

УДК 543.544.5.068.7, 543.054

СЕЛЕКТИВНОЕ ИЗВЛЕЧЕНИЕ ФИТОЭКДИСТЕРОИДОВ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО ЭКСТРАКТА МОЛЕКУЛЯРНО- ИМПРИНТИРОВАННЫМ СОРБЕНТОМ НА ОСНОВЕ ДИОКСИДА ТИТАНА

© Д.А. Севко^{1*}, С.С. Абрамчук^{1,3}, А.А. Ихалайнен², А.М. Антохин², В.Ф. Таранченко², В.М. Гончаров²,
А.В. Аксенов², Д.А. Митрофанов², М.Ю. Сеницын², М.К. Беклемишев¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Ленинские горы, 1, стр. 3, 119991 ГСП, Москва (Россия),
e-mail: dasha.polyanina@gmail.com

²Федеральное государственное унитарное предприятие «Научный центр «Сигнал», ул. Большая Оленья, 8, Москва, 107014 (Россия)

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, ул. Вавилова, 28, Москва, 119991 (Россия)

Методом молекулярного импринтинга получен сорбент на основе диоксида титана для группового извлечения фитозэкдистероидов. Селективный импринтированный слой получали на поверхности наночастиц TiO₂ путем гидролиза *n*-бутоксиды титана. В качестве темплата при молекулярном импринтинге использовали экдистен, самый распространенный фитозэкдистероид, а также его комплекс с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК). Полученные сорбенты в форме патронов для твердофазной экстракции (ТФЭ) использовали для групповой сорбции шести фитозэкдистероидов из экстракта серпухи венценосной (*Serratula coronata*), при этом целевые соединения удалось отделить от основных матричных компонентов растительного экстракта. По сравнению с кремнеземом-С₁₈, извлечение фитозэкдистероидов предлагаемым сорбентом выше, а матричных компонентов – ниже. Фитостероиды десорбировали смесью ацетон – ацетонитрил – пропанол-2 – муравьиная кислота (10 : 45 : 45 : 1 об.) и определяли методом обращено-фазовой ВЭЖХ-МС/МС (колонка «Thermo» HypersilGold aQ, 150 × 2.1 мм, размер зерна 3 мкм). Наиболее эффективен сорбент, полученный импринтингом комплекса экдистена с АФБК. Степени извлечения фитостероидов импринтированными сорбентами в 2–3 раза выше, чем неимпринтированными. Полученные сорбенты сохраняют свои сорбционные свойства при хранении, что подтверждает стабильность полученных молекулярных отпечатков.

Ключевые слова: молекулярный импринтинг, импринтированные сорбенты, поверхностный золь-гель синтез, твердофазная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, фитозэкдистероиды, растительные экстракты.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №13-03-00441-а).

Введение

Растительные фитозэкдистероиды, к которым относится более 300 производных экдизона [1–3], обладают адаптогенным и антидепрессивным действием, а также противомикробной активностью. Выделение фитостероидов из растительных экстрактов довольно трудоемко и длительно [2, 4, 5]. Для определения фитозэкдистероидов чаще всего используют хроматографические методы. Применение газовой хроматографии ограничено сложностями дериватизации целевых соединений [6]. Один из самых чувствительных методов определения экдистероидов – радиоиммунный (предел обнаружения – 1 нг), он позволяет определить экдизон-подобную активность, но не индивидуальные соединения [7, 8].

Для определения фитозэкдистероидов наиболее широко используют методы высокоэффективной жидкостной (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ), при этом основной для аналитических целей является первая [3]. Описано определение

Севко Дарья Анатольевна – аспирант кафедры аналитической химии, e-mail: dasha.polyanina@gmail.com

* Автор, с которым следует вести переписку.

фитоэкдистероидов на уровне наногаммов при масс-спектрометрическом детектировании (ВЭЖХ-МС или МС/МС) [1, 7–10]. Определению данного класса соединений, прежде всего минорных (например, макистеронов), методом ВЭЖХ могут мешать компоненты матрицы растительного экстракта, например флавоноиды [1]. В связи с этим актуальна разработка сорбентов, которые позволяли бы относительно селективно выделять фитоэкдистероиды для решения как препаративных, так и аналитических задач.

Общий подход к созданию селективных сорбентов для концентрирования органических соединений – молекулярный импринтинг [11]. Метод основан на формировании органического или неорганического (SiO_2 , TiO_2) полимера вокруг молекул целевого соединения (темплата) с последующей отмывкой темплата, после чего в матрице полимера остаются селективные сайты связывания темплата. Подобные сорбенты получены для извлечения сотен соединений [12], в частности, стероидных гормонов [13, 14]. Однако для фитоэкдистероидов молекулярно-импринтированные сорбенты до сих пор не были получены.

Цель данной работы – получение молекулярно-импринтированного сорбента для селективного извлечения фитоэкдистероидов из сложной матрицы растительного экстракта. С этой целью мы провели молекулярный импринтинг экдистена – самого распространенного фитоэкдистероида – на поверхности наночастиц диоксида титана, на которые наносили дополнительный тонкий слой TiO_2 путем гидролиза *n*-бутоксид титана по методу Кунитакэ [15]. После десорбции экдистена получили селективный сорбент. Выяснили также возможность повышения эффективности получаемого сорбента при использовании в качестве темплата не самого экдистена, а его соединения с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК). Контроль сорбции и элюирования фитоэкдистероидов с сорбента осуществляли методом ВЭЖХ-МС/МС.

Экспериментальная часть

1. Используемые вещества

Использовали диоксид титана Sigma–Aldrich (нанопорошок со средним диаметром частиц 21 нм), толуол Acros Organics (для ВЭЖХ, 99,99%), этанол Merck (99,9%), гидроксид калия (ч.д.а.), гидрохлорид 3-аминофенилборной кислоты Aldrich (98%), бутоксид титана (IV) Aldrich (97%), экдистен Sigma–Aldrich.

Для получения ИК-спектров образцов TiO_2 в таблетках КВг использовали ИК-спектрометр Varian 680-IR.

Микрофотографии TiO_2 получали в просвечивающем электронном микроскопе LEO 912 AB OMEGA (Carl Zeiss, Германия).

Наземные части (стебли и листья) серпухи венценосной (*Serratula coronata*, Архангельская область, время сбора июль–август) высушивали, измельчали и экстрагировали 40%-ным этанолом (1 : 100, 2 ч), экстракт сгущали на роторном испарителе и подвергали лиофильной сушке (72 ч, ступенчато при температуре от –55 до +24 °С), в результате чего получали сухой экстракт. Его навеску растворяли в ДМСО (23 мг на 10 мл) и разбавляли в 10 раз 96%-ным этанолом. Структуры фитостероидов серпухи венценосной приведены на схеме 1.

2. Получение материалов с молекулярными отпечатками

В колбу на 250 мл помещали 50–100 мг нанопорошка оксида титана (IV) и 65 мл 0,03% (об./об.) раствора воды в толуоле (для этого в указанный объем толуола вводили 20 мкл воды при перемешивании) и перемешивали содержимое колбы 2,5 ч при 300 об/мин. Далее 5 мг темплата растворяли в 6,5 мл абсолютного этанола, добавляли 315 мкл бутоксида титана, перемешивали, помещали на ультразвуковую баню на 5 мин и оставляли на 30–40 мин. Для приготовления неимпринтированного сорбента (без отпечатков экдистена) темплат не добавляли, а аликвоту бутоксида титана сразу растворяли в 6,5 мл этанола. Если в качестве темплата использовали соединение экдистена с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК), то отдельно растворяли 5 мг экдистена и 18,1 мг АФБК (мольное

Абрамчук Сергей Савельевич – доцент (МГУ), старший научный сотрудник (ИНЭОС), кандидат технических наук, e-mail: abr@polly.phys.msu.ru

Ихалайнен Андрей Александрович – ведущий научный сотрудник, доктор биологических наук, доцент, e-mail: info@ncsignal.ru

Антохин Андрей Михайлович – заместитель директора по научной работе, доцент, кандидат технических наук, e-mail: info@ncsignal.ru

Таранченко Виктор Федорович – начальник отдела, доцент, кандидат химических наук, e-mail: info@ncsignal.ru

Гончаров Валерий Михайлович – ведущий научный сотрудник, доцент, кандидат химических наук, e-mail: info@ncsignal.ru

Аксенов Алексей Вадимович – заведующий лабораторией, доцент, кандидат технических наук, e-mail: info@ncsignal.ru

Митрофанов Дмитрий Александрович – ведущий научный сотрудник, доцент, кандидат химических наук, e-mail: info@ncsignal.ru

Синицын Михаил Юрьевич – младший научный сотрудник, e-mail: info@ncsignal.ru

Беклемишев Михаил Константинович – ведущий научный сотрудник кафедры аналитической химии, доктор химических наук, e-mail: mkb@analyt.chem.msu.ru

соотношение экдистен : АФБК = 1 : 10) в 1 мл абсолютного этанола каждый, объединяли эти растворы, довели общий объем до 6,5 мл абсолютным этанолом и добавляли 270 мкл буюксида титана. После перемешивания и сонирования (5 мин) оставляли на 30–40 мин.

К полученной суспензии TiO_2 в толуоле добавляли раствор смеси темплата с буюксидом, перемешивали в течение 5 ч и затем выдерживали 1 сутки при 5 ± 2 °С. Полученный продукт (мелкодисперсный осадок бежевого цвета) фильтровали через бумажный фильтр (синяя лента), промывали с помощью 10 мл 0,03% (об./об.) раствора воды в толуоле и сушили на фильтре в сушильном шкафу при 55 °С в течение 12 ч. Для отмывки темплата к осадку добавляли 2 мл 1%-го раствора гидроксида калия в 96%-ном этаноле и сонировали 1 ч при 50 °С, после чего дозатором отбирали надосадочный слой и снова добавляли 2 мл 1%-ного этанольного раствора гидроксида калия; такую отмывку повторяли еще 3 раза. Осадок сушили в токе азота и оставляли на воздухе до полного высыхания.

3. Изучение сорбционных свойств полученных материалов

Для изучения повторного связывания темплата навеску (около 10 мг) отмытого и высушенного сорбента помещали в стеклянную вialу вместимостью 1,8 мл, добавляли 0,5 мл $1 \cdot 10^{-5}$ М раствора экдистена в этаноле, перемешивали 30 мин, центрифугировали при 2000 об/мин, надосадочный слой отбирали дозатором, переносили в вialу и анализировали методом ВЭЖХ-МС. Хроматографическое определение целевых аналитов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ-МС на хроматографе Dionex Ultimate 3000 с термостатируемой колонкой («Thermo» HypersilGold aQ, $150 \times 2,1$ мм, размер зерна 3 мкм) и масс-спектрометром Thermo QExactive, оснащенным источником ионизации электроспреем при атмосферном давлении. В работе использовали два элюента: А – смесь ацетонитрил – вода (5 / 95 об.) с добавкой 0,1% (об.) HCOOH ; В – ацетонитрил с добавкой 0,1% (об.) HCOOH . Разделение проводили в режиме градиентного элюирования: 0–1 мин: 10% В; 1–9 мин: 10 – 90% В; 9–12 мин: 90% В; 12–12,5 мин: 90 – 10% В; 12,5–15 мин: 10% В. Объем вводимой пробы составлял 3 мкл. Температура термостата колонки: 30 °С, скорость подачи элюента: 0,5 мл/мин. Измерения проводили в режиме регистрации положительных ионов по полному ионному току в диапазоне масс 100,00 – 1000,00 а.е.м. с разрешением 35000. Температура источника ионизации: 320 °С, температура фокусирующего капилляра: 270 °С, напряжение источника ионизации: 4 кВ.

Количество сорбированного экдистена рассчитывали по разности его содержания в растворе до и после сорбции, нормируя на точную массу навески.

Исследования методом нормально-фазовой ВЭЖХ проводили на хроматографе с УФ-детектором Dionex Ultimate 3000 с термостатируемой колонкой (Waters Viridis Silica 4.6 x 150 мм, размер зерна 5 мкм). Разделение проводили в изократическом режиме с использованием изопропанола в качестве элюента. Температура автосамплера составляла 17 °С, температура колонки 25 °С, время анализа 20 мин, объем вводимой пробы 10 мкл. Детектирование проводили при 220 нм.

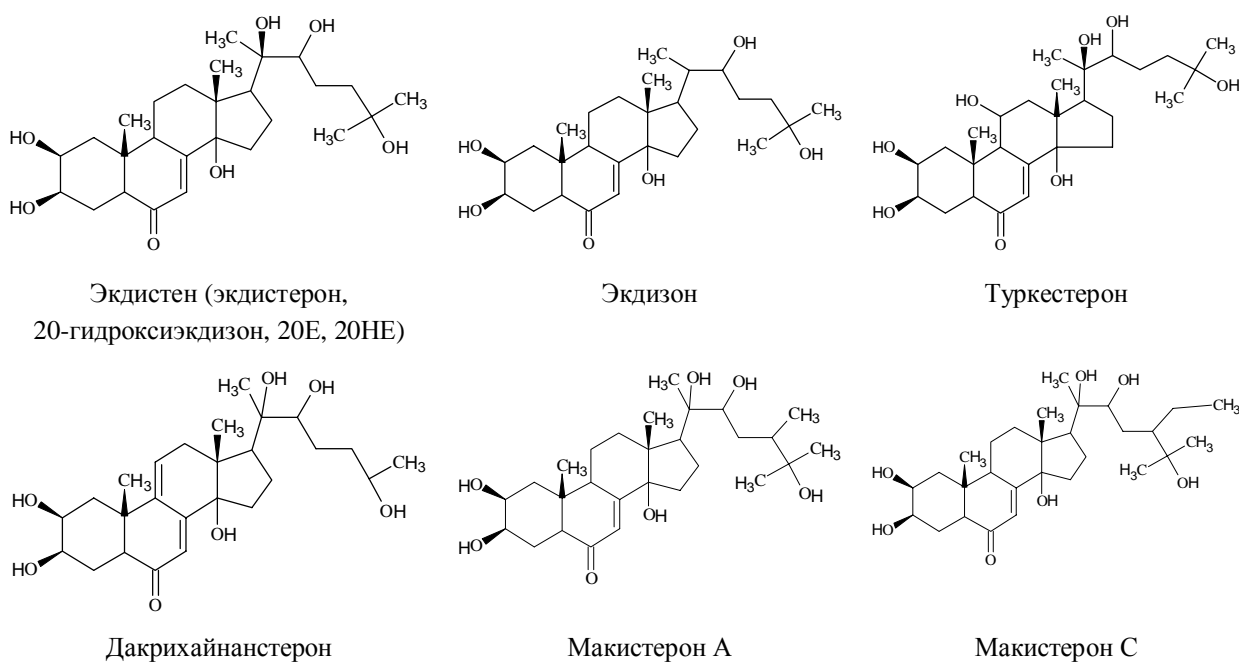


Схема 1. Структурные формулы рассматриваемых фитоэкдистероидов

Получение картриджей для твердофазной экстракции. За основу были взяты коммерчески доступные картриджи HyperSep C8 (100 мг, 1 мл) фирмы Thermo, из которых удаляли сорбент и использовали корпус картриджа и две септы, удерживающие сорбент. В пустой картридж помещали септу, затем навеску (50 мг) полученного нами сорбента и вторую септу. Растворы прокачивали через картриджи с помощью манифолда Agilent для ТФЭ (Vacuum manifold processing station) и вакуумного насоса Millipore (Vacuum pump XF54 230 50). Прежде чем проводить сорбцию, полученные картриджи кондиционировали (1 мл деионизованной воды, затем 1 мл 96% этанола), далее пропускали 0,5 мл пробы, промывали картридж 1 мл деионизованной воды и элюировали 2 мл смеси растворителей (для сорбента с отпечатками экидистена: ацетон – ацетонитрил – пропанол-2 (10 : 45 : 45 об.) + 0,1% об. безводной HCOOH; для сорбента с отпечатками комплекса экидистен – АФБК: ацетон – ацетонитрил – пропанол-2 (10 : 45 : 45 об.)). Элюат переносили в вials вместимостью 1,8 мл и анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве стандарта в нашем распоряжении имелся только экидистен, который и использовали при оценке количества фитоэкидистероидов. Как известно [16, 17], использование экидистена как общего стандарта для всей группы фитоэкидистероидов оправдано.

Сорбционные свойства импринтированного сорбента сравнивали со свойствами кремнезема с привитыми группами C₁₈. Для этого использовали картриджи Zorbax C18, которые также кондиционировали (4 мл метанола, затем 4 мл деионизованной воды), далее пропускали пробу (5 мл), промывали картридж (4 мл деионизованной воды) и элюировали метанолом (4 раза по 1 мл). Элюат собирали в вial, выпаривали в токе азота, перерастворяли в 100 мкл метанола и анализировали методом ВЭЖХ-МС.

Результаты и обсуждение

Получение и характеристики сорбентов на основе TiO₂. Один из надежных способов получения молекулярных отпечатков органических веществ заключается в использовании неорганических матриц, чаще всего кремнезема или диоксида титана. В отличие от органических полимеров, неорганические оксиды обладают жесткостью, достаточной для формирования молекулярного отпечатка, сохраняющего заданную форму. Кунитакэ [15] разработал подход к получению таких отпечатков на поверхности TiO₂, основанный на формировании дополнительного тонкого слоя диоксида титана золь-гель методом. Золь-гель процесс основан на гидролизе алкоксида титана (мы использовали *n*-бутоксид Ti(OBu)₄) в органическом растворителе, содержащем небольшое количество воды (схема 2). В слой TiO₂·*x*H₂O, формируемый на поверхности частиц диоксида титана, встраиваются молекулы принтуемого вещества (темплата). Общая схема молекулярного импринтинга показана на схеме 3.

Для повышения качества молекулярных отпечатков темплат иногда вводят в виде комплексов. Мы предположили, что добавление к структуре фитостероида ионизирующей группы способствовало бы более сильному взаимодействию темплата с матрицей за счет образования более прочных водородных связей. С этой целью мы изучили возможность импринтинга экидистена в форме соединений с 3-аминофенилборной кислотой (АФБК), содержащей катионогенную группу (аминогруппу), а также с 3-карбоксих-5-нитрофенилборной кислотой (КНФБК), образующей, наоборот, анион. Как показал эксперимент, отпечатки экидистена в TiO₂ образуются только при использовании самого экидистена или его соединения с АФБК (схема 4). Возможно, отсутствие импринтинга в присутствии КНФБК вызвано тем, что последняя, как кислота, частично разрушает бутоксид титана, переводя его в бутанол. Методом нормально-фазовой ВЭЖХ исследовано комплексообразование экидистена с АФБК (табл. 1). Времена удерживания экидистена в присутствии и в отсутствие АФБК различаются, что подтверждает образование комплекса экидистен – АФБК в среде изопропанола. Добавление к этой смеси *n*-бутоксида титана не приводит к изменению времен удерживания, то есть комплекс экидистена с бутоксидом неустойчив или вовсе не образуется.

Для синтезированных сорбентов получены ИК-спектры (рис. 1) и фотографии в просвечивающем электронном микроскопе (рис. 2). Отличия ИК-спектра диоксида титана, модифицированного золь-гель методом, от немодифицированного носителя вызваны сохранением остаточных бутокси-групп в глубине этого слоя [18]. На микрофотографии (рис. 2) видно, что модификация TiO₂ практически не увеличивает размер частиц (средние диаметры частиц исходного и модифицированного TiO₂ составляют 23±7 и 20±8 нм, соответственно), т.е. толщина импринтированной пленки геля невелика.

Выбор условий получения импринтированных сорбентов. Качество получаемых сорбентов, импринтированных экидистеном, оценивали по количеству сорбированного экидистена (разность его содержания в растворе до и после сорбции, нормируемого на точную массу навески) и по величине импринтинг-

факторов (ИФ), которые определяли как отношение сорбированного количества экдистена импринтированным и неимпринтированным сорбентами в одних и тех же условиях (методику изучения сорбции см. в п. 3 Экспериментальной части). Существенный фактор, влияющий на величины ИФ, – концентрация буюксида титана в реакционной смеси (табл. 2). Импринтинг экдистена (ИФ > 1) наблюдается в относительно узком диапазоне концентраций буюксида титана; при импринтинге самого экдистена использовали 315 мкл буюксида, а экдистена в присутствии АФБК – 270 мкл.

Для получения отпечатков необходима достаточная концентрация темплата, вводимого при импринтинге: для сорбентов, полученных в присутствии 1; 2,5 и 5,0 мг экдистена импринтинг-факторы равны 0,3; 0,8 и 3,8, соответственно. В дальнейшей работе использовали 5 мг темплата; последующее увеличение количества темплата могло бы затруднить его дальнейшее удаление.

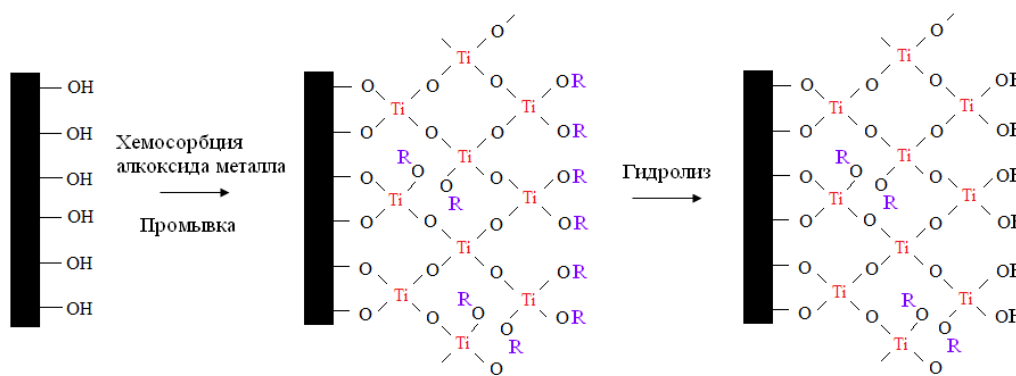


Схема 2. Поверхностная модификация диоксида титана золь-гель методом по Кунитакэ [15]. В ее основе лежит гидролиз $Ti(OR)_4$ на поверхности частиц TiO_2 (R – алкил). После гидролиза алкокси-группы OR переходят в гидроксо-группы OH, кроме тех, которые расположены в глубине слоя

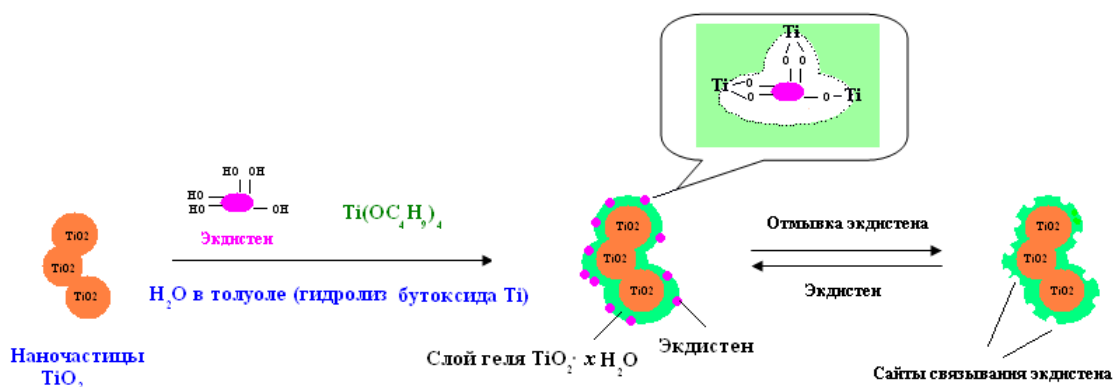


Схема 3. Импринтинг экдистена в гель TiO_2

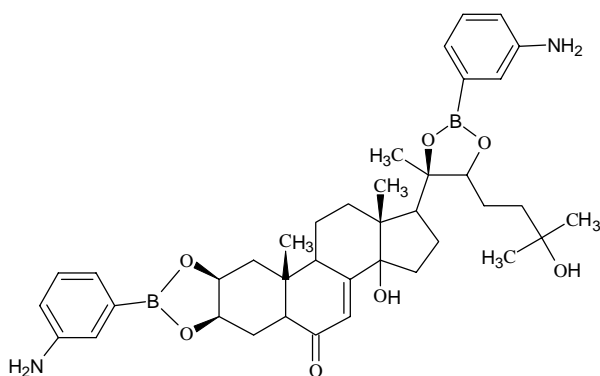


Схема 4. Комплекс экдистена с 3-аминофенилборной кислотой

Таблица 1. Исследование взаимодействия экдистена с буюксидом титана (IV) и 3-аминофенилборной нормально-фазовой ВЭЖХ, концентрация каждого из компонентов – $5 \cdot 10^{-4}$ М

Состав раствора, вводимого в колонку	Времена удерживания наблюдаемых пиков, мин
Экдистен	2,88
Экдистен + АФБК	3,16
Буюксид титана (IV)	2,43
Экдистен + буюксид	2,87; 2,44
[Экдистен + буюксид] + АФБК	2,45; 3,16
[Экдистен + АФБК] + буюксид	2,45; 3,16

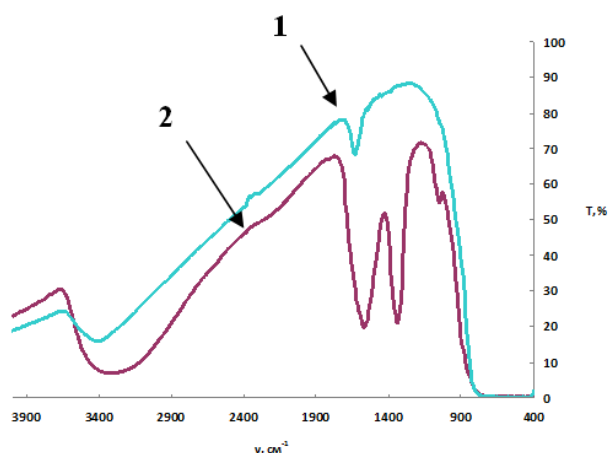


Рис. 1. ИК-спектры образцов TiO_2 в таблетках КВг: 1 – немодифицированного, 2 – модифицированного золь-гель нанесением $\text{Ti}(\text{OBu})_4$. ИК-спектр импринтированного сорбента не приведен, так как он идентичен спектру неимпринтированного сорбента

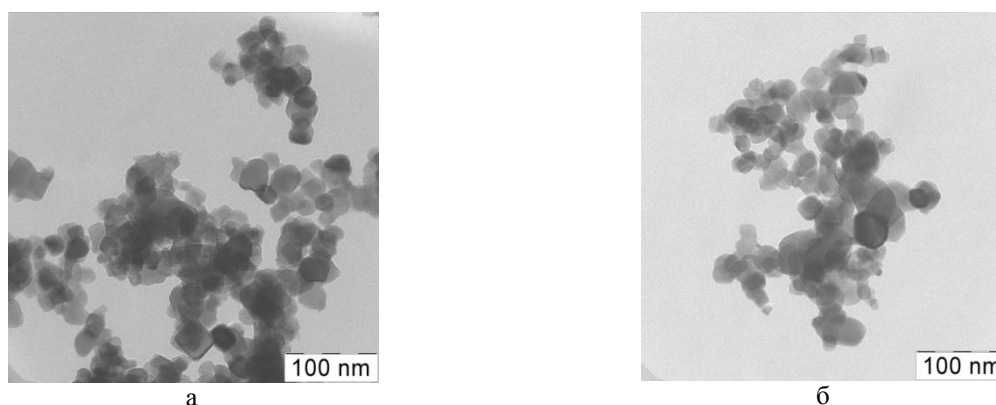


Рис. 2. Микрофотографии TiO_2 в просвечивающем электронном микроскопе: а – импринтированного экдистеном, б – немодифицированного TiO_2

Таблица 2. Зависимость импринтинг-фактора полученных сорбентов (ИФ) от количества вводимого буюксида титана (IV) (50 мг исходного TiO_2 , 5 мг темплата, содержание воды в толуоле 0,03%)

Объем $\text{Ti}(\text{OBu})_4$, мл	ИФ	
	Темплат: экдистен	Темплат: экдистен – 3-аминофенилборная кислота
0,230	0,8	–
0,270	3,0	2,2
0,315	3,8	1,2
0,360	0,2	–

Еще один фактор, влияющий на качество получаемых отпечатков фитоэкдистероидов, – концентрация воды в реакционной смеси при импринтинге, поскольку от нее зависит скорость гидролиза алкоксида титана и формирования геля, в котором и образуются отпечатки темплата. Обнаружено, что как в отсутствие воды, так и при ее избытке (количество воды выше ее растворимости в толуоле) качество молекулярных отпечатков снижается (импринтинг-факторы уменьшаются) (табл. 3). Далее в работе для гидролиза алкоксида титана использовали 0,03% (об.) раствор воды в толуоле, что соответствует почти насыщенному раствору.

Полученные сорбенты сохраняют свои свойства при хранении (ИФ, измеренные через 5 дней и 2 мес. после синтеза сорбента, различались не более чем на 6%), что подтверждает стабильность молекулярных отпечатков, полученных в матрице оксида титана(IV).

Сорбция экдистена полученными сорбентами. Для изучения свойств импринтированных экдистеном сорбентов их помещали в картриджи для твердофазной экстракции и пропускали через них раствор экдистена в этаноле. Затем картридж промывали водой и десорбировали экдистен. В случае сорбента с отпечатками экдистена с АФБК десорбцию проводили 1%-ным раствором муравьиной кислоты в смеси ацетон – ацетонитрил – изопропанол (10 : 45 : 45). Такую смесь растворителей применяют для десорбции сильноудерживаемых соединений с колонок для ВЭЖХ. (Муравьиную или уксусную кислоту используют

в смеси с ацетонитрилом в качестве подвижной фазы при ВЭЖХ фитоекдистероидов [3, 8].) В случае же картриджей с отпечатками комплекса экдистена без АФБК десорбция аналитов проходит полнее без добавления муравьиной кислоты к смеси растворителей.

Как следует из таблицы 4, степень извлечения экдистена импринтированными сорбентами (МИП) значительно выше, чем неимпринтированными (НИП) (ИФ = 2,3–3,3), что согласуется с образованием молекулярных отпечатков экдистена на поверхности TiO₂.

Групповая сорбция фитоекдистероидов полученными сорбентами. Фитоекдистероиды извлекали из экстракта серпухи венценосной, приготовленного, как описано в Экспериментальной части. Без дополнительной пробоподготовки экстракт (0,5 мл этанольного раствора, см. п. 1 Экспериментальной части) пропускали через картридж с исследуемым сорбентом. Десорбцию проводили так же, как и при индивидуальной сорбции экдистена. Элюаты анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС (рис. 3).

Предполагали, что из-за сходства структур все фитостероиды будут связываться отпечатками экдистена. Как следует из таблицы 5, это действительно имеет место: все обнаруженные в экстракте фитоекдистероиды извлекаются сорбентом, импринтированным экдистеном, причем даже в большей степени, чем сам экдистен. Существенно, что компоненты матрицы экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме, отделяются в ходе проводимой сорбции (табл. 5), что свидетельствует о селективности полученных сорбентов.

Таблица 3. Влияние количества воды при синтезе сорбентов на их сорбционные свойства при статической сорбции экдистена из его этанольного раствора (содержание буюксида титана (IV) 0,315 и 0,270 мкл соответственно для экдистена и его комплекса с АФБК в качестве темплатов)

Содержание воды в толуоле, % (об./об)	ИФ	
	Темплат: экдистен	Темплат: экдистен – 3-аминофенилборная кислота
0	1,0	1,5
0,030	3,8	2,2
0,045	1,2	1,4

Таблица 4. Степень извлечения экдистена после его сорбции из этанольного раствора на картриджах для ТФЭ, заполненных полученными МИП сорбентами

Концентрация экдистена, мкг/мл	Темплат: экдистен		Темплат: экдистен – 3-аминофенилборная кислота	
	Степень извлечения, %	ИФ**	Степень извлечения, %	ИФ**
0 (НИП*)	28±3	–	28±2	–
1	65	2,3	79	2,8
5	74	2,6	85	3,1
10	76	2,7	92	3,3
25	74	2,7	88	3,1
50	80	2,9	87	3,1

* Неимпринтированный сорбент; ** ИФ = степень извлечения (МИП) / степень извлечения (НИП).

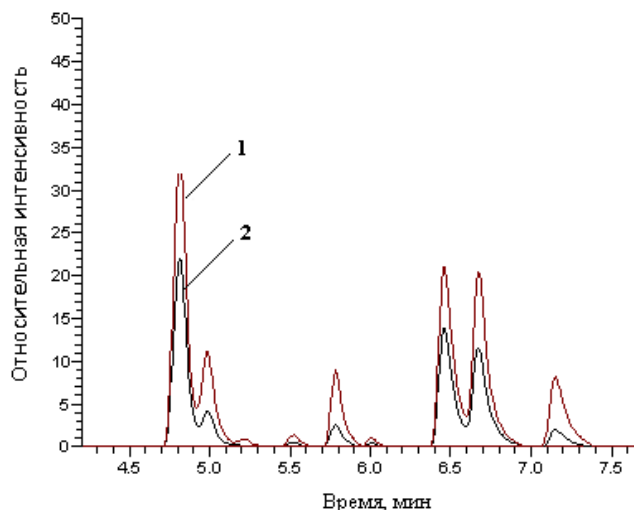


Рис. 3. Хроматограммы по полному ионному току элюатов экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции на картриджах с импринтированным (1, темплат – экдистен) и неимпринтированным сорбентом (2): экдистен ($t_R = 4,8$ мин); туркестерон ($t_R = 5,0$ мин); макистерон А ($t_R = 5,3$ мин); экдизон ($t_R = 5,5$ мин); дакрихайнанстерон ($t_R = 5,8$ мин); макистерон С ($t_R = 6,0$ мин), компоненты матрицы (1–3): 6,5, 6,7, 7,2 мин

Таблица 5. Степени извлечения фитостероидов (%) из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции на картриджах с сорбентами, импринтированными экидистеном или его комплексом с 3-аминофенилборной кислотой (МИП), и неимпринтированными сорбентами (НИП)

Аналит	Темплат					
	Экидистен			Экидистен – 3-аминофенилборная кислота		
	НИП	МИП	ИФ [#]	НИП	МИП	ИФ [#]
Экидистен	23±3**	41±4	1,8	7,3±0,5	80±4	11
Экидизон	39±3	73±2	1,9	0,9±0,3	78±3	83
Туркестерон	37±2	68±7	1,9	1,1±0,3	70±3	62
Дакрихайнанстерон	33±2	93±3	2,8	1,6±0,3	75±3	48
Макистерон А	15±3	46±4	3,0	0,13±0,06	76±3	– ^{##}
Макистерон С	58±3	111±8	1,9	0,3±0,1	85±3	– ^{##}
Компонент матрицы 1*	0,07±0,01	0,24±0,06	3,4	0,12±0,04	0,34±0,08	2,8
Компонент матрицы 2*	0,10±0,01	0,14±0,03	1,4	0,16±0,03	0,46±0,09	2,9
Компонент матрицы 3*	2,2±0,2	6,7±0,5	3,0	2,80±0,25	64±5	23

* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме (не идентифицированы); ** Доверительные интервалы рассчитаны из трех параллельных измерений; [#] импринтинг-фактор, рассчитанный как отношение степеней извлечения компонента импринтированным и неимпринтированным TiO₂; ^{##} эти значения имели бы высокую погрешность из-за низкой сорбции макистеронов на неимпринтированном TiO₂.

Для сорбента, полученного в присутствии 3-аминофенилборной кислоты, степени извлечения фитостероидов выше (70–85%), чем без нее. Однако возрастает и степень извлечения компонентов матрицы, особенно одного из них (компонент 3 в табл. 5). Таким образом, сорбенты, импринтированные экидистеном и комплексом экидистен – АФБК, взаимно дополняют друг друга по свойствам.

Из таблицы 4 и 5 следует, что картриджи с НИП извлекают фитостероиды значительно слабее из растительного экстракта, чем из чистого раствора экидистена. Вероятно, это вызвано подавлением сорбции фитостероидов компонентами матрицы растительного экстракта. На МИП-сорбентах сорбция экидистена также снижается – с 65–80% (чистые растворы экидистена, табл. 4) до 40% (растительный экстракт, табл. 5), но лишь в том случае, когда в качестве темплата использовали экидистен; если же импринтировали комплекс экидистена с АФБК, извлечение сохраняется на уровне 80–90%, что и вызывает наблюдаемое повышение ИФ при переходе от чистого раствора экидистена к растительному экстракту и от экидистена к его комплексу в качестве темплата.

Сорбция фитостероидов на обращенно-фазовом кремнеземе. В сравнительных целях сорбцию фитостероидов серпухи изучили также на картриджах Zorbax C18 с обращенно-фазовым кремнеземом (табл. 6). На этом сорбенте минорные фитостероиды удерживаются, но сам экидистен (темплата) сорбируется слабо (примерно в той же степени, как на неимпринтированном TiO₂). Кроме того, обращенно-фазовый кремнезем значительно (более чем на 50%) извлекает компоненты матрицы экстракта. Эти данные подтверждают преимущества сорбентов на основе TiO₂.

Возможность практического использования полученных сорбентов. В данной работе результаты проведенного анализа растительного экстракта проверяли, параллельно анализируя тот же экстракт методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения, который благодаря точному (до трех верных знаков после запятой) определению масс молекулярных ионов позволяет практически однозначно провести отнесение хроматографических пиков. Если пользователь располагает лишь хроматографом без масс-селективного детектора или системой ВЭЖХ-МС низкого разрешения, отнесение хроматографических пиков может быть неоднозначным. В таком случае велик риск потерять или ошибочно идентифицировать сигналы прежде всего минорных фитостероидов, что особенно критично при отсутствии стан-

Таблица 6. Степени извлечения (%) фитостероидов из этанольного экстракта серпухи венценосной после твердофазной экстракции (картриджи с кремнеземом, имеющим привитые группы C18)

Аналит	Степень извлечения
Экидистен	28
Экидизон	84
Туркестерон	75
Дакрихайнанстерон	85
Макистерон А	109
Макистерон С	108
Компонент матрицы 1*	57
Компонент матрицы 2*	66
Компонент матрицы 3*	78

* Компоненты экстракта, дающие наиболее интенсивные пики на хроматограмме.

дартов этих соединений. Использование картриджей с разработанными сорбентами поможет решению аналитической задачи, позволив отделить основные компоненты матрицы растительного экстракта. Кроме того, полученные сорбенты могут быть использованы при препаративном выделении фитоэктистероидов.

Выводы

Показана возможность молекулярного импринтинга фитоэктистероидов. Методом поверхностного импринтинга эктистена получены два сорбента, извлекающие группу 6 фитоэктистероидов серпухи венценой (эктистен, эктизон, туркестерон, дакрихайнанстерон, макистероны А и С) более эффективно, чем соответствующие неимпринтированные сорбенты, и более селективно, чем обращенно-фазовый кремнезем. Выявлены преимущества молекулярного импринтинга эктистена в виде его соединения с 3-аминофенилборной кислотой. Полученные сорбенты в форме картриджей для твердофазной экстракции позволяют отделить фитостероиды от основных компонентов матрицы экстракта серпухи венценой.

Список литературы

1. Bathori M., Pongracz Z. Phytoecdysteroids – from isolation to their effects on humans // *Curr. Med. Chem.* 2005. Vol. 12. Pp. 153–172.
2. Large T., Lafont R., Morgan E.D., Wilson I.D. Micellar Capillary Electrophoresis of ecdysteroids // *Anal. Proc.* 1992. Vol. 29. Pp. 386–388.
3. Lafont R., Blais C., Harmatha J., Wilson I.D. Ecdysteroids: chromatography. In: I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, eds. *Encyclopedia of separation science*. London, 2000. Vol. III. Pp. 2631–2643.
4. Ochieng C.O., Ishola I.O., Opiyo S.A., Manguro L.A.O., Owuor P.O., Wong K.-C. Phytoecdysteroids from the Stem Bark of *Vitex doniana* and Their Anti-Inflammatory Effects // *Planta Med.* 2013. Vol. 79, N1. Pp. 52–59.
5. Odinokov V.N., Galyautdinov I.V., Mel'nikova D.A., Muslimov Z.S., Khalilov L.M., Denisenko O.N., Mogilenko T.G., Zaripova E.R., Zakirova L.M. Isolation and identification of phytoecdysteroids from juice of *Serratula quinquefolia* // *Chem. Nat. Compd.* 2013. Vol. 49, N2. Pp. 392–394.
6. Wainwright G., Prescott M.C., Lomas L.O., Webster S.G., Rees H.H. Development of a new high-performance chromatography – Mass spectrometric method for the analysis of ecdysteroids in biological extracts // *Arch. Insect Biochem.* 1997. Vol. 35. Pp. 21–31.
7. Bathori M., Gergely A., Kalasz H., Nagy G., Dobos A., Mathe I. Liquid Chromatographic Monitoring of Phytoecdysteroid production of *Serratula Wolfii* // *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.* 2000. Vol. 23, N2. Pp. 281–294.
8. Chadin I., Volodin V., Whiting P., Shirshova T., Kolegova N., Dinan L. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Potamogeton* // *Biochem. Syst. Ecol.* 2003. Vol. 31. Pp. 407–415.
9. Li Y., Warren J.T., Boysen G., Gilbert L.I., Gold A., Sangaiah R., Ball L.M., Swenberg J.A. Profiling of ecdysteroids in complex biological samples using liquid chromatography/ion trap mass spectrometry // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20. Pp. 185–192.
10. Bathori M. Phytoecdysteroids effects on mammals, isolation and analysis // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2002. Vol. 2, N12. Pp. 285–293.
11. *Molecular imprinting of polymers* // Eds. Piletsky S., Turner A. Georgetown, TX, USA: Landes Bioscience. 2006. Pp. 208.
12. Cheong W.J., Yang S.H., Ali F. Molecular imprinted polymers for separation science: a review of reviews // *J. Sep. Sci.* 2013. Vol. 36, N3. Pp. 609–628. doi: 10.1002/jssc.201200784.
13. Zulficar A., Morgan G., Turner N.W. Detection of multiple steroidal compounds in synthetic urine using comprehensive gas chromatography – mass spectrometry combined with a molecularly imprinted polymer clean-up protocol // *Analyst.* 2014. Vol. 139. Pp. 4955–4963.
14. Doue M., Bichon E., Dervilly-Pinel G., Pichon V., Chapuis-Hugon F., Lesellier E., West C., Monteau F., Le Bizec B. Molecularly imprinted polymer applied to the selective isolation of urinary steroid hormones: An efficient tool in the control of natural steroid hormones abuse in cattle // *J. Chromatogr. A.* 2012. Vol. 1270. Pp. 51–61.
15. Kunitake T., Lee S.-W. Molecular imprinting in ultrathin titania gel films via surface sol-gel process // *Anal. Chim. Acta.* 2004. Vol. 504. Pp. 1–6.
16. Grebenok R.J., Ripa P.V., Adler J.H. Occurrence and levels of ecdysteroids in spinach // *Lipids.* 1991. Vol. 26, N8. Pp. 666–668.
17. Chadin I., Volodin V., Whiting P., Shirshova T., Kolegova N., Dinan L. Ecdysteroid content and distribution in plants of genus *Potamogeton* // *Biochem. System. Ecol.* 2003. Vol. 31. Pp. 407–415.
18. Lee S.-W., Takahara N., Korposh S., Yang D.-H., Kunitake T. A Novel Mass-Sensitive Sensor based on β -Cyclodextrin-Anchored Bisphenol A – Imprinted TiO_2 Ultrathin Layers // *Sens. And Mater.* 2011. Vol. 23, N4. Pp. 229–236.

Поступило в редакцию 13 января 2015 г.

После переработки 23 марта 2015 г.

Sevko D.A.^{1*}, Abramchuk S.S.^{1,3}, Ikhalaïnen A.A.², Antokhin A.M.², Taranchenko V.F.², Goncharov V.M.², Aksenov A.V.², Mitrofanov D.A.², Sinit'syn M.Iu.², Beklemishev M.K.¹ SELECTIVE SOLID-PHASE EXTRACTION OF PHYTOECDYSTEROIDS FROM PLANT EXTRACTS BY USING MOLECULARLY IMPRINTED TiO₂ NANOPARTICLES

¹Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, Leninskiye Gory 1-3, GSP-1, Moscow, 119991 (Russia), e-mail: dasha.polyanina@gmail.com

²Federal State Unitary Enterprise "Scientific Center" Signal", Bol'shaia Olen'ia, 8, Moscow, 107014 (Russia)

³A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds of Russian Academy of Sciences, Vavilova, 28, Moscow, 119991 (Russia)

A sorbent molecularly imprinted with ecdystene, the most abundant phytoecdysteroid, was obtained by surface modification of TiO₂ nanoparticles using hydrolysis of titanium(IV) *n*-butoxide. Ecdystene and its complex with 3-aminophenylboronic acid (APBA) were used as templates. The solid phase extraction (SPE) cartridges with the obtained sorbents were used for the group sorption of six phytoecdysteroids of sawwort (*Serratula coronata*). Compared with the silica-C18, the recovery of phytoecdysteroids with the imprinted sorbents is higher, and the recovery of matrix component lower. The analytes were adsorbed on the SPE cartridge, eluted by a mixture of acetone – acetonitrile – isopropanol – formic acid (10 : 45 : 45 : 1) and determined by HPLC–MS/MS technique. Sorption of phytoecdysteroids on the developed sorbent enabled their separation from the extract matrix. The sorbent based on the *ecdystene* – APBA complex was the most efficient: the recovery of phytoecdysteroids was 2–3 times higher those that with the non-imprinted sorbents. Obtained sorbents save their sorption properties during storage, this fact confirms the stability of molecular imprints.

Keywords: molecular imprinting, imprinted sorbents, surface sol-gel synthesis, solid phase extraction, high performance liquid chromatography, phytoecdysteroids, plant extracts.

References

1. Bathori M., Pongracz Z. *Curr. Med. Chem.*, 2005, vol. 12, pp. 153–172.
2. Large T., Lafont R., Morgan E.D., Wilson I.D. *Anal. Proc.*, 1992, vol. 29, pp. 386–388.
3. Lafont R., Blais C., Harmatha J., Wilson I.D. *Ecdysteroids: chromatography*. In: I.D. Wilson, E.R. Adlard, M. Cooke, C.F. Poole, eds. *Encyclopedia of separation science*. London, 2000, vol. III, pp. 2631–2643.
4. Ochieng C.O., Ishola I.O., Opiyo S.A., Manguro L.A.O., Owuor P.O., Wong K.-C. *Planta Med.*, 2013, vol. 79, no. 1, pp. 52–59.
5. Odinokov V.N., Galyautdinov I.V., Mel'nikova D.A., Muslimov Z.S., Khalilov L.M., Denisenko O.N., Mogilenko T.G., Zaripova E.R., Zakirova L.M. *Chem. Nat. Compd.*, 2013, vol. 49, no. 2, pp. 392–394.
6. Wainwright G., Prescott M.C., Lomas L.O., Webster S. G., Rees H.H. *Arch. Insect Biochem.*, 1997, vol. 35, pp. 21–31.
7. Bathori M., Gergely A., Kalasz H., Nagy G., Dobos A., Mathe I. *J. Liq. Chrom. Rel. Technol.*, 2000, vol. 23, no. 2, pp. 281–294.
8. Chadin I., Volodin V., Whiting P., Shirshova T., Kolegova N., Dinan L. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2003, vol. 31, pp. 407–415.
9. Li Y., Warren J.T., Boysen G., Gilbert L.I., Gold A., Sangaiah R., Ball L.M., Swenberg J.A. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 2006, vol. 20, pp. 185–192.
10. Bathori M. *Mini-Rev. Med. Chem.*, 2002, vol. 2, no. 12, pp. 285–293.
11. Molecular imprinting of polymers // Eds. Piletsky S., Turner A. Georgetown, TX, USA: Landes Bioscience. 2006, pp. 208.
12. Cheong W.J., Yang S.H., Ali F. *J. Sep. Sci.*, 2013, vol. 36, N3, pp. 609–628. doi: 10.1002/jssc.201200784.
13. Zulfiqar A., Morgan G., Turner N.W. *Analyst.*, 2014, vol. 139, pp. 4955–4963.
14. Doue M., Bichon E., Dervilly-Pinel G., Pichon V., Chapuis-Hugon F., Lesellier E., West C., Monteau F., Le Bizec B. *J. Chromatogr. A.*, 2012, vol. 1270, pp. 51–61.
15. Kunitake T., Lee S.-W. *Anal. Chim. Acta.*, 2004, vol. 504, pp. 1–6.
16. Grebenok R.J., Ripa P.V., Adler J.H. *Lipids* 1991, vol. 26, N8, pp. 666–668.
17. Chadin I., Volodin V., Whiting P., Shirshova T., Kolegova N., Dinan L. *Biochem. System. Ecol.*, 2003, vol. 31, pp. 407–415.
18. Lee S.-W., Takahara N., Korposh S., Yang D.-H., Kunitake T. *Sens. And Mater.*, 2011, vol. 23, N4, pp. 229–236.

Received January 13, 2015

Revised March 23, 2015

* Corresponding author.