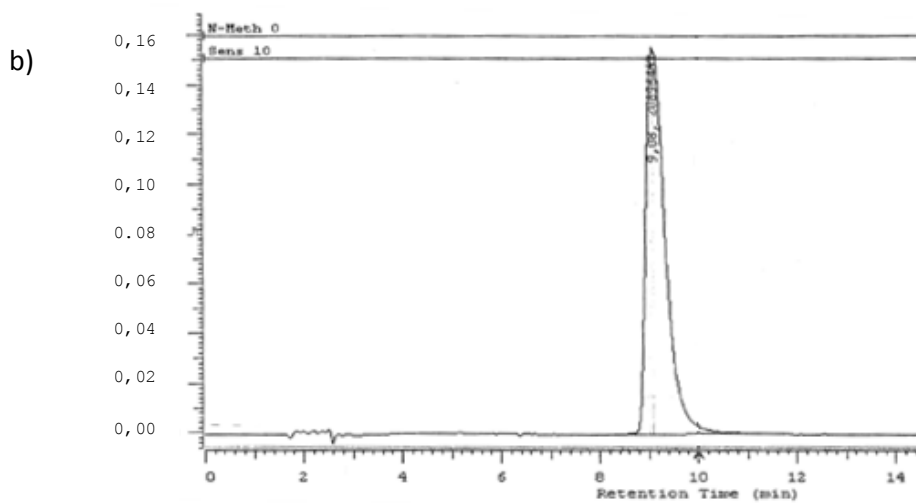
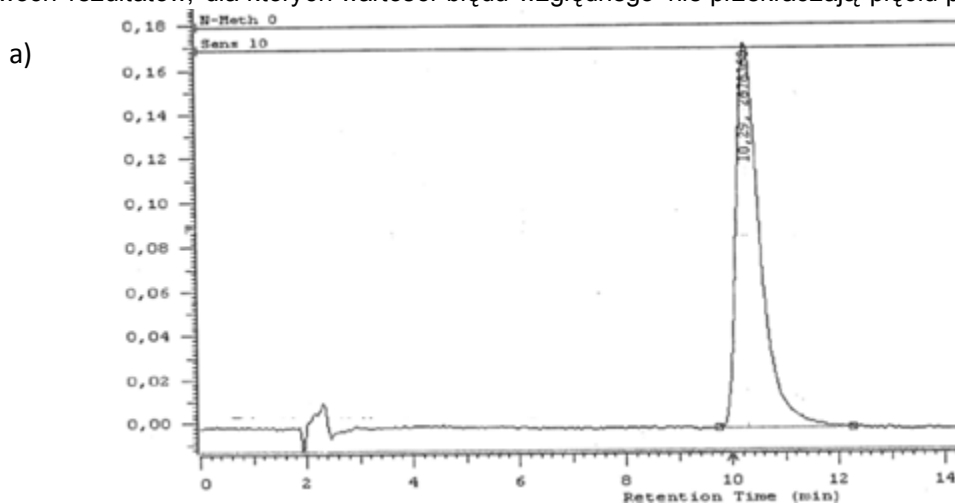
Jeśli do roztworu słabego kwasu, znajdującego się w równowadze określonej wzorem (2) zostaną wprowadzone w jony hydroniowe (obniżenie pH roztworu mocnym kwasem), wówczas pierwotnie ustalona równowaga zostanie zakłócona, i w konsekwencji nastąpi cofnięcie dysocjacji – wzrost stężenia niezdisocjowanego kwasu oraz spadek stężenia jonów. Wynika to z nadmiaru jonów [H₃O⁺] w roztworze w stosunku do jonów [A^{x-}] i ponownego łączenia się wyżej wspomnianych jonów w cząsteczki. Efekt ten ma znaczenie zwłaszcza podczas realizacji rozdzielania w odwróconym układzie faz, gdzie mamy do czynienia z oddziaływaniami sorpcyjnymi rozdzielanych substancji z hydrofobowymi fragmentami fazy stacjonarnej [21, 22]. Rozdzielanie w układzie RP substancji, które w zastosowanych warunkach chromatograficznych ulegają dysocjacji, powoduje że są one eluowane z objętością martwą kolumny.

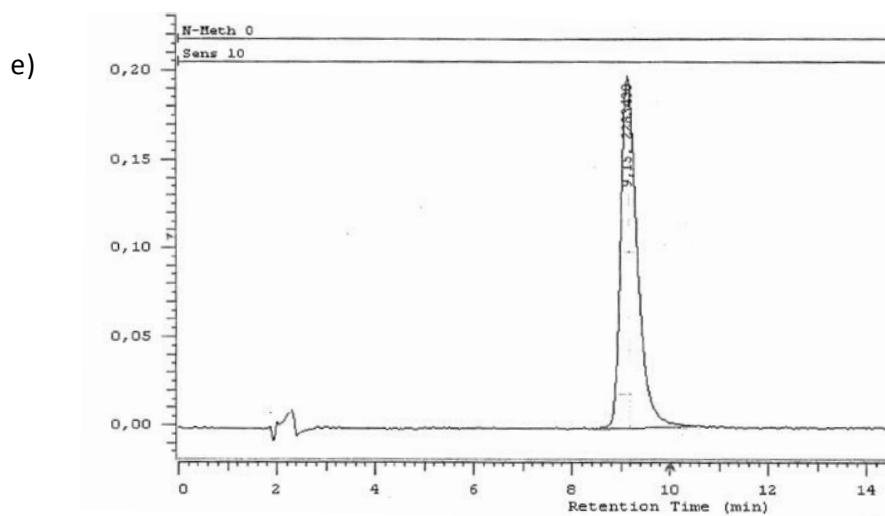
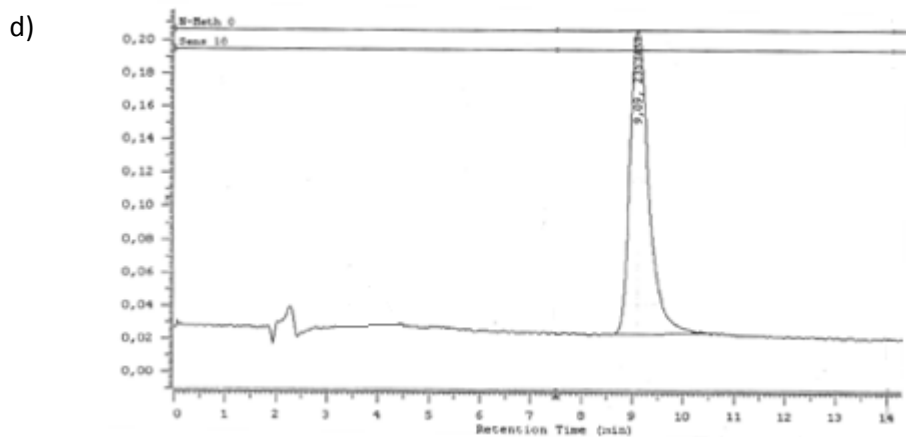
Analogiczne zjawisko wykorzystywane jest w niniejszych badaniach. Obniżenie pH eluentu.

Wybrane do badań kwasy różnią się pod względem siły oraz hydrofobowości. Największą hydrofobowością spośród zastosowanych kwasów charakteryzują się kwasy: TFA oraz octowy. Natomiast pod względem kwasowości, szereg ten przedstawia się następująco: kwas solny (najsilniejszy kwas, pK_a = -8,0) > kwas siarkowy (pK_a = -3,0) > TFA (pK_a = 0,52) > kwas ortofosforowy (pK_a = 2,12) > kwas octowy (pK_a = 4,76). Wszystkie z wybranych kwasów spełniają wymagany warunek, mianowicie pK_a kwasu,

stanowiącego dodatek do eluentu musi posiadać niższą wartość, niż rozdzielane składniki – w powyższych badaniach wybrane flawonoidy. Powoduje to gwarancję cofnięcia dysocjacji elektrolitycznej analitów.

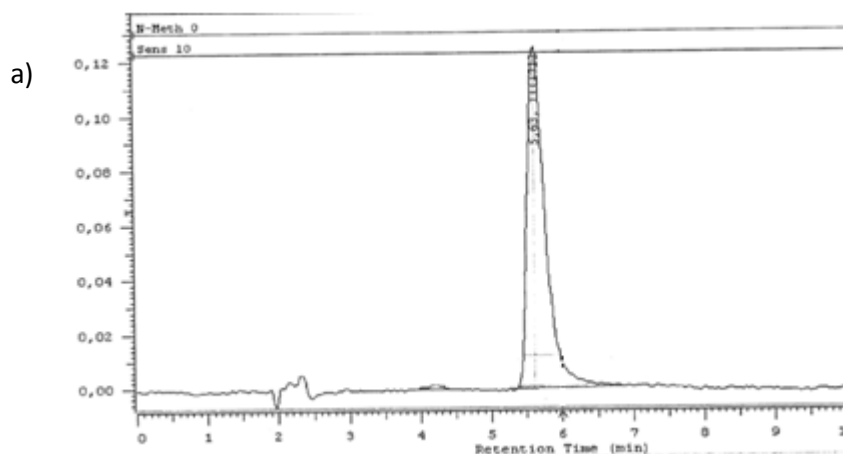
Chromatogramy z przeprowadzonych badań przedstawione są na rysunkach 3 i 4. Celem jednoznacznego oraz dokładnego ukazania wpływu rodzaju kwasu, jako dodatku do eluentów na poszczególne związki z grupy flawonoidów, analizie chromatograficznej poddano pojedyncze wzorce. Umożliwiło to także określenie kolejności elucji powyższych (analiza jakościowa) oraz wyznaczenie wartości głównych parametrów chromatograficznych. Wszystkie analizy roztworu wzorców flawonoidów, wykonano przynajmniej dwukrotnie, dla każdego z eluentów, a przedstawione wyniki są wartościami średnimi co najmniej dwóch rezultatów, dla których wartości błędów względnego nie przekraczają pięciu procent.

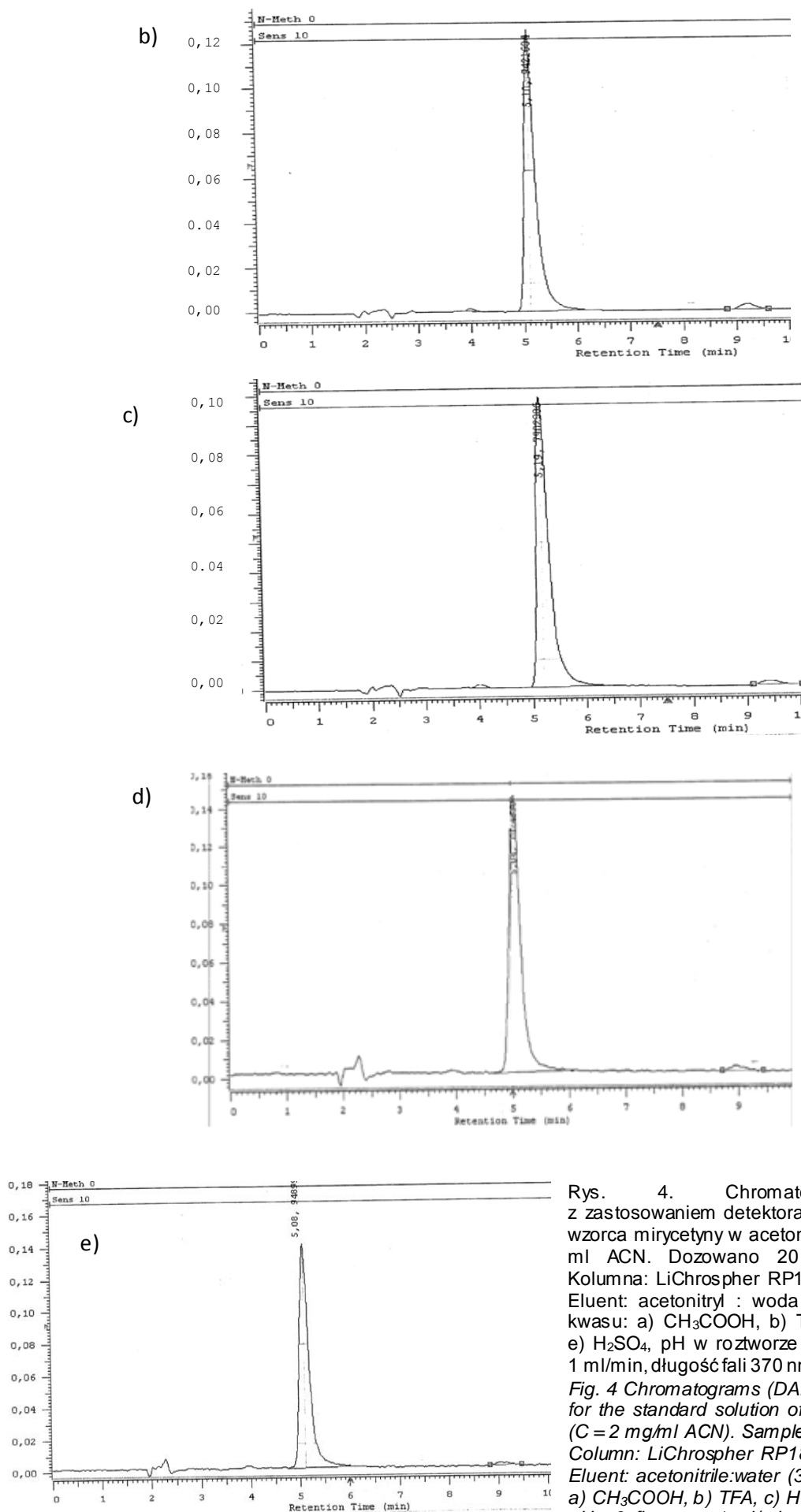




Rys. 3. Chromatogramy, otrzymane z zastosowaniem detektora UV-VIS DAD, roztworu wzorca kwercetyny w acetonitrilu, o stężeniu 1,8 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 250 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitril : woda (3:7 v/v) z dodatkiem kwasu: a) CH_3COOH , b) TFA, c) HCl, d) H_3PO_4 , e) H_2SO_4 ; pH=3; przepływ 1 ml/min, długość fali 365 nm.

Fig. 3 Chromatograms (DAD, $\lambda = 365 \text{ nm}$) obtained for the standard solution of quercetin in acetonitrile ($C = 1,8 \text{ mg/ml}$ ACN). Sample injection volume: 20 μ l. Column: LiChrospher RP18e, 250 x 4 mm, 5 μ m. Eluent: acetonitrile:water (3:7 v/v) with addition of: a) CH_3COOH , b) TFA, c) HCl, d) H_3PO_4 , e) H_2SO_4 ; pH= 3; flow rate: 1 ml/min.





Rys. 4. Chromatogramy, otrzymane z zastosowaniem detektora UV-VIS DAD, roztworu wzorca mirycetyny w acetonitrilu, o stężeniu 2 mg / ml ACN. Dozowano 20 μ l roztworu wzorca. Kolumna: LiChrospher RP18e, 250 x 4 mm, 5 μ m; Eluent: acetonitril : woda (3:7 v/v) z dodatkiem kwasu: a) CH_3COOH , b) TFA, c) HCl, d) H_3PO_4 , e) H_2SO_4 , pH w roztworze wodnym = 3, przepływ 1 ml/min, długość fali 370 nm.

Fig. 4 Chromatograms (DAD, $\lambda = 370$ nm) obtained for the standard solution of myricetin in acetonitrile ($C = 2$ mg/ml ACN). Sample injection volume: 20 μ l. Column: LiChrospher RP18e, 250 x 4 mm, 5 μ m. Eluent: acetonitrile:water (3:7 v/v) with addition of: a) CH_3COOH , b) TFA, c) HCl, d) H_3PO_4 , e) H_2SO_4 ; pH = 3; flow rate: 1 ml/min.

Na podstawie uzyskanych w trakcie badań chromatogramów dla kwercetyny i mirycetyny wyliczone zostały parametry chromatograficzne właściwe dla poszczególnych składników mieszaniny wzorców [23]. Wyznaczenie m.in. współczynnika retencji (k), czy liczby pólek teoretycznych (N) dla różnych eluentów, przy zastosowaniu tej samej kolumny stanowi „materiał odniesienia” i pozwala na określenie najlepszych z pośród przeanalizowanych warunków rozdzielania. Liczbę pólek teoretycznych wyznaczono na podstawie szerokości połówkowej pików (4), ze względu na bardziej dokładne wyznaczanie jej wartości.

$$N = 5,545 \frac{t_r^2}{w_{0,5}}, \quad (4)$$

gdzie:

t_r – czas retencji (czas mierzony od momentu zadozowania próbki do maksimum pików na chromatogramie), [min]

$w_{0,5}$ – szerokość połówkowa pików, [min].

Jest to konsekwencją asymetryczności otrzymanych doświadczalnie pików – pik symetryczny, charakteryzuje się współczynnikiem symetryczności wynoszącym 0,95 – 1. Liczba pólek teoretycznych wyznaczana przy pomocy szerokości pików u jego podstawy daje najbardziej dokładne wartości, w przypadku pików o kształcie gaussowskim. Jako czas retencji substancji niezatrzymywanej (tzw. czas martwy kolumny), do obliczeń przyjęto wartość wyznaczoną doświadczalnie (na podstawie chromatogramu wykonanego z użyciem traseru – azotanu sodu), równą: $t_0 = 1,98$ min. Wartość ta dla każdego z dodatków eluentu jest taka sama. Wynika to z mechanizmów sorpcji w układzie faz odwróconych – substancje nie wykazujące oddziaływań z fazą stacjonarną, tj. sole nieorganiczne nie są zatrzymywane, ze względu na brak jakichkolwiek oddziaływań z fazą stacjonarną (jedynie wnikają we wszystkie pory wypełnienia kolumny). W tabeli 4 i 5 zestawiono otrzymane wyniki.

Tabela 4. Zestawienie wyznaczonych parametrów chromatograficznych, uzyskanych w wyniku analizy chromatograficznej (RP HPLC) próbki kwercetyny, z zastosowaniem różnych kwasów, jako dodatków do eluentu.

Table 4. Summary of the derived chromatographic parameters, obtained by the analysis of samples of quercetin, using different acids as additives to the eluent.

Lp.	Rodzaj kwasu (Type of acid)	Liczba pólek teoretycznych, N [-] (Number of theoretical plates, N [-])	Współczynnik asymetrii, $As_{0,5}$ [-] (Asymmetry factor, $As_{0,5}$ [-])	Współczynnik asymetrii, $As_{0,1}$ [-] (Asymmetry factor, $As_{0,1}$ [-])	Czas retencji, t_r [min] (Retention time, t_r [min])	Współczynnik retencji, k [-]*
1	H ₃ PO ₄	13223	1,00	2,00	9,09	3,59
		10975	1,00	1,57	8,98	
2	HCl	6212	1,20	1,86	9,31	3,70
		6113	0,80	1,86	9,26	
3	H ₂ SO ₄	13495	1,00	1,60	9,15	3,62
		13296	1,00	1,43	9,15	
4	CH ₃ COOH	7158	1,50	2,00	10,30	4,20
		7180	1,50	1,75	10,29	
5	TFA	5025	1,50	2,20	9,18	3,64
		5191	1,50	1,86	9,23	

* wartość czasu retencji substancji niezatrzymywanej: $t_0 = 1,98$ min

Tabela 5. Zestawienie wyznaczonych parametrów chromatograficznych, uzyskanych w wyniku analizy chromatograficznej (RP HPLC) próbki kwercetyny, z zastosowaniem różnych kwasów, jako dodatków do eluentu

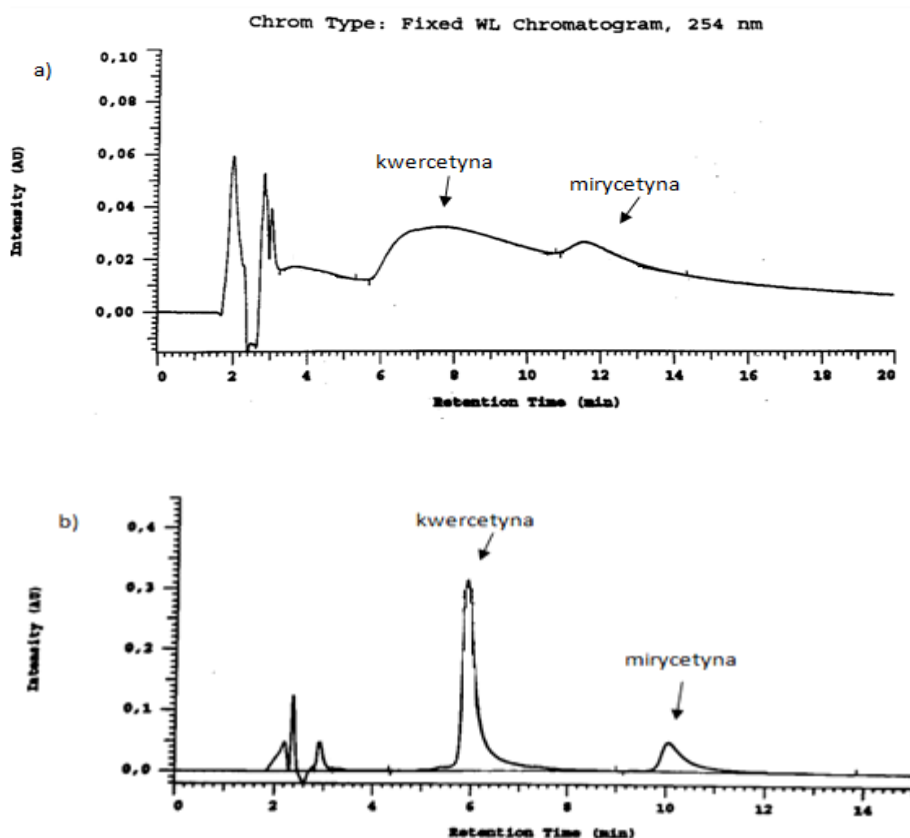
Table 5. Summary of the derived chromatographic parameters, obtained by the analysis of samples of myricetin, using different acids as additives to the eluent.

Lp.	Rodzaj kwasu <i>(Type of acid)</i>	Liczba pólek teoretycznych, N [-] <i>(Number of theoretical plates, N [-])</i>	Współczynnik asymetrii $As_{0,5}$ [-] <i>(Asymmetry factor, $As_{0,5}$ [-])</i>	Współczynnik asymetrii, $As_{0,1}$ [-] <i>(Asymmetry factor, $As_{0,1}$ [-])</i>	Czas retencji, t_r [min] <i>(Retention time, t_r [min])</i>		Współczynnik retencji, k [-]* <i>(Retention factor, k [-])</i>	
1	H ₃ PO ₄	6872	1,50	2,00	5,04	5,03	1,55	1,54
		7740	1,50	2,16	5,02		1,53	
2	HCl	4198	1,33	2,20	5,25	5,21	1,65	1,63
		4143	0,90	1,66	5,16		1,60	
3	H ₂ SO ₄	11620	1,00	1,60	5,08	5,08	1,57	1,57
		10817	0,99	1,50	5,08		1,57	
4	CH ₃ COOH	6343	1,50	1,85	5,65	5,64	1,85	1,85
		5944	1,50	2,00	5,63		1,84	
5	TFA	4193	1,00	2,50	5,18	5,20	1,61	1,62
		4535	2,00	2,20	5,21		1,63	

* wartość czasu retencji substancji niezatrzymywanej: $t_0 = 1,98$ min

Z otrzymanych wyników badań dotyczących określenia wpływu zastosowania różnych rodzajów kwaśnego modyfikatora na parametry chromatograficzne (tabele 4 i 5) można zauważyć, że najkorzystniejszy wpływ na sprawność rozdzielania ma obecność tlenowych kwasów nieorganicznych w fazie ruchomej. Dla kwasu siarkowego oraz ortofosforowego otrzymano następujące wartości: (kwercetyna: $N_{H_2SO_4} = 13495$; $N_{H_3PO_4} = 13223$ oraz mirycetyna: $N_{H_2SO_4} = 11620$; $N_{H_3PO_4} = 7740$). W przypadku pozostałych kwasów, na chromatogramach widoczne jest niewielkie przesunięcie w wartościach czasów retencji analitów oraz różnice w szerokościach połówek, co wpływa na rozbieżności wyznaczonych liczb pólek teoretycznych (rys. 3 i 4). Identyczna zależność obserwowana jest także ze względu na wartość współczynnika asymetrii pików. Najlepszą symetrię pików pochodzących od analizowanych związków uzyskano dla kwasów nieorganicznych zwłaszcza dla kwasu siarkowego i solnego, np. dla kwasu siarkowego, współczynnik $As_{0,5}$ pików właściwych dla kwercetyny oraz mirycetyny wynosi 1. Obecność w eluencie kwasów organicznych skutkuje wzrostem czasu retencji w porównaniu do kwasów nieorganicznych. Te rezultaty są efektem zastosowania powszechnie używanego, zwłaszcza w chromatografii białek i peptydów, kwasu trifluorooctowego [24]. Wynika to z tworzenia, tzw. par jonowych dzięki dodatkowi TFA, a w konsekwencji minimalizowania ładunku zdysocjowanych grup funkcyjnych peptydu i zwiększenia jego hydrofobowości [24-26]. W przypadku rozdzielania i analizy polifenoli charakteryzuje się jednak znacznie mniejszą sprawnością i gorszą symetrią pików zwłaszcza w porównaniu do kwasu siarkowego i ortofosforowego (tabele 4 i 5). Jedynie zastosowanie kwasu solnego daje podobny efekt jak dla TFA w postaci liczby pólek teoretycznych, jednakże w przypadku HCl uzyskiwane są piki o większej symetrii.

W celu sprawdzenia zasadności użycia kwasu jako dodatku do eluentu przy rozdzielaniu związków będących słabymi kwasami wykonano analizę chromatograficzną mieszanin dwóch polifenoli w identycznych warunkach, z tą tylko różnicą, że dla pierwszego przypadku eluent nie zawierał dodatku, a drugim obecny był kwas siarkowy (jako dodatek z użyciem którego uzyskano najlepsze wartości parametrów chromatograficznych). Dodatkowo, zastosowano inny rodzaj kolumny chromatograficznej, mianowicie kolumnę C-18 zamiast C-18e, wykorzystywanej we wcześniejszym etapie badań. Zabieg ten miał na celu porównanie wartości współczynników retencji oraz asymetrii pików, w zależności od zastosowanej kolumny chromatograficznej (tabele 4-6). Rezultaty w postaci chromatogramów przedstawiono na rys. 5.



Rys. 5. Chromatogramy, otrzymane z zastosowaniem detektora UV, roztworu wzorca mirycetyny oraz kwercetyny w acetonitrilu. Dozowano 20 μl kwercetyny oraz 10 μl mirycetyny. Kolumna: LiChrospher RP18, 250 x 4 mm, 5 μm ; Eluent: acetonitril : woda (3:7 v/v); Chromatogram: a) bez dodatku kwasu do eluentu; b) z dodatkiem kwasu H_2SO_4 (pH w roztworze wodnym = 3), przepływ 1 ml/min, długość fali 254 nm.

Fig. 5 Chromatogram (DAD, $\lambda = 254 \text{ nm}$) obtained for standards mixture of myricetin and quercetin in acetonitrile. Sample injection volume: 20 μl (quercetin) and 10 μl (myricetin). Column: LiChrospher RP18e, 250 x 4 mm, 5 μm . Eluent: acetonitrile:water (3:7 v/v) with addition of: a) without acid, b) with H_2SO_4 (0,05 %; pH = 3); flow rate: 1 ml/min.

Porównując chromatogramy przedstawione na rysunku nr 5 można zauważyć niewątpliwy wpływ obecności kwasu w fazie ruchomej (w tym przypadku, kwasu siarkowego) na kształt pików a w konsekwencji na jakość rozdzielania, w stosunku do warunków w których nie zastosowano żadnego modyfikatora eluentu. Obniżenie pH eluentu skutkuje bardzo wyraźną poprawą jakości rozdzielania polifenoli. Świadczą o tym również wartości podstawowych parametrów chromatograficznych przedstawione w tabeli 6.

Tabela 6. Zestawienie parametrów chromatograficznych, uzyskanych w wyniku rozdzielania chromatograficznego w warunkach RP HPLC próbki kwercetyny oraz mirycetyny, bez oraz z zastosowaniem kwasu siarkowego, jako dodatku do eluentu

Table 6. Summary of the derived chromatographic parameters, obtained by the analysis of mixture samples (myricetin and quercetin), with and without acid as additive to the eluent.

Dodatek kwasu (Acid additive)	Wzorzec (Standard)	Liczba pól teoretycznych, N [-] (Number of theoretical plates, N [-])	Współczynnik asymetrii $As_{0,1}$ [-] (Asymmetry factor, $As_{0,1}$ [-])	Współczynnik asymetrii $As_{0,5}$ [-] (Asymmetry factor, $As_{0,5}$ [-])	Czas retencji, t_r [min] (Retention time, t_r [min])	Współczynnik retencji, k [-] (Retention factor, k [-])
Brak (Without)	Kwercetyna (Quercetin)	23	-	-	7,70	2,09
	Mirycetyna (Myricetin)	688	-	-	11,63	3,67
Kwas siarkowy (Sulphuric acid)	Kwercetyna (Quercetin)	3410	2,61	1,01	5,91	1,37
	Mirycetyna (Myricetin)	2724	2,48	1,20	10,05	3,03

Ze względu na znaczne rozmycie pików na chromatogramie uzyskanym z rozdzielania bez dodatku modyfikatora do eluentu, nie było możliwe precyzyjne obliczenie parametrów chromatograficznych (rys.5). Obecność kwasu siarkowego ma wpływ na poprawę symetrii pików i istotny wzrost liczby pól teoretycznych. Skrócenie czasu retencji w obecności kwasu w eluencie jest trudne do wyjaśnienia.

Wyznaczone współczynniki asymetrii ($As_{0,1}$) dla składników mieszaniny zawierającej kwercetynę oraz mirycetynę (tabela 6) różnią się od wartości uzyskanych dla pojedynczych składników (tabela 4 i 5). Wynika to z zastosowania innego rodzaju kolumny, mianowicie kolumny typu RP18 bez „endcappingu” i konsekwencji możliwości występowania oddziaływań grup polarnych analiów z powierzchnią wypełnienia. Efektem jest „ogonowanie” pików i zwiększenie ich asymetryczności [27]. Dodatkowo, wpływ ma również większa objętość próbki wprowadzanej do zaworu dozującego (30 μ l). Podobne różnice można także zauważyć w przypadku wartości czasu retencji badanych polifenoli, jednak porównując wartości współczynników retencji nie widać znaczących zmian. Uzyskane wartości współczynników retencji przy zastosowaniu różnych kwasów, jako modyfikatorów, pozwoliły również w sposób pośredni (na podstawie zestawienia par odpowiednich chromatogramów pojedynczych wzorców, rys. 3 i 4) wyznaczyć wartości współczynników selektywności oraz rozdzielczości dla użytych w badaniach polifenoli. Rodzaj zastosowanego kwasu nie ma znaczącego wpływu na wartość tego parametru (tabela nr 7).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1}, \quad (5)$$

gdzie:

k_1 – współczynnik retencji substancji eluującej wcześniej, [-]

k_2 – współczynnik retencji substancji eluującej później, [-]

$$R = 2 \frac{t_{r2} - t_{r1}}{w_{b1} + w_{b2}}, \quad (6)$$

gdzie:

t_{r1} – czas retencji substancji eluującej wcześniej, [min]

t_{r2} – czas retencji substancji eluującej później, [min]

w_{b1} – szerokość pików nr 1, mierzona u jego podstawy, [min]

w_{b2} – szerokość pików nr 2, mierzona u jego podstawy, [min]

Tabela 7. Zestawienie wyznaczonych wartości współczynników selektywności rozdzielania chromatograficznego kwercetyny oraz mirycetyny, w zależności od zastosowanego modyfikatora eluentu.

Table 7. Values of selectivity coefficients, obtained by the analysis of myricetin and quercetin mixture, with and without acid as additive to the eluent.

Lp.	Rodzaj kwasu (Type of acid)	Współczynnik selektywności, α [-] (Selectivity coefficient, α [-])	Rozdzielczość pików, R [-] (Resolution of peaks, R [-])
1	H ₃ PO ₄	2,31	2,02
2	HCl	2,26	3,58
3	H ₂ SO ₄	2,31	3,67
4	CH ₃ COOH	2,27	3,35
5	TFA	2,25	3,08

W tabeli 7 zestawiono także wyliczone parametry rozdzielczości pików, w zależności od rodzaju dodatku do eluentów. W każdym z przypadków osiągnięto wymagany stopień rozdzielania pików: $R > 1$ [23]. Najniższą wartość parametru określającego rozdzielczość pików uzyskano w przypadku zastosowania kwasu fosforowego ($R = 2,02$) jako modyfikatora fazy ruchomej, natomiast najlepszy w przypadku kwasu siarkowego ($R = 3,67$). Dodatek w postaci kwasu solnego gwarantuje zbliżoną wartość parametru rozdzielczości do kwasu siarkowego. Jednak, należy ponadto zauważyć, że użycie HCl powoduje zmniejszenie liczby pól teoretycznych, N, (tabela 4 i 5).

4. Podsumowanie (Summary)

Wyniki przeprowadzonych badań, wskazują, że zastosowanie modyfikatorów fazy ruchomej w postaci kwasów przy rozdzielaniu polifenoli z grupy flawonoidów, a także wielu innych organicznych związków chemicznych zdolnych do odszczepiania protonów w wodzie, jest konieczne w warunkach faz odwróconych (RP).

Najlepsze wartości parametrów chromatograficznych, które mają wpływ na jakość rozdzielania substancji, uzyskano - w przypadku kwasów nieorganicznych - dla kwasu siarkowego (VI).

Pośród kwasów organicznych kwas octowy (AcOH) okazał się bardziej korzystny od trifluorooctowego (TFA). Kwas octowy jest tylko nieco mniej korzystny pod względem wpływu na sprawność rozdzielania od kwasu siarkowego, natomiast, jego zaletą jest lotność oraz to, że nie jest to kwas mocny.

Pomimo najbardziej korzystnych wyników otrzymanych przy zastosowaniu kwasu siarkowego (tj. pod względem symetrii pików oraz liczby pól teoretycznych), do wydzielenia rozdzielanych polifenoli w skali preparatywnej, bardziej praktyczne może być użycie kwasu octowego. Jest on bardziej lotny, co umożliwia łatwiejsze usunięcie go z otrzymanych frakcji i jest nie jest mocnym kwasem, co zapewnia brak "destrukcyjnego" działania w warunkach podwyższonej zawartości w okresie wzbogacania frakcji eluatu.

Results of this study indicate that the use of mobile phase modifiers, in the form of acids is necessary, when polyphenols (from the group of flavanoids) and many organic compounds capable to cleavage of protons in water under reversed phase (RP) conditions are separated.

In the case of inorganic acids, the best values of chromatographic parameters (affecting the quality of the separation) were obtained with sulfuric acid (VI).

Among the organic acids, the addition of acetic acid (AcOH) proved to be more advantageous than trifluoroacetic (TFA). Acetic acid, in comparison to the sulfuric acid, is less preferred in terms of its impact on the efficiency of separation. However, its advantage is volatility and the fact, that AcA is not a strong acid.

Although the most favorable results obtained using sulfuric acid (i.e. symmetry of peaks, number of theoretical plates), separation and isolation in preparative scale of polyphenols, may be more practical with AcA. As mentioned above, acetic acid is more volatile, which makes it easier to remove from obtained fractions. Additionally, acetic acid is not a strong acid, which provides no "destructive" influence under its elevated content during enrichment of eluate fractions.

Literatura (References)

- [1] B.A. Graf, P.E. Milbury, J.B. Blumberg, *Flavonols, flavones, flavanones, and human health: Epidemiological evidence*, Journal of Medicinal Food 8 (2005) 281
- [2] D. Chen, S.B. Wan, H. Yang, J. Yuan, T.H. Chan, Q.P. Dou, *Chapter 7 – EGCG, green tea polyphenols and their synthetic analogs and prodrugs for human cancer prevention and treatment*, Advances in Clinical Chemistry 53 (2011) 155
- [3] I. Erlud, *Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology*, Nutrition Research 24 (2004) 851
- [4] Y. Liu, P. Wang, F. Chen, Y. Yuan, Y. Zhu, H. Xan, X. Hu, *Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination*, Food Chemistry 186 (2015) 46
- [5] S. Gouveia, P.C. Castilho, *Characterisation of phenolic acid derivatives and flavonoids from different morphological parts of Helichrysum obconicum by a RP-HPLC-DAD-(-)-ESI-MSⁿ method*, Food Chemistry 129 (2011) 333
- [6] D. Romanova, D. Grancai, B. Jozova, P. Bozek, A. Vachalkova, *Determination of apigenin in rat plasma by high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 870 (2000) 463
- [7] F.L. Vigni, C. Baschieri, A. Marchetti, M. Cocchi, *RP-HPLC and chemometrics for wheat flour protein characterization in an industrial bread-making process monitoring context*, Food Chemistry 139 (2013) 553
- [8] F. Khuda, Z. Iqbal, Y. Shah, L. Ahmmad, F. Nasir, A.Z. Khan, Amanullah, N. Shahbaz, *Method development and validation for simultaneous determination of lumefantrine and its major metabolite, desbutyl lumefantrine in human plasma using RP-HPLC/UV detection*, Journal of Chromatography B 944 (2014) 114
- [9] K.R. Naidu, U.N. Kale, M.S. Shingare, *Stability indicating RP-HPLC method for simultaneous determination of amlodipine and benazepril hydrochloride from their combination drug product*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 39 (2005) 147

- [10] R.I. El-Bagary, M.A. Fouad, M.A. El-Shal, E.H. Tolba, *Forced degradation of mometasone furoate and development of two RP-HPLC methods for its determination with formoterol fumarate or salicylic acid*, Arabian Journal of Chemistry (2015) doi:10.1016/j.arabjc.2015.05.005
- [11] M. Gazdag, K. Mihalyfi, S. Gorog, *Ion-pair RP-HPLC separation of thymopoietin fragments and related peptides*, Analytica Chimica Acta 352 (1997) 231
- [12] P. Pinelli, F. Agostini, C. Comino, S. Lanteri, E. Portis, A. Romani, *Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves*, Food Chemistry 105 (2007) 1695
- [13] A. Bendini, M. Bonoli, L. Cerretani, B. Biguzzi, G. Lercker, T.G. Toschi, *Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods*, Journal of Chromatography A 985 (2003) 425
- [14] R. Filipa, P. Lopeza, G. Gibertib, J. Coussioa, G. Ferraroa, *Phenolic compounds in seven South American Ilex species*, Fitoterapia 72 (2001) 774
- [15] M. Ding, H. Yang, S. Xiao, *Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 849 (1999) 637
- [16] S. Magiera, *Opracowanie metod oznaczania mieszanin wybranych związków polifenolowych, wybranych leków oraz ich metabolitów i ich aplikacje*, rozprawa doktorska, Politechnika Rzeszowska, Gliwice 2012
- [17] S. Magiera, I. Baranowska, A. Lautenszleger, *UPLC-UV method for the determination of flavanoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities*, of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 102 (2015) 468
- [18] E. Cienfuegos-Jovellanos, M. del Mar Quinones, B. Muguera, L. Moulay, M. Miguel, A. Aleixandre, *Antihypertensive effect of a polyphenol-rich cocoa powder industrially processed to preserve the original flavonoids of the cocoa beans*, Journal of Agricultural Food Chemistry 57 (2009) 6156
- [19] S. Zheng, Z. Ma, H. Han, J. Ye, R. Wang, S. Cai, H. Zhou, L. Yu, S. Zeng, H. Jiang, *Post-column mobile phase adjustment: A strategy to eliminate the contradiction between liquid chromatography and mass spectrometry in the determination of flavonoids in rat plasma*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 95 (2014) 176
- [20] A. Skrzypczak, M. Jaszczółt, A. Królicka, M. Kamiński, *Techniki i metody chromatografii cieczowej w rozdzielaniu, oznaczaniu oraz izolowaniu nafto chinonów i flawonoidów z roślin*, Camera Separatoria 3 (2011) 253
- [21] M. Jaszczółt, G. Boczkaj, A. Lewandowski, A. Skrzypczak, A. Królicka, M. Kamiński, *Opracowanie optymalnych warunków rozdzielania i identyfikacji metabolitów roślin z rodzaju droseraceae, z zastosowaniem wysokosprawnej kolumnowej chromatografii cieczowej*, Camera Separatoria 3 (2011) 283
- [22] M. Jaszczółt, G. Boczkaj, A. Lewandowski, A. Skrzypczak, A. Królicka, M. Kamiński, *Badania nad doбором najkorzystniejszego składu eluentu do rozdzielania metabolitów wtórnych z grupy naftochinonów i flawonoidów z zastosowaniem chromatografii planarnej w normalnym i odwróconym układzie faz*, Camera Separatoria 3(2011) 14
- [23] M. Kamiński, *Chromatografia Cieczowa* (praca zbiorowa), Centrum Doskonałości Analityki i Monitoringu Środowiskowego, Gdańsk 2004
- [24] M. Shibue, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Effect of anionic ion-pairing reagent concentration (1-60 mM) on reversed-phase liquid chromatography elution behavior of peptides*, Journal of Chromatography A 1080 (2005) 58
- [25] Y. Chen, A.R. Mehok, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Optimum concentration of trifluoroacetic acid for reversed-phase liquid chromatography of peptides revisited*, Journal of Chromatography A, 1043 (2004) 9
- [26] D.C. Guo, C.T. Mant, R.S. Hodges, *Effects of ion-pairing reagents on the prediction of peptide retention in reversed-phase high-resolution liquid chromatography*, Journal of Chromatography A 386 (1987) 205
- [27] P. Novotna, V. Pacáková, Z. Bosáková, K. Štulík, *High-performance liquid chromatographic determination of some anthraquinone and naphthoquinone dyes occurring in historical textiles*, Journal of Chromatography A, 863 (1999) 235