

Способ идентификации полифенолов в растительных экстрактах при помощи ВЭЖХ. Определение состава изофлавонов сои.

И.В. Ходаков

Государственное учреждение "Институт стоматологии Национальной академии медицинских наук Украины", 11, ул. Ришельевская, Одесса, Украина, 65026, hodakovigor@gmail.com

Поступила: 10 июня 2013 г / Принята к публикации: 12 сентября 2013 г.

Предлагается способ идентификации полифенолов при анализе растительных экстрактов с применением ВЭЖХ на основе определения степени сходства идентификационных характеристик исследуемых веществ и стандартов полифенолов без оснащения хроматографов матричным фотодиодным детектором. Идентификационные характеристики включают в себя время удерживания и спектральные характеристики. В качестве спектральных характеристик вещества предлагается использовать высоты пика этого вещества на хроматограммах при 255, 286 и 350 нм, приведённых к высоте при 225 нм. Предлагаются формулы расчёта индексов сходства идентификационных характеристик и критерий сходства исследуемого вещества и стандарта. Предложенный набор идентификационных характеристик позволяет повысить точность идентификации полифенолов, в том числе и в случаях соответствия исследуемого вещества нескольким стандартам по времени удерживания. Способ позволяет выявлять различные формы одного и того же полифенола при условии сходства их спектральных характеристик. В качестве апробации способа представлено исследование состава изофлавонов в семенах сои сорта Фарватер (украинской селекции). В семенах сои были идентифицированы агликоны изофлавонов дайдзеин, глицитеин, генистеин и их производные формы – 7-О-β-глюкозиды и 6'-О-малонилглюкозиды.

I.V. KHODAKOV. - THE HPLC METHOD OF IDENTIFICATION OF POLYPHENOLS IN PLANT EXTRACTS BY EXAMPLE OF DETERMINATION OF ISOFLAVONE COMPOSITION IN SOY SEEDS. The method of identification of polyphenols in plant extracts for HPLC-analysis is proposed. The method is based on determining the degree of similarity of the identification characteristics of test substances and polyphenolic standards without the use the photodiode array detector. The identification characteristics include the retention time and the spectral characteristics. The heights of peaks of substance on the chromatograms at 255, 286 and 350 nm relatively the height at 225 nm are proposed to use as the spectral characteristics. The formulas for calculating the similarity indices of identification characteristics of the test substance and the standard and the criterion of their similarity are proposed. The proposed identification characteristic's set improves the accuracy of identification of polyphenols. The method allows identifying the substance in the case of its compliance with several standards by retention time. The method allows identifying the different derivative forms of the same polyphenol (aglycons, glycosides) under the condition of similarity of their spectral characteristics. The procedure of researching of isoflavone composition in soy seeds of cultivar Farvater (Ukrainian breeding) are presented as an approbation of the proposed method. Isoflavone aglycons daidzein, glycitein, genistein, and their derivatives 7-O-β-glucosides and 6'-O-malonylglucosides were identified in soy seeds.

Ключевые слова: ВЭЖХ, полифенолы, изофлавоны сои, способ идентификации, спектральные характеристики, индекс сходства, критерий сходства.

Key words: HPLC, polyphenols, soybean isoflavones, identification method, spectral characteristics, similarity index, similarity criterion

Экстракты растительных тканей представляют собой сложные смеси множества веществ, среди которых преобладают соединения полифенольной природы: фенольные кислоты и флавоноиды [1]. Полифенолам отводят важную роль в регуляции различных функций в тканях растений, в том числе в формировании устойчивости растений к факторам внешней среды [2–6] и регуляции симбиотических взаимоотношений с другими организмами [2, 7].

Большое внимание уделяется исследованию способности этих веществ влиять на физиологические процессы в организме животных и человека [8]. В связи с этим актуальным является разработка и совершенствование методов идентификации полифенолов в тканях растений.

Общепринятым методом ВЭЖХ является идентификация веществ по их абсорбционным пикам на хроматограммах путём сравнения

времени удерживания этих веществ в хроматографической колонке с аналогичным показателем для стандартов, время удерживания которых определено заранее [9, 10]. При совпадении или приемлемом отклонении времени удерживания исследуемого вещества от стандарта это вещество идентифицируют как аналогичное данному стандарту. Однако этот метод не позволяет однозначно определять вещества при анализе многокомпонентных смесей, так как высока вероятность наличия в них веществ, отличных по строению от стандарта, но имеющих сходное со стандартом время удерживания. При использовании для анализа большого количества стандартов возможна ситуация, когда некоторые стандарты будут характеризоваться сходным временем удерживания. Также есть вероятность, что время удерживания веществ в смесях сложного состава может смещаться из-за их взаимного влияния. Применение метода добавок стандартов в исследуемую смесь (метод применения внутренних стандартов) [9] позволяет уточнить время удерживания стандартов с учётом взаимного влияния веществ, но не гарантирует точность идентификации веществ, пики которых увеличиваются вследствие наложения на них пиков стандартов, так как возможно сходство их абсорбционных свойств со свойствами несоответствующих стандартов.

Для повышения точности идентификации дополнительно сравнивают спектральные характеристики исследуемых веществ и стандартов. Для этого проводят сканирование в широком диапазоне длин волн подвижной фазы (элюента) на выходе из колонки через определенные временные интервалы или в момент формирования максимума пиков для последующего сравнения спектра поглощения исследуемых веществ со спектром растворов стандартов, предварительно полученных с применением спектрофотометров или в ВЭЖХ [11–17]. Для этого хроматографы оснащаются модулями с фотодиодными матрицами, позволяющими снимать спектр поглощения элюента на выходе из колонки в любой момент анализа (стоимость такого модуля с собственным программным обеспечением может быть равна стоимости всего хроматографа со спектрофотометрическим детектором). На основе сходства максимумов и минимумов спектральных кривых или спектров в целом делают вывод о соответствии исследуемого вещества стандарту. Таким образом, для повышения информативности на основе спектральных характеристик при анализе веществ в ВЭЖХ требуется:

– дополнительное оснащение жидкостных хроматографов модулями с фотодиодным матричным детектором, способным сканировать поглощение светового излучения в широком

диапазоне длин волн через минимальные временные промежутки;

– специальное программное обеспечение для сравнения спектрограмм исследуемых веществ и стандартов на основе математических критериев сходства.

В связи с изложенным, цель данной работы: разработать способ идентификации веществ с применением ВЭЖХ на основе их идентификационных характеристик, для получения которых не требуется специальное оснащение хроматографа.

В основе разработки способа заложены следующие задачи:

– разработать способ получения спектральных характеристик веществ растительных экстрактов после их разделения на хроматографической колонке;

– предложить математический критерий сходства спектральных характеристик исследуемых веществ и стандартов, позволяющий идентифицировать эти вещества и определять точность их идентификации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Обоснование способа

Принимают, что каждый пик на хроматограммах, полученных в ВЭЖХ при анализе пробы, соответствует отдельному веществу. Идентификацию веществ проводят путём сравнения их идентификационных характеристик с аналогичными характеристиками стандартов. Идентификационные характеристики включают в себя время удерживания и спектральные характеристики. В качестве спектральных характеристик вещества предлагается использовать высоты пика этого вещества при выбранных в качестве стандартных длинах волн 255, 286 и 350 нм, приведённые к высоте пика при длине волны 225 нм, которые рассчитывают по формулам:

$$h_{255} = \frac{H_{255}}{H_{225}}, \quad h_{286} = \frac{H_{286}}{H_{225}}, \quad h_{350} = \frac{H_{350}}{H_{225}}$$

где H_{225} , H_{255} , H_{286} и H_{350} – высоты пика при 225, 255, 286 и 350 нм; h_{255} , h_{286} и h_{350} – относительные высоты пика при 255, 286 и 350 нм. Относительная высота пика при 225 нм для всех веществ всегда равна 1, поэтому для идентификации не используется. По сути, предложенные характеристики являются отдельными стандартизированными точками кривой спектра поглощения, по которым и проводят сравнение спектров исследуемых веществ и стандартов.

Время удерживания T и высоту пиков $H_{225-350}$ определяют при помощи программного обеспечения хроматографа. Относительный

характер спектральных характеристик позволяет сравнивать идентификационные характеристики веществ и стандартов при любом количественном содержании этих соединений.

Выбор перечисленных длин волн в качестве стандартных связан со спектральными свойствами исследуемых веществ. Многие полифенолы имеют максимумы поглощения в ультрафиолетовой области светового излучения. В предлагаемом способе выбранные длины волн для получения хроматограмм являются средними величинами для главных максимумов спектров поглощения следующих полифенолов, образцы которых были в нашем распоряжении: хлорогеновая и кофейная кислоты, катехин, изофлавоны дайдзеин, генистеин, генистин, дайдзин, софорикозид, флавонолы кверцетин, рутин, флавоны апигенин, лютеолин, байкалин, флавонолы нарингенин, нарингин, гесперетин, гесперидин, флавонолы лютеолин и апигенин. Данные о максимумах поглощения взяты из источников [16–18].

Для идентификации какого-либо вещества сравнивают его время удерживания T и спектральные характеристики h_{255} , h_{286} и h_{350} с аналогичными характеристиками стандартов, имеющих сходное с веществом время удерживания. Для этого рассчитывают следующие индексы сходства между веществом и стандартом по формулам:

$$I_T = 1 - |T_{st} - T_u|$$

$$I_{255} = 1 - |h_{255_{st}} - h_{255_u}|$$

$$I_{286} = 1 - |h_{286_{st}} - h_{286_u}|$$

$$I_{350} = 1 - |h_{350_{st}} - h_{350_u}|$$

где I_T – индекс сходства времени удерживания, T_{st} – время удерживания стандарта (мин.), T_u – время удерживания исследуемого вещества (мин.), I_{255} , I_{286} и I_{350} – индексы сходства спектральных характеристик, $h_{255_{st}}$, $h_{286_{st}}$ и $h_{350_{st}}$ – спектральные характеристики стандарта, h_{255_u} , h_{286_u} и h_{350_u} – спектральные характеристики исследуемого вещества. Индексы сходства принимают значения от $-\infty$ до 1. Наименьший из трёх по значению индекс сходства спектральных характеристик определяет степень сходства I_L вещества и стандарта по этим характеристикам. Чем выше I_L , тем больше вероятность точной идентификации вещества.

Очевидно, что в качестве критерия соответствия исследуемого вещества какому-либо стандарту следует принять некие предельные значения I_L и I_T , ниже которых точность идентификации вещества ставится под сомнение. Учитывая тот факт, что такие многокомпонентные смеси, как экстракты

растений, могут содержать сотни различных полифенолов, даже хорошо обособленный пик можно считать соответствующим одному веществу лишь в определённой степени, зависящей от доли содержания этого вещества в общей смеси веществ, которые формируют данный пик. Чем выше содержание интересующего нас вещества, тем больше его спектральные характеристики будут соответствовать аналогичным характеристикам его стандарта. Следовательно, абсолютное сходство спектральных характеристик веществ и стандартов возможно только в редких случаях полного разделения всех идентифицируемых веществ исследуемой смеси на колонке.

В ходе отработки предлагаемого способа выявили, что идентифицированные полифенолы, представленные на хроматограммах растительных экстрактов хорошо обособленными пиками, имели индексы сходства с соответствующими стандартами от 0.7 до близких к 1 (т.е. сходство характеристик было не менее 70 %). На значение индексов сходства влияет высота пика, если она определена содержанием вещества в пробе, а не разбавлением пробы растворителем – чем пики исследуемого веществ ниже, тем большее влияние на его спектральные характеристики оказывают сопутствующие вещества. Отсюда, идентичными своим стандартам предлагаем считать вещества, имеющие величину степени сходства I_L по спектральным характеристикам не менее предельной величины I_{Llim} , равной 0.7. В случае выявления сходства с несколькими стандартами при близких значениях времени удерживания, следует отдать предпочтение стандарту, сходство с которым было наибольшим.

Предельная величина I_{Tlim} для индекса I_T определяется допустимым отклонением времени удерживания вещества от стандартного. Отклонение может быть связано со взаимодействием веществ в многокомпонентных пробах, а также с тем, что состав элюента в момент выхода исследуемого вещества из колонки может отличаться от состава пробы со стандартом, например, по концентрации растворителя. При выборе величины допустимого отклонения необходимо учитывать также скорость движения элюента и длину колонки, влияющих на ширину основания пиков. Очень часто ширина пиков делится линией высоты на неравные части из-за определённой асимметричности пиков, вызванные удлинением правого крыла основания. Предлагаем при расчёте предельной величины I_{Tlim} использовать следующий простой алгоритм – допустимое отклонение времени удерживания вещества от стандартного должно быть не больше ширины левого крыла основания пика стандарта. Отсюда формула расчёта предельной величины I_{Tlim} для I_T следующая:

$$I_{\text{Тlim}} = 1 - t_p$$

где t_p – ширина от левого края основания пика стандарта до линии его высоты (времени удерживания), выраженная в минутах. Величину t_p определяют графически на хроматограммах стандартов так, как это представлено на рисунке 1, ориентируясь по отметкам указателей границ основания пика.

Условия хроматографирования при анализе проб и определении идентификационных характеристик и калибровке стандартов должны быть абсолютно одинаковы.

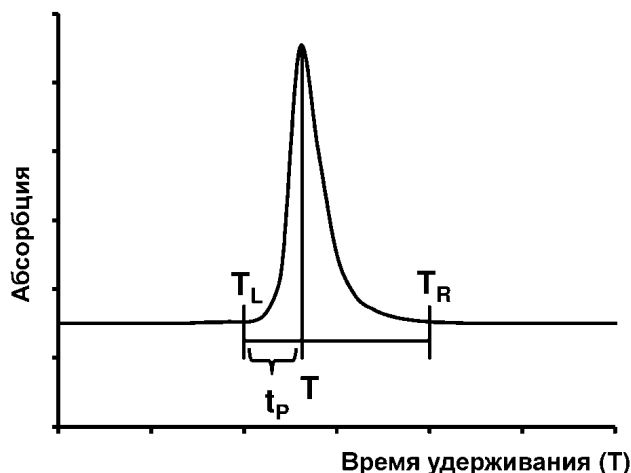


Рисунок 1. Определение ширины левого крыла основания пика.

T_L и T_R – левая и правая границы основания пика, отмеченные хроматографом;

T – линия высоты пика, время удерживания вещества;

t_p – ширина левого крыла основания пика ($t_p = T - T_L$).

2. Материал и условия хроматографирования для апробации способа.

В качестве апробации предложенного способа провели хроматографический анализ экстракта семян сои *Glycine max* (L.) Merr. (Leguminosae) с целью определить состав изофлавонов.

Изофлавоны являются флавоноидами с $C_6-C_3-C_6$ углеродным скелетом, гидроксильными соединениями дифенилпропанового ряда. Структурное отличие – наличие трёхуглеродного фрагмента у C_3 кольца А. Дополнительный гетероцикл замыкается через атомы кислорода, C_2 и C_3 . Эти соединения в значительных количествах присутствуют в семенах бобовых растений, определяют устойчивость этих растений к различным биологическим патогенам, проявляя противогрибковые, антибактериальные и инсектицидные свойства [19, 20]. Важнейшая роль изофлавонов в сое – регуляция взаимоотношений между растениями и азотфиксирующими бактериями родов *Rhizobium* и *Bradyrhizobium*: действуют как хемоаттрактанты

для симбиотических бактерий и как индукторы генов формирования корневых клубеньков [2, 7, 21, 22]. Изофлавоны вызывают повышенный интерес исследователей благодаря выраженной лечебно-профилактической эффективности при гормонозависимых патологиях у человека за счёт способности взаимодействовать с эстрогенными рецепторами ввиду сходства их молекулы с 17- β -эстрадиолом [23–26]. Количество изофлавонов в сое может достигать 72 % от общего содержания полифенолов [27] и зависит от факторов окружающей среды и сорта [28, 29].

В семенах сои различают 12 основных изофлавонов, относящихся к четырём группам: агликоны дайдзеин (7,4'-дигидроксиизофлавоны), генистеин (5,7,4'-тригидроксиизофлавоны), глицитеин (7,4'-дигидрокси-6-метоксиизофлавоны); 7-О- β -глюкозиды дайдзин, генистин, глицитин; 6'-О-малонилглюкозиды малонилдайдзин, малонилгенистин, малонилглицитин; 6'-О-ацетилглюкозиды ацетилдайдзин, ацетилгенистин, ацетилглицитин [30, 31].

Содержание изофлавонов определяли в семенах сои сорта Фарватер украинской селекции. Данный сорт является высокоурожайным, отличается засухоустойчивостью и приспособлен для выращивания в условиях юга Украины [32]. Выбор сорта для исследования – произвольный.

Перед экстракцией высушенные семена измельчали и обезжиривали гексаном из расчёта 10 мл гексана на 1 г сырья в течение 1 часа. Надосадочную жидкость сливали, осадок высушивали при 65 $^{\circ}$ C. Экстракт для анализа готовили путём настаивания сухого остатка в метаноле из расчёта 1 мл метанола на 200 мг остатка в течение 4 суток с последующей фильтрацией. Для приготовления экстракта выбрали наиболее простой способ извлечения полифенолов: спиртовая экстракция без выделения фракций отдельных групп полифенолов.

Анализ экстракта проводили с помощью хроматографической системы Shimadzu (Япония): дегазатор DGU-20A3, насосная система LC-20AD, автосэмплер SIL-20AC, детекторный блок SPD-20AV, колоночный термостат CTO-20A, колонка Microsorb-MV (обращённо-фазовая, тип C18, длина 150 мм, диаметр 4.6 мм, зерно сорбента 5 мкм). Анализ проводили при четырёх стандартных длинах волн – 225, 255, 286 и 350 нм. Описанная система позволяет получать хроматограммы одновременно при двух длинах волн, таким образом, для получения результатов при четырёх длинах волн анализ пробы проводили дважды.

Элюент: система метанол и 0.9 %-ый раствор фосфорной кислоты в деионизированной воде. Режим хроматографирования – градиентный.

Начальное соотношение компонентов элюента: 1 : 9. Содержание метанола в элюенте в ходе анализа изменялось по следующей схеме:

- первые 13 минут – повышение с 10 до 40 %;
- с 13-ой до 20-ой минуты – повышение от 40 до 53 %;
- с 20-ой до 26-ой минуты – повышение от 53 до 55 %;
- с 26-ой до 40-ой минуты – удерживание 55 %;
- с 40-ой до 41-ой минуты – снижение до 10 %;
- с 41-ой до 56-ой минуты – удерживание 10 %.

Скорость движения элюента – 0.5 мл/мин, температура колонки – 40⁰С, объем вводимой пробы – 5 мкл.

В качестве стандартов использовали этанольные растворы следующих веществ: хлорогеновая и кофейная кислоты, изофлавоны дайдзеин, дайдзин, генистеин, генистин, софорикозид, флавонолы кверцетин, рутин, флавоны апигенин, лютеолин, флаваноны нарингенин, нарингин, гесперетин, гесперидин (Sigma, США). Калибровку стандартов и определение их идентификационных характеристик проводили при описанных выше условиях хроматографирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице 1 приведены идентификационные характеристики некоторых стандартов. Калибровочные зависимости «площадь пика – концентрация» стандартов имели линейный вид с коэффициентом детерминации не менее 0.991. Видно, что гликозиды и агликоны одного и того же полифенола имеют очень близкие спектральные характеристики. Сходные спектральные параметры имеют и вещества, относящиеся к одной и той же структурной группе, при этом между группами наблюдается существенное отличие. Сходные спектральные характеристики имеют хлорогеновая (5-0-кофеилхинная) и кофейная (3,4-дигидроксикоричная) кислоты. Последняя, вместе с хинной кислотой, является структурным компонентом молекулы хлорогеновой кислоты [33]. Исходя из данных таблицы 1, кофейная кислота имеет наибольший вес в формировании спектральных характеристик хлорогеновой кислоты.

На рисунке 2 представлена хроматограмма хорошо разделённых стандартов, параметры T которых используются для расчёта T других стандартов. Со временем в ходе эксплуатации хроматографической колонки её сорбционные свойства постепенно меняются, в результате чего можно наблюдать смещение ранее установленных значений T , что приведёт к ошибкам в идентификации исследуемых веществ. Поэтому необходимо периодически проводить коррекцию параметра T для всех стандартов. Периодичность коррекции зависит от частоты и продолжительности анализов и устанавливается экспериментатором.

Таблица 1. Идентификационные характеристики стандартов полифенолов.

Стандарт	T, мин	Спектральные характеристики		
		h_{255}	h_{286}	h_{350}
хлорогеновая кислота	12.052	0.593	1.002	0.850
кофейная кислота ^A	12.602	0.573	1.075	0.668
дайдзин ^{B, I}	15.791	1.489	0.590	0.023
дайдзеин ^{H, I}	22.286	1.509	0.630	0.023
генистин ^{C, I}	17.903	2.341	0.744	0.173
софорикозид ^{C, I}	19.934	2.243	0.718	0.151
генистеин ^{H, I}	24.882	2.276	0.827	0.177
нарингин ^{D, K}	18.696	0.123	0.621	0.076
нарингенин ^{H, K}	23.300	0.103	0.672	0.075
гесперидин ^{E, K}	19.325	0.124	0.739	0.090
гесперетин ^{H, K}	24.497	0.101	0.791	0.080
рутин ^{F, L}	19.342	1.174	0.451	1.001
кверцетин ^{H, L}	23.550	1.211	0.400	0.902
лютеолин ^{H, M}	24.707	0.885	0.468	1.089
апигенин ^{H, M}	26.976	0.676	0.655	1.047

T – время удерживания; h_{255} , h_{286} , h_{350} – относительные высоты пика вещества при 255, 286 и 350 нм;

^A – структурный компонент молекулы хлорогеновой кислоты, ^B – гликозид дайдзина, ^C – гликозид генистина, ^D – гликозид нарингенина, ^E – гликозид гесперетина, ^F – гликозид кверцетина, ^H – агликон; группы веществ: ^I – изофлавоны, ^K – флаваноны, ^L – флавонолы, ^M – флавоны.

Для упрощения этой процедуры готовят смесь ограниченного количества наиболее доступных стандартов, время удерживания которых охватывает максимальный диапазон параметров T , пики которых хорошо разделены и расположены на хроматограмме по возможности равномерно. Такую смесь стандартов называют поправочной. T других стандартов привязывают к T стандартов поправочной смеси через коэффициенты привязки. В дальнейшем, когда возникнет необходимость коррекции параметра T для всех стандартов, проводят анализ поправочной смеси стандартов, определяют новое T для входящих в состав смеси стандартов, а для недостающих стандартов T

рассчитывают при помощи коэффициентов привязки.

По алгоритму, приведённому на рисунке 1, определили величину t_p для последующего расчёта предельной величины I_{Tim} . В данном исследовании t_p в среднем для стандартов была равна 0.25 мин. Отсюда предельная величина I_{Tim} равна 0.75.

На рисунке 3 представлена хроматограмма экстракта семян сои при 255 нм. Номерами обозначены наиболее значимые по высоте пики. В таблице 2 приведены идентификационные характеристики веществ, номера которых соответствуют номерам пиков на рисунке 3.

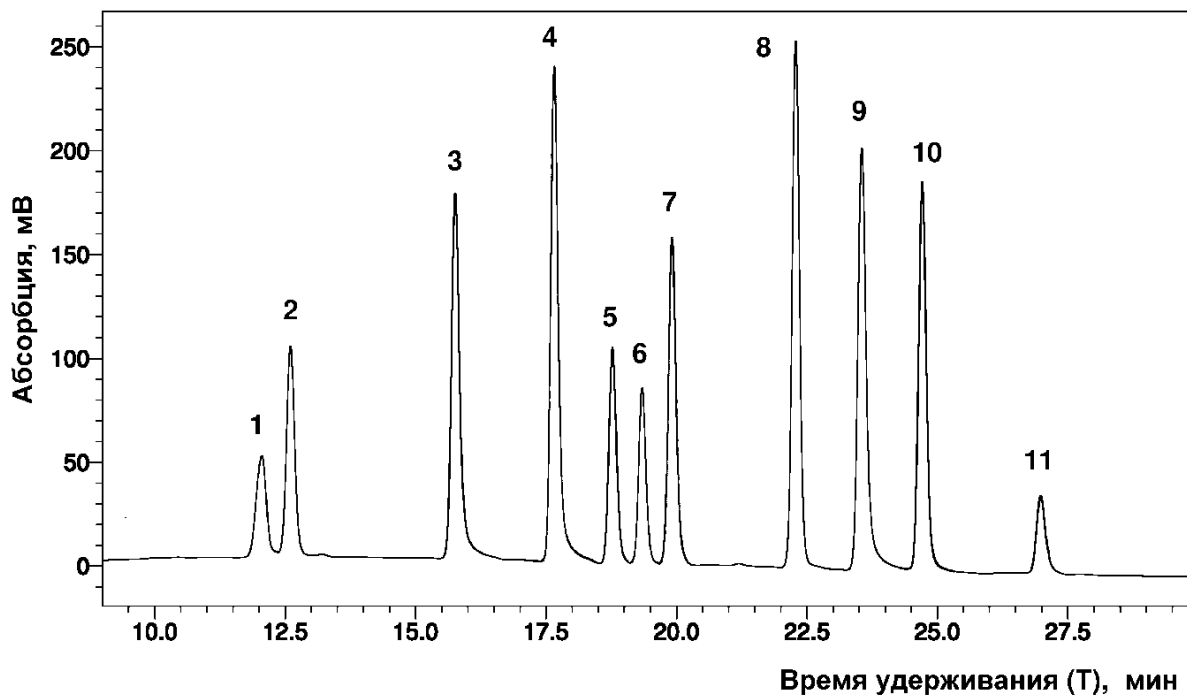


Рисунок 2. Хроматограмма смеси стандартов полифенолов при 255 нм. 1 – хлорогеновая кислота, 2 – кофейная кислота, 3 – дайдзин, 4 – генистин, 5 – нарингин, 6 – рутин, 7 – софорикозид, 8 – дайдзеин, 9 – кверцетин, 10 – генистеин, 11 – апигенин.

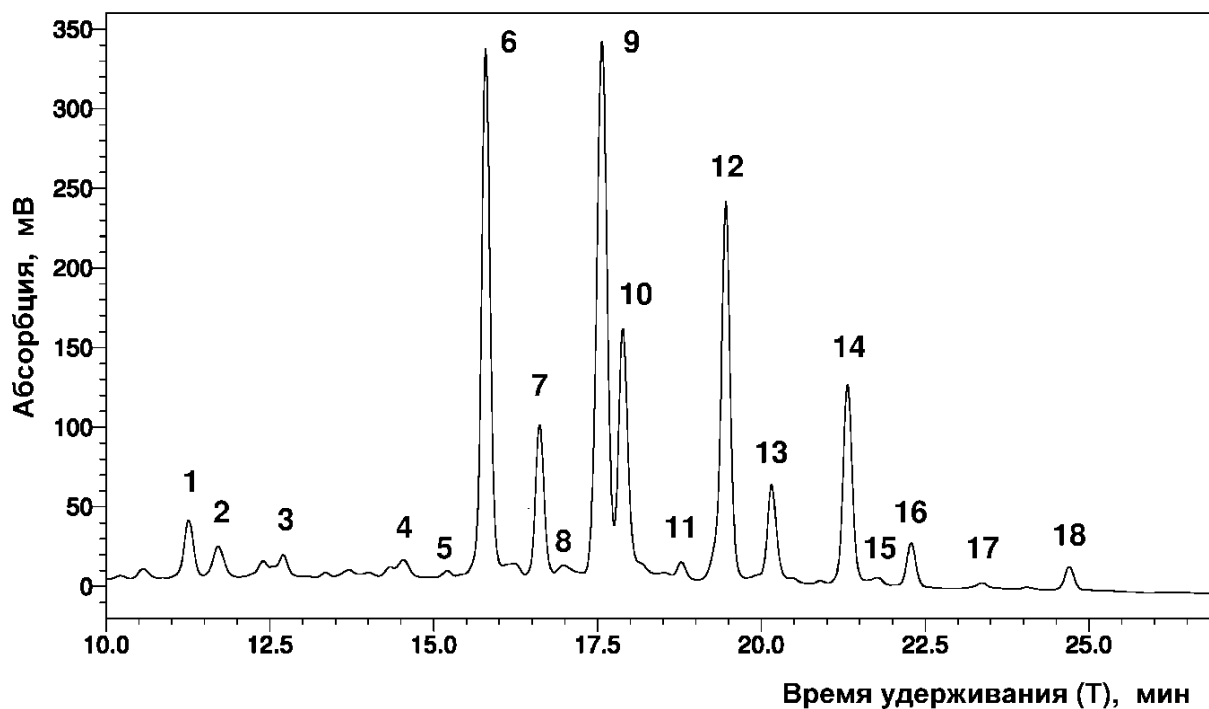


Рисунок 3. Хроматограмма экстракта семян сои (номера пиков соответствуют веществам в таблице 2). Идентифицированные вещества: 6 – дайдзин, 7 – глицитин, 10 – генистин, 12 – малонилдайдзин, 13 – малонилглицитин, 14 – малонилгенистин, 16 – дайдзеин, 17 – глицитеин, 18 – генистеин.

Таблица 2. Идентификационные характеристики полифенолов экстракта семян сои (номера веществ соответствуют пикам на рисунке 3).

Вещество, №	Т, мин	Спектральные характеристики		
		h ₂₅₅	h ₂₈₆	h ₃₅₀
1	11.225	4.167	2.943	0.185
2	11.715	0.139	0.230	0.006
3	12.381	0.587	0.468	0.00009
4	14.500	0.727	0.766	0.456
5	15.209	0.366	0.539	0.408
6	15.793	1.511	0.593	0.022
7	16.615	1.349	0.498	0.121
8	16.972	0.301	0.640	0.399
9	17.545	3.543	1.372	0.201
10	17.888	2.384	0.759	0.197
11	18.778	0.284	0.554	0.486
12	19.435	1.347	0.591	0.106
13	20.160	1.099	0.499	0.167
14	21.315	2.391	0.753	0.183
15	21.777	5.602	2.220	0.001
16	22.275	1.634	0.725	0.040
17	23.372	1.764	0.381	0.149
18	24.703	2.166	0.650	0.131

T – время удерживания; *h*₂₅₅, *h*₂₈₆, *h*₃₅₀ – относительные высоты пика вещества при 255, 286 и 350 нм

В таблице 3 в качестве примера показана идентификация вещества № 18 по индексам сходства *I*_T и *I*_L идентификационных характеристик этого вещества и перечисленных в таблице 1 стандартов. Видно, что по времени удерживания данное вещество соответствует сразу трём стандартам: гесперетину, лютеолину и генистеину – *I*_T составили от 0.794 до 0.996 (все значения *I*_T не ниже допустимого предельного значения *I*_{Tlim}). При отсутствии дополнительной информации было бы весьма затруднительно отдать приоритет сходства с исследуемым веществом одному из этих стандартов.

В нашем случае, привлечение спектральных характеристик позволило выявить наибольшее сходство вещества № 18 с генистеином.

Таблица 3. Оценка сходства идентификационных характеристик вещества № 18 (рис. 3) и стандартов.

Стандарты	Индексы сходства с веществом № 18				
	<i>I</i> _T	<i>I</i> ₂₅₅	<i>I</i> ₂₈₆	<i>I</i> ₃₅₀	<i>I</i> _L
Хлорогеновая кислота	-11.651	-0.573	0.648	0.281	-0.573
Кофейная кислота	-11.101	-0.593	0.575	0.463	-0.593
дайдзин	-7.912	0.323	0.940	0.892	0.323
генистин	-5.800	0.825	0.906	0.958	0.825
нарингин	-5.007	-1.043	0.971	0.945	-1.043
гесперидин	-4.378	-1.042	0.911	0.959	-1.042
рутин	-4.361	0.008	0.801	0.130	0.008
софорикозид	-3.769	0.923	0.932	0.980	0.923
дайдзеин	-1.417	0.343	0.980	0.892	0.343
нарингенин	-0.403	-1.063	0.978	0.944	-1.063
кверцетин	-0.153	0.045	0.750	0.229	0.045
гесперетин	0.794	-1.065	0.859	0.949	-1.065
лютеолин	0.996	-0.281	0.818	0.042	-0.281
генистеин	0.821	0.890	0.823	0.954	0.823
апигенин	-1.273	-0.490	0.995	0.084	-0.490

*I*_T – индекс сходства времени удерживания;
*I*₂₅₅, *I*₂₈₆ и *I*₃₅₀ – индексы сходства спектральных характеристик;

*I*_L – степень сходства спектральных характеристик (наименьший из индексов *I*₂₅₅, *I*₂₈₆ и *I*₃₅₀);

полужирным шрифтом выделены индексы *I*_T и *I*_L, значения которых не ниже предельных *I*_{Tlim} и *I*_{Llim}.

Степень сходства *I*_L = 0.823. Величина *I*_L не ниже предельного значения *I*_{Llim} = 0.7, что позволяет однозначно идентифицировать вещество № 18 как генистеин.

Значения *I*_L для геспереидина и лютеолина были отрицательные.

Аналогичным образом, по степени сходства идентификационных характеристик исследуемых веществ и соответствующих стандартов, вещества №№ 6, 10 и 16 (рис. 3, табл. 2) были идентифицированы с высокой точностью как дайдзин, генистин и дайдзеин (*I*_T от 0.985 до 0.998 и *I*_L от 0.875 до 0.978).

В таблице 4 представлен анализ сходства исследуемых веществ и четырёх стандартов изофлавонов. Обнаружено, что вещества №№ 7, 12, 13 и 17 по времени удерживания не соответствуют ни одному из стандартов изофлавонов, но проявили значимую степень сходства с дайдзином и дайдзеином по спектральным характеристикам – от 0.725 до 0.875 (вещество № 13 с меньшей степенью сходства – 0.590 и 0.610). Аналогичным образом, вещество № 14 (рис. 3, табл. 4) имело высокую степень сходства (0.950 и 0.885) с генистином и генистеином по спектральным характеристиками, но отличалось от них временем удерживания.

На основании этого был сделан вывод, что вещества №№ 7, 12, 13, 14 и 17 являются изофлавонами. Анализ данных литературы позволил точнее идентифицировать эти вещества. Известно, что УФ спектры поглощения глицитеина и его гликозидных форм имеют определённое сходство со спектром дайдзеина и его гликозидированных форм [34, 35]. Согласно данным литературы, на хроматограммах экстрактов семян сои или продукции на их основе, полученных с применением колонок типа C18, пик глицитеина всегда расположен между пиками дайдзеина и генистеина, при этом высота этого пика всегда наименьшая [35–40]. Точно также, пик его гликозида – глицитина также расположен между пиками гликозидов дайдзеина и генистеина и также характеризуется наименьшей высотой.

Соответственно, по расположению на хроматограмме и сходству со спектральными характеристиками дайдзеина и дайдзина, вещества №№ 7 и 17 (рис. 3 и табл. 4) были идентифицированы как глицитин и глицитеин. Очередность расположения пиков малонилгликозидов изофлавонов подчиняется такой же закономерности: пик малонилглицитина расположен между пиками малонилдайдзеина и малонилгенистеина и опять же отличается наименьшей высотой. Пики различных форм изофлавонов обычно хорошо разделяются, а расположение этих пиков при использовании хроматографических колонок типа C18 также имеет строгую закономерность: первыми на хроматограмме расположены пики гликозидов, затем малонилгликозидов, затем агликонов.

В нашем анализе, пики 12 и 14 соответствуют малонилдайдзину и малонилгенистину по расположению и по сходству спектральных характеристик с параметрами агликонов и гликозидов дайдзеина и генистеина, а пик 13 – малонилглицитину по расположению и сходству по спектральным характеристикам с дайдзеином и дайдзином. Следует отметить, что степень

сходства вещества № 13 с последними стандартами была меньше предельной величины, но являлась наибольшей и единственной положительной из представленных (табл. 4), что позволяет однозначно идентифицировать это вещество как одну из форм глицитеина, а именно малонилглицитин.

Невысокое значение I_L можно объяснить тем, что в формировании пика вещества № 13 участвуют несколько веществ, но доля малонилглицитина среди них наибольшая.

Ацетилгликозидные формы изофлавонов в данном анализе не выявлены из-за их крайне низкого содержания либо отсутствия в исследуемом материале.

Таким образом, в экстракте семян сои были идентифицированы с высокой точностью 4 изофлавона по имеющимся стандартам, а также 5 изофлавонов, стандарты которых отсутствовали, с привлечением данных литературы об очередности расположения пиков разных изофлавонов и предложенных нами спектральных характеристик (табл. 4).

Автор предполагает, что выбор указанных четырёх длин волн в качестве стандартных для получения спектральных характеристик исследуемых веществ и стандартов может быть неидеальным. Экспериментатор, руководствуясь изложенным принципом идентификации, может подобрать оптимальные длины волн для тех веществ, с которыми он работает, чтобы набор спектральных характеристик был как можно более индивидуальным для каждого вещества.

Кроме того современные хроматографы позволяют получать хроматограммы при большем количестве длин волн за один анализ, чем использованная в данной работе хроматографическая система. Это позволяет увеличить количество спектральных характеристик, а значит увеличить точность идентификации веществ.

Учитывая, что количество исследуемых веществ в экстрактах может достигать сотни, а стандартов – нескольких десятков, расчёты индексов сходства идентификационных характеристик веществ со стандартными можно автоматизировать при помощи известных компьютерных приложений, позволяющих работать с большими массивами данных, например, таких, как Microsoft Excel, Libre Office, Open Office. Для анализируемой пробы и каждого стандарта в этих программах выделяют отдельные листы. В листе для данных пробы заполняют таблицу значениями T и высот пиков при стандартных длинах волн для каждого вещества.

Таблица 4. Идентификация изофлавонов в экстракте семян сои по сходству идентификационных характеристик стандартов дайдзина, дайдзеина, генистина, генистеина и исследуемых веществ (номера веществ соответствуют пикам на рисунке 3).

Вещество, №	Сходство с дайдзином		Сходство с дайдзеином		Сходство с генистином		Сходство с генистеином		Идентификация
	I _T	I _L	I _T	I _L	I _T	I _L	I _T	I _L	
1	-3.566	-1.678	-10.061	-1.658	-5.678	-1.199	-12.657	-1.116	
2	-3.076	-0.350	-9.571	-0.370	-5.188	-1.202	-12.167	-1.137	
3	-2.410	-0.098	-8.905	0.078	-4.522	-0.754	-11.501	-0.689	
4	-0.291	0.238	-6.786	0.218	-2.403	-0.614	-9.382	-0.549	
5	0.418	-0.123	-6.077	-0.143	-1.694	-0.975	-8.673	-0.910	
6	0.998	0.978	-5.493	0.963	-1.110	0.170	-8.089	0.235	дайдзин
7	0.176	0.860	-4.671	0.840	-0.288	0.008	-7.267	0.073	глицитин ^A
8	-0.181	-0.188	-4.314	-0.208	0.069	-1.040	-6.910	-0.975	
9	-0.754	-1.054	-3.741	-1.034	0.642	-0.202	-6.337	-0.267	
10	-1.097	0.105	-3.398	0.125	0.985	0.957	-5.994	0.892	генистин
11	-1.987	-0.205	-2.508	-0.225	0.125	-1.057	-5.104	-0.992	
12	-2.644	0.858	-1.851	0.838	-0.532	0.006	-4.447	0.071	малонилдайдзин ^A
13	-3.369	0.610	-1.126	0.590	-1.257	-0.242	-3.722	-0.177	малонилглицитин ^A
14	-4.524	0.098	0.029	0.118	-2.412	0.950	-2.567	0.885	малонилгенистин ^B
15	-4.986	-3.113	0.491	-3.093	-2.874	-2.261	-2.105	-2.326	
16	-5.484	0.855	0.989	0.875	-3.372	0.293	-1.607	0.358	дайдзеин
17	-6.581	0.725	-0.086	0.745	-4.469	0.423	-0.510	0.488	глицитеин ^A
18	-7.912	0.323	-1.417	0.343	-5.800	0.825	0.821	0.823	генистеин

^A – идентифицировано по сходству со спектральными характеристиками дайдзина и дайдзеина.

^B – идентифицировано по сходству со спектральными характеристиками генистина и генистеина.

Таблица автоматически рассчитывает спектральные характеристики, а в листах со стандартами автоматически производится расчёт индексов сходства всех веществ пробы со стандартами. При правильной организации связей между таблицами анализ очередной пробы сводится к переносу первичных данных в листе для пробы.

гликозиды и агликаны флавоноидов), при условии сходства их спектральных характеристик;

- при апробации способа в семенах сои идентифицированы следующие изофлавоны: агликаны дайдзеин, глицитеин и генистеин и их производные формы – 7-О-гликозиды и 6'-О-малонилгликозиды.

ВЫВОДЫ

- разработанный способ идентификации полифенолов в экстрактах тканей растений позволяет повысить точность анализа на основе комплекса идентификационных характеристик, включающих время удерживания и спектральные характеристики;
- способ позволяет с высокой точностью идентифицировать вещества в случаях их соответствия по времени удерживания одновременно нескольким стандартам;
- способ позволяет выявлять различные формы одного и того же полифенола (например,

Благодарности

Автор благодарит д-ра биол. наук. зав. Лабораторией биохимии ГУ “Институт стоматологии НАМНУ” Макаренко О.А. за помощь при подготовке образцов для хроматографического анализа и ценные замечания при оформлении статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. D'Archivo M., Filesi C., Di Benedetto R., Gargiulo R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanità*. 2007, 43(4), 348–361.
2. Макаренко О.А., Левицкий А.П. Физиологические функции флавоноидов в растениях. *Физиол. и биохим. культ. раст.* 2013, 45(2), 100–110.
3. Chérif M., Arfaoui A., Rhaien A. Phenolic compounds and their role in bio-control and resistance of Chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunis. J. Plant Protect.* 2007, 2(1), 7–21.
4. Cushnie T.P.T., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2005, 26, 343–356.
5. Madhuri G., Reddy A.R. Plant biotechnology of flavanoids. *Plant Biotech.* 1999, 16(3), 179–199.
6. Marid M., Khan T.A., Mohammad F. Role of secondary metabolites on defense mechanisms of plants. *Biol. & Med.* 2011, 3(2), 232–249.
7. Макарова Л.Е. Физиологическое значение фенольных соединений при формировании бобово-ризобиального симбиоза на этапе преинфекции. *Вісн. Харківськ. Нац. Аграр. Ун-ту. Серія Біологія*. 2012, 2(26), 25–40.
8. Sandhar H.X., Kumar B., Prasher S., Tiwari P., Salhan M., Sharma P. A review of phytochemistry and pharmacology of flavonoids. *Int. Pharm. Sci.* 2011, 1(1), 25–41.
9. Сапрыгин Л.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Харьков: «Оригинал», 2007. С. 228.
10. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. *Рига: Зинатне*, 1988. С. 235.
11. Chen S.B., Yang S.L., Chen H.X., Chan A.S.C. Seasonal variations in the isoflavonoids of *Radix puerariae*. *Phytochem. Anal.* 2007, 18, 245–250.
12. Herzler M., Pragst F., Herre S., Rothe M. Selectivity of photodiode array UV spectra for substance identification in systematic toxicological analysis. *Probl. Forensic Sci.* 2000, XLII, 122 – 129.
13. Lambert W.E., Van Boexler J.F., De Leenheer A.P. Potential of high-performance liquid chromatography with photodiode array detection in forensic toxicology. *J. Chromatogr. B.* 1997, 689, 25–53.
14. Chen H.-J., Inbaraj B.S., Chen D.-H. Determination of phenolic acids and flavanoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid Chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivation technique. *Int. J. Mol. Sci.* 2012, 13, 260–285.
15. Tsimogiannis D., Stravkaki M., Oreopoulou V. Isolation and characterisation of antioxidant component from oregano (*Origanum heracleoticum*). *Int. J. Food Sci. Technol.* 2006, 41, 39–48.
16. Семенистая Е.Н., Ларионов О.Г. Изучение состава и антиоксидантной активности растительных экстрактов методом ВЭЖХ с УФ- и амперометрическим детектированием. *Хим.-фарм. журн.* 2008, 42(9), 43–48.
17. Wang L.-H., Li W.-H. General method for determining of flavonoids in medicinal plants and raw cosmetics using HPLC with a photodiode array detector. *Хим.-фарм. журн.* 2007, 41, № 4, 46–51.
18. Моисеев Д.В., Бузук Г.Н., Шелюто В.Л. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ. *Хим.-фарм. журн.* 2011, 45(1), 35–38.
19. Rivera-Vargas L.I., Shmittenner A.V., Graham T.L. Soybean flavonoids effects on metabolism of *Phytophthora sojae*. *Phytochem.* 1993, 32, 851–851.
20. Boland G.M., Donnelly M.X. Isoflavonoids and related compounds. *Natl. Prod. Rep.* 1998, 15, 241–260.
21. Ferguson J.A., Matheus U. Signaling interactions during nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 2003, 22, 47–72.
22. Phillip D.A. Flavonoids: plant signals to soil microbes. Recent advances in phytochemistry: phenolic. In: *Metabolism in plants*. Eds. Stafford H.A., Ibrahim R.K. NY: Plenum Press, 1992, 201–223.
23. Левицкий А.П., Макаренко О.А., Сукманский О.И. Фитоэстрогены (биохимия, фармакология, применение в медицине). Одесса: «Моряк», 2002. С. 96.
24. Rigazi S.R., Nezhad Y.E., Fathi H., Davoudi J. Chemical properties, health benefits and threats of soy isoflavones. *Ann. of Biol. Res.* 2011, 2(5), 338–350.
25. Albulescu M., Popovici M. Isoflavones – biochemistry, pharmacology and therapeutic use. *Revue Roum. Chim.* 2007, 52(6), 537–550.
26. Барабой В.А. Изофлавоны сои: биологическая активность и применение. *Біотехнологія*. 2009, 2(3), 44–54.
27. Seo A., Morr C.V. Improved high performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids. *J. Agr. Food Chem.* 1984, 32, 530–533.
28. Hoeck J.A., Fehr W.R., Murphy P.A., Welke G.A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Sci.* 2000, 40, 48–51.

29. Seguin P., Zheng W., Smith D.L., Deng W. Isoflavone content of soybean cultivars grown in eastern Canada. *J. Sci. Food Agr.* 2004, 84, 1327–1332.
30. Wang H.J., Murphy P.A. Isoflavone composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year and location. *J. Agric Food Chem.* 1994, 42, 1674–1677.
31. Wang H.I., Murphy P.A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *J. Agric. Food Chem.* 1994, 42, 1666–1673.
32. Січкач В.І., Шерстобітов В.В. Сучасна технологія вирощування та переробки сої. Методичні рекомендації. – Одеса: СГІ – НЦНС, 2012. С. 51.
33. Левицкий А.П., Вертикова Е.К., Селиванская И.А. Хлорогеновая кислота: биохимия и физиология. *Мікробіол. і біотехнол.* 2010, № 3, 6–20.
34. Ribani M., Ribani R.H., Valee T., Cuilherme M.A.W., Collins C.H., Bottou C.B.G. Determination of aglucone izoflavones in non-transgenic and transgenic soybeans (*Glycine max. L.*) by HPLC-DAD. *Brasil. J. Anal. Chem.* 2010, 1(2), 92–97.
35. Murphy P.A., Wang H.-J. Total genistein, daidzein and glycitein content of soyfoods. 18th National Nutrient Databank Conference, Baton Rouge. 1993, 11–19.
36. Carrara V.S., Amato .A.A., Neves F.A.R., Bazjtte R.B., Mandarino J.M.G., Nakamura C.V., Filho B.P.D., Cortez D.A.G. Effectes of a methanolic fraction of soybean seeds on the transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *Brasil. J. Med. Biol. Res.* 2009, 42, 545–550.
37. Griffith A.P., Collison M.W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reverse-phase high-performance liquid chromatography liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 2001, 913, 397–413.
38. Song T., Buseman G., Murphy P.A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998, 68, 1474S–1479S.
39. Luthria D.L., Biswas R., Natarajan S. Comparison of extraction solvents and techniques used for the assay of izoflavones from soybean. *Food Chem.* 2007, 105, 325–333.
40. Chuankhayan P., Rimlumduan T., Suasti J., Cairns J.R.K. Hydrolysis of soybean isoflavonoid glycosides by *Dalberia* β -glucosidases. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55(6), 2407–2412.