

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

**«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»**

Кафедра аналитической химии и химической экологии

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ СОРБЦИИ И КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ
НАРИНГЕНИНА НА НАНОЧАСТИЦАХ МАГНЕТИТА,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ ПОЛИЭТИЛЕНИМИНОМ**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 411 группы
Института химии
направления 04.03.01 «Химия»

Евсеевой Арины Ивановны

Научный руководитель

д.х.н., профессор

С.Н. Штыков

Зав. кафедрой

д.х.н., доцент

Т.Ю. Русанова

Саратов 2019

Содержание

Введение	3
1. Обзор литературы	4
1.1. Природные, биологические функции и физико-химические свойства нарингенина	4
1.2. Методы определения нарингенина	5
1.2.1. Спектрофотометрический метод	5
1.2.2. Хроматографические методы	5
1.2.3. Электрохимические методы	6
1.3. Методы выделения и концентрирования нарингенина	6
2. Экспериментальная часть	7
2.1. Методики проведения экспериментов	7
2.2. Константа диссоциации	9
2.3. Сорбция нарингенина наночастицами магнетита, модифицированными полиэтиленмином	11
2.3.1. Влияние pH	11
2.3.2. Влияние массы сорбента	12
2.3.3. Влияние времени	12
2.3.4. Влияние температуры	13
2.4. Десорбция нарингенина	14
2.4.1. Влияние природы элюента	14
2.4.2. Влияние объёма элюента	14
2.4.3. Влияние времени десорбции	15
2.4.4. Десорбция в присутствии других флавоноидов	15
2.5. Концентрирование нарингенина	16
Выводы	18
Список публикаций	19

Введение

Флавоноиды - фенольные соединения, содержащие в своей структуре фрагмент дифенилпропана (С6-С3-С6). Флавоноиды являются растительными метаболитами. В растениях и биологических жидкостях флавоноиды находятся, в основном, в виде разнообразных гликозидов.

Полезные свойства флавоноидов для организма человека состоят в их устойчивости к дегидратации в пищеварительном тракте, легкой всасываемости в кишечнике и сродстве к различным тканям организма, широком биологическом действии. Одной из наиболее важных функций флавоноидов является их участие в защите растений от окислительного стресса из-за выраженной антиоксидантной активности. В настоящее время большое внимание уделяется поиску источников фенольных соединений в связи с их выраженной антиоксидантной активностью.

Нарингенин является растительным флавоноидом, присутствующим в кожуре цитрусовых и придающим им горьковатый вкус. Нарингенин проявляет антиоксидантное действие, эффективно снижает уровень холестерина в плазме крови, блокирует проникновение вируса гепатита С в организм человека и в связи с этими свойствами входит в состав ряда лекарственных препаратов, используется в спортивных добавках. В связи с этим его содержание в пищевых и растительных объектах необходимо контролировать. Поскольку его содержание в некоторых объектах невелико, то перед определением требуется концентрирование нарингенина.

Одним из перспективных методов концентрирования является магнитная твердофазная экстракция. В связи с этим целью данной работы является разработка методики сорбции и концентрирования нарингенина на наночастицах магнетита, модифицированных полиэтиленгликолем.

1. Обзор литературы

Природные, биологические функции и физико-химические свойства нарингенина

Нарингенин (5,7,4'-триоксифлаванон) - это флаванон, тип флавоноидов, который оказывает биологически активное воздействие на здоровье человека в качестве антиоксиданта, акцептора свободных радикалов, противовоспалительного средства, стимулятора углеводного обмена и модулятора иммунной системы. Структурная формула нарингенина представлена на рисунке 1, а в таблице 1 указаны основные характеристики данного флавоноида.

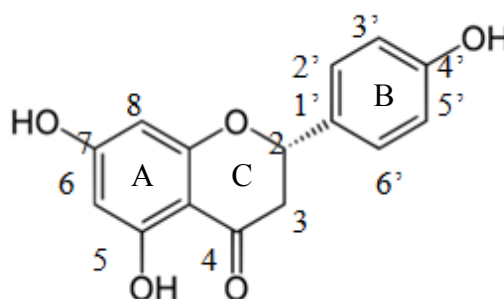


Рисунок 1 – Структурная формула нарингенина

Таблица 1- Некоторые характеристики нарингенина

Молекулярная формула	Молярная масса, г/моль	Внешний вид	Температура плавления, °С	Растворимость
$C_{15}H_{12}O_5$	272.25	Белый порошок	251	Растворим в спирте, эфире, бензоле, почти нерастворим в воде

Нарингенин имеет некоторые особенности в структуре по сравнению с другими флавоноидами (такими как рутин, кверцетин и т.д.). Отсутствие двойной связи C2-C3 в флавононах существенно уменьшает сопряжение по

сравнению с флавонолами. Это вызывает гипсохромный сдвиг, обусловленный потерей основной полосы поглощения вблизи видимой области. Таким образом, препарат бесцветен в растворе. Длина волны поглощения полифенолов зависит от количества и положения гидроксильных групп. При увеличении количества -ОН групп в В-кольце флавоноидов λ_{\max} смещается в батохромную область, что связано с мезомерным эффектом (+М) - эффект гидроксильной группы, который расширяет π -сопряжение в пограничной орбитали. Отсутствие сопряжения приводит к уменьшению длины волны основной полосы поглощения. Нарингенин показывает пики при $\lambda=322$ нм и $\lambda=225$ нм для В-кольца и А-кольца соответственно. Чем меньше свободных ОН- групп в структуре флавоноида, тем ниже его электронодонорная активность, склонность к окислению и ионизации.

Методы определения нарингенина

Спектрофотометрический метод Данный метод позволяет проводить количественное (реже качественное) определение вещества по его спектру поглощения. Это вариант молекулярно-абсорбционного спектрометрического анализа. Он является простым и удобным в использовании, не требует дорогостоящего оборудования.

Хроматографические методы Существует несколько видов хроматографического разделения и определения нарингенина в смеси с другими веществами методами ТСХ и ВЭЖХ. Один из них основан на различных скоростях распределения компонентов смеси в системе несмешивающихся и движущихся относительно друг друга фаз, другой - на различной сорбции компонентов смеси, которые впоследствии элюируют различными подвижными фазами. Данный способ позволяет определять нарингенин в смеси с другими флавоноидами, а также другими органическими веществами.

Электрохимические методы Электрохимические методы анализа основаны на измерении электрических показателей систем, связанных с составом анализируемого раствора. Для определения нарингенина используют вольтамперометрический метод или метод капиллярного электрофореза.

2. Экспериментальная часть

2.1. Методики проведения экспериментов

Синтез и модификация полиэтиленимином магнитных наночастиц

- Для получения наночастиц готовили раствор используемых реагентов: 1.30 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ и 0.4780 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ растворяли при комнатной температуре в 35 мл деионизованной воды. В реакционную камеру (химическая банка с вертикальной роторной мешалкой) помещали 25 мл 1 М раствора NaOH и 130 мл воды. Через камеру с раствором солей и реакционную камеру, содержащую гидроксид натрия, барботировали азот в течение 10 мин, чтобы удалить растворенный кислород при нагревании на водяной бане. При достижении температуры раствора 39,7 – 39,9°C сливали соли железа в реакционную камеру под давлением азота, после чего барботировали смесь в течение следующих 5 минут. Далее проводили модификацию, для чего добавляли в реакционную камеру, содержащую немодифицированные наночастицы магнетита, 13.5 мл раствора полиэтиленимина с концентрацией 20 мг/мл и перемешивали полученный раствор в течение 20 мин. Полученный черный осадок наночастиц магнетита осаждали с помощью постоянного магнита и сливали надосадочную жидкость. Далее промывали полученный осадок деионизированной водой 3 раза. Полученный коллоидный раствор магнитных наночастиц помещали в пластиковую пробирку с герметичной крышкой и хранили при комнатной температуре. Все процессы смешивания реагентов и промывки проводили в атмосфере азота, регулируя давление газа в каналах системой клапанов.

Сорбция

- В эппендорфе объемом 5 мл смешивают 0.2 мл флавоноида ($C_{\text{исх}} = 2 \cdot 10^{-4}$ М), 2.8 мл ацетатно-аммиачного буфера (pH 9), и 1.0 мл магнитных наночастиц,

модифицированных полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ) (13.0 мг). Раствор флавоноида с сорбентом подвергают механическому перемешиванию в течение 10 мин, после чего ставят на постоянный магнит и отбирают надосадочную жидкость в пробирку на 1.5 мл и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин, после снимают спектр поглощения надосадочной жидкости в диапазоне длин волн 250-500 нм.

Десорбция

- В эппендорфе объёмом 5 мл смешивают 0.2 мл флавоноида ($C_{исх}=2 \cdot 10^{-4}$ М), 1 мл ацетатно-аммиачного буфера (рН 9), 1 мл магнитных наночастиц, модифицированных полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ) (13.0 мг) и 1.8 мл дистиллированной воды. Раствор флавоноида с сорбентом подвергают механическому перемешиванию в течение 10 мин, ставят на постоянный магнит и отбирают надосадочную жидкость в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл. Для отделения остатков ПЭИ и оставшихся наночастиц магнетита проводят центрифугирование надосадочной жидкости при 15000 об/мин в течение 10 мин, после чего снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-500 нм.
- К сорбенту, содержащему аналит, добавляют 1.0 мл элюента (Этанол:1% уксусная кислота/ Ацетонитрил:1% уксусная кислота) и перемешивают на УЗ в течение 30 минут, после чего ставят на постоянный магнит и отбирают 1.0 мл элюата в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин для отделения остаточного коллоидного раствора магнитных наночастиц. После чего снимают спектр поглощения в диапазоне длин волн 250-500 нм.
- Десорбцию в *присутствии всех флавоноидов* проводили по следующей схеме: в эппендорф на 5 мл приливают по 0.2 мл растворов флавоноидов (кверцетин, рутин, морин, мирицетин, нарингенин ($C_{исх} = 2 \cdot 10^{-4}$ М), 1.0 мл ацетатно-аммиачного буфера (рН 9), 1.0 мл магнитных наночастиц, модифицированных полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ) (13.0 мг) и 1.0 мл дистиллированной воды (для одинаковой ионной силы). Смесь флавоноидов с

сорбентом механически перемешивают в течение 10 мин, ставят на постоянный магнит и отбирают надосадочную жидкость в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл и центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин для отделения остаточного коллоидного раствора магнитных наночастиц. К сухому сорбенту, содержащему аналит, прибавляют 1.0 мл элюента (Этанол:1% уксусная кислота) и перемешивают УЗ способом в течение 20 мин, после чего ставят на постоянный магнит и отбирают 1.0 мл элюата в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл. Для отделения остатков ПЭИ и оставшихся наночастиц магнетита, элюат центрифугируют при 15000 об/мин в течение 10 мин, после чего снимают спектры поглощения.

Концентрирование

В склянки на 25, 50 и 100 мл последовательно добавляли 1.0 мл магнитных наночастиц, модифицированных полиэтиленмином (МНЧ@ПЭИ) (13 мг), 5.0 мл (для 25 мл)/ 10.0 мл (для 50 мл и 100 мл) ацетатно-аммиачного (рН 9), 1.0 мл нарингенина ($C_{исх} = 100$ мкг/мл) и доводили до 25/ 50/ 100 мл дистиллированной водой. Полученную смесь перемешивают на УЗ в течение 10 мин при $T = 25^{\circ}C$. По истечению указанного времени, склянки ставили на постоянный магнит и после осаждения магнетита, отбирали 1.0 мл надосадочной жидкости в пробирку для центрифугирования на 1.5 мл, которую помещали в центрифугу на 15 мин при 15000 об/мин.

2.2. Константа диссоциации

Кислотно-основные свойства нарингенина изучали в диапазоне рН 3.0 – 11.0, используя ацетатно-аммиачные буферные растворы (ААБ). Значения рН контролировали с помощью стеклянного электрода ЭСК-10601 на рН метре Mettler Toledo рН-EL2. Электронные спектры флавоноидов регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония).

Депротонирование ОН-групп происходит в последовательности $7 > 4' > 5$, первая константа диссоциации равна 7.47 ± 0.01 . В связи с этим, в исследованном интервале рН (4,6 - 7,4) оценивали изменение спектров поглощения, по которым рассчитывали значение величины pK_1 . Спектры

поглощения молекулярной и диссоциированной форм нарингенина и влияние на них времени в данном интервале рН представлены на рисунке 2 и рисунке 3. Из рисунка 3 видно, что в течение получаса практически не происходит уменьшения оптической плотности (<1%), что говорит об устойчивости флавоноида к растворенному кислороду. Таким образом, при определении pK_1 можно не учитывать влияние окисления на расчет константы диссоциации.

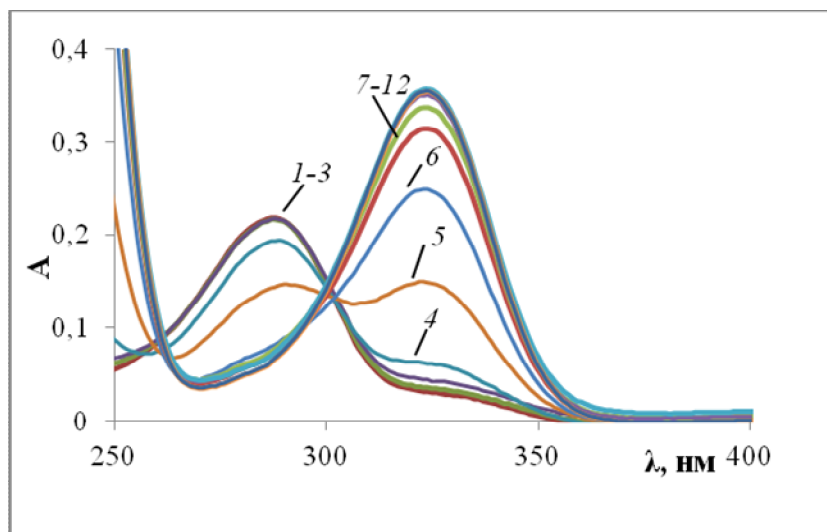


Рисунок 2 - Влияние кислотности среды на спектр поглощения нарингенина. рН 3-5 при $\lambda=287$ нм и рН 6 при $\lambda = 325$ нм. ААБ. $C_{\text{НАР}} = 1 \cdot 10^{-5}$ М. рН: (1) 4.6; (2) 4.8; (3) 5.0; (4) 5.3; (5) 5.5; (6) 5.8; (7) 6.2; (8) 6.4; (9) 6.6; (10) 7.0; (11) 7.2; (12) 7.4

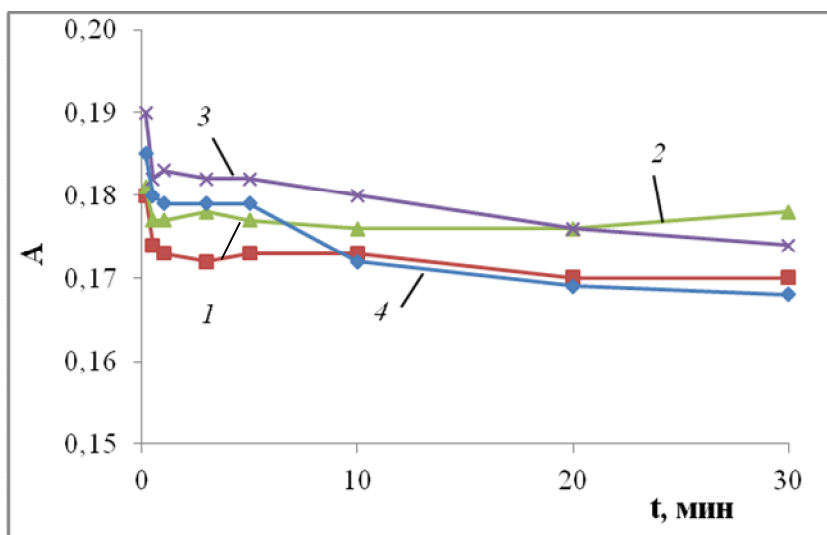


Рисунок 3 - Изменение оптической плотности нарингенина от времени. рН 3-5 при $\lambda=287$ нм и рН 6 при $\lambda = 325$ нм. ААБ. $C_{\text{НАР}} = 1 \cdot 10^{-5}$ М. рН: (1) 3; (2) 4; (3) 5; (4) 6

Константа диссоциации 7-ОН группы составляет 5.7 ± 0.5 .

2.3. Сорбция нарингенина наночастицами магнетита, модифицированными полиэтиленимином

2.3.1. Влияние pH

pH раствора влияет на эффективность извлечения, т.к. влияет на величину заряда поверхности сорбента и на кислотно-основные свойства сорбата. Величину pH регулировали в диапазоне 6 - 11. Самая высокая степень извлечения для нарингенина была получена при pH 9 (табл. 2), поэтому это значение выбрано для дальнейшего эксперимента.

Таблица 2 - Зависимость степени извлечения нарингенина из исходного раствора магнитными наночастицами, модифицированными полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ), от pH. $C_{\text{НАР}} = 10^{-5} \text{М}$. $V_{\text{сорб}} = 1 \text{ мл}$. $m_{\text{сорб}} = 13 \text{ мг}$. $t_{\text{сорб}} = 10 \text{ мин}$. ААБ. $V_{\text{общ}} = 4 \text{ мл}$

pH	6	7	8	9	10	11
R _{ср} , %	34 ± 8	35 ± 13	81 ± 8	90 ± 3	78 ± 9	29 ± 21

2.3.2. Влияние массы сорбента

В данной работе варьировалось количество добавляемого сорбента. Оптимальной массой является 13.0 мг (табл.3).

Таблица 3 - Зависимость степени извлечения нарингенина из исходного раствора магнитными наночастицами, модифицированными полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ), от массы сорбента. $C_{\text{НАР}} = 10^{-5} \text{М}$. $t_{\text{сорб}} = 10 \text{ мин}$. ААБ. pH 9. $V_{\text{общ}} = 4 \text{ мл}$

m _{сорб} , мг	5	7	10	13	15
R _{ср} , %	65 ± 5	77 ± 3	86 ± 4	93 ± 5	92 ± 3

2.3.3. Влияние времени

Растворы перемешивали механическим способом в интервале 1-30 мин. Согласно полученным данным (табл.4), оптимальным временем сорбции является 1 мин.

Таблица 4 - Зависимость степени извлечения нарингенина на магнитных наночастицах, модифицированных полиэтиленимином (МНЧ@ПЭИ), от времени сорбции, механическое перемешивание. $C_{\text{НАР}} = 10^{-5}$ М. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $m_{\text{сорб}} = 13$ мг. ААБ. pH 9

t, мин	1	3	5	10	20	30
R _{ср} , %	97 ± 1	97 ± 1	96 ± 2	96 ± 1	96 ± 4	97 ± 2

2.3.4. Влияние температуры

При увеличении температуры сорбции наблюдалось появление и увеличение интенсивности окраски растворов в видимой области (рис. 4). Это могло быть связано с образованием комплекса нарингенина с Fe(II) (рис. 5).

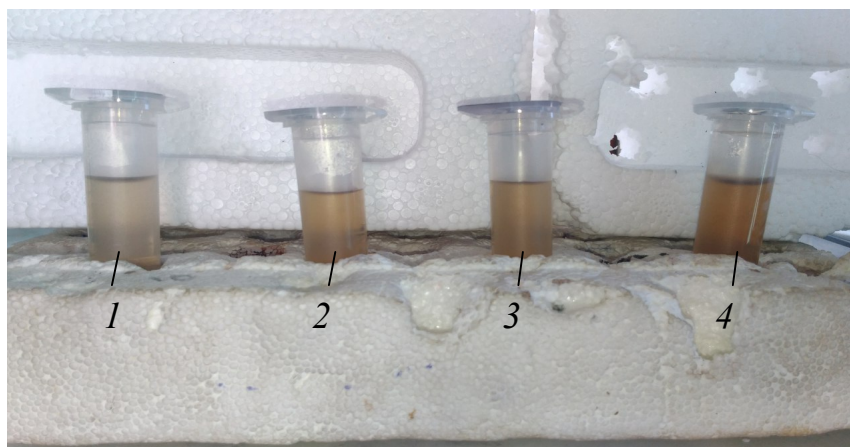


Рисунок 4 - Зависимость интенсивности окраски растворов после сорбции от температуры. $C_{\text{НАР}} = 10^{-5}$ М. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $m_{\text{сорб}} = 13$ мг. $t_{\text{сорб}} = 10$ мин. ААБ. pH 9. T, °C: (1) 20; (2) 30; (3) 40; (4) 50

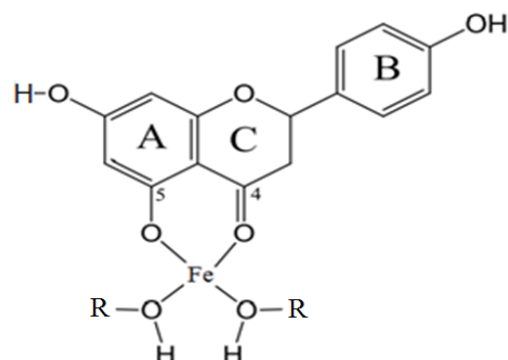


Рисунок 5 - Вероятная структура комплекса нарингенина с железом(II) Соотношение нарингенин: с Fe(II)= 1:1. Нарингенин растворен в этаноле, поэтому в состав комплекса могут входить молекулы воды и этанола.

Установлено, что в кислотной области рН, в зависимости от молярного соотношения флаванон/Fe(II), наблюдаются изменения абсорбции в видимой области спектра: появляются новые полосы поглощения, максимумы которых расположены вблизи 475 нм для нарингенина. Появление новых полос поглощения, не характерных для свободных флавоноидов, свидетельствует о формировании в растворе комплексов.

2.4. Десорбция нарингенина

2.4.1. Влияние природы элюента

В качестве элюентов взяты растворы этанол:1% уксусная кислота и ацетонитрил:1% уксусная кислота. Оптимальным элюентом является раствор этанол:1% уксусная кислота (табл.5).

Таблица 5- Зависимость степени десорбции нарингенина от природы элюента.

$C_{\text{НАР}} = 10^{-5}\text{М}$. $V_{\text{сорб}} = 1\text{ мл}$. $m_{\text{сорб}} = 13\text{ мг}$. $t_{\text{десорб}} = 20\text{ мин}$. $V_{\text{эл}} = 1\text{ мл}$

Элюент	этанол:1% уксусная кислота	ацетонитрил:1% уксусная кислота
$R_{\text{ср}}, \%$	88 ± 1	85 ± 5

2.4.2. Влияние объёма элюента

Объём элюента варьировали в пределах 1-5 мл. Оптимальным объёмом является 4 мл раствора этанол:1%уксусная кислота (табл. 6).

Таблица 6 - Зависимость степени десорбции нарингенина от объема элюента.
 $C_{\text{НАР}} = 10^{-5}$ М. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $C_{\text{сорб}} = 13.0$ мг. Этанол : 1%уксусная кислота. $t_{\text{десорб}} = 20$ мин. $V_{\text{эл}}$, мл: 1.0; 2.0; 3.0; 4.0; 5.0

V, мл	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
R_{ср}, %	35 ± 6	63 ± 5	76 ± 3	85 ± 3	84 ± 2

2.4.3. Влияние времени десорбции

Перемешивание анализируемых растворов механическим способом проводили в интервале 1-30 мин. Оптимальным временем десорбции является 30 мин (табл. 7).

Таблица 7- Зависимость степени десорбции нарингенина после сорбции на магнитных наночастицах, модифицированных полиэтиленмином (МНЧ@ПЭИ), от времени, механическое перемешивание. $C_{\text{НАР}} = 10^{-5}$ М. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $m_{\text{сорб}} = 13.0$ мг. этанол:1%уксусная кислота. t , мин: 1; 5; 10; 15; 20; 30

t, мин	1	5	10	15	20	30
R_{ср}, %	60 ± 2	70 ± 3	75 ± 1	85 ± 2	87 ± 2	98 ± 2

2.4.4. Десорбция в присутствии других флавоноидов

Изучена десорбция нарингенина в присутствии других флавоноидов (кверцетин, рутин, морин, мирицетин). Результаты эксперимента представлены на рисунке 6. Наибольшая степень десорбции наблюдается у нарингенина. Исходя из этого проверено влияние остальных флавоноидов на процесс десорбции нарингенина. Сняты спектры поглощения. Из них следует, что присутствие других флавоноидов не оказывает существенного влияния на концентрирование нарингенина.

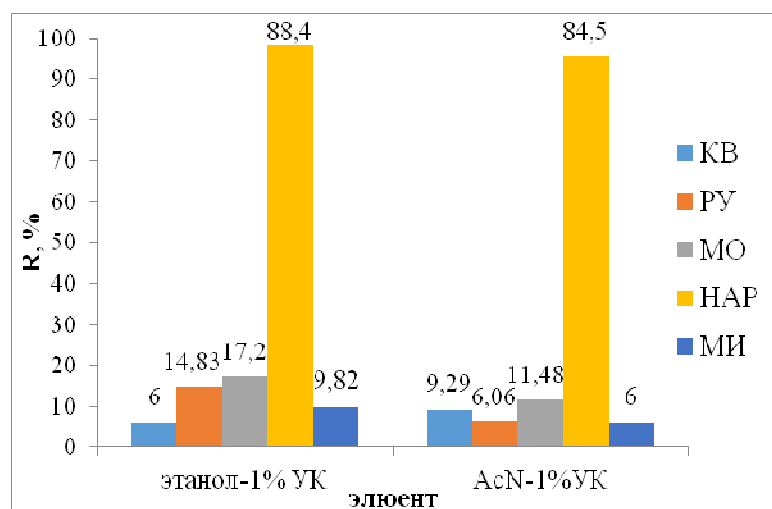


Рисунок 6 - Диаграмма распределения степени десорбции флавоноидов от природы элюента. $C_{\text{фл}} = 10^{-5}$ М. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $m_{\text{сорб}} = 13$ мг. $t_{\text{десорб}} = 20$ мин. $V_{\text{эл}} = 1$ мл

2.5. Концентрирование нарингенина

Результаты спектрофотометрического определения остаточной концентрации нарингенина и расчет коэффициента концентрирования представлены в таблице 8.

Таблица 8 - Результаты эксперимента. $V_{\text{сорб}} = 1$ мл. $m_{\text{сорб}} = 13$ мг. $m_{\text{р-ра}} = 25/50/100$ г. $t = 10$ мин

$V_{\text{общ}}$, мл	$C_{\text{нар}}$, мкг/мл	$C_{\text{исх}}$, мкг/мл	$R_{\text{нар}}$, %	K
25	0.30	4	92	1778 ± 1
50	0.37	2	81	3134 ± 1
100	0.16	1	84	6461 ± 1

Выводы

1. Проведен анализ данных литературы по биологически активным свойствам нарингенина, методам его выделения, концентрирования и определения в различных объектах. Показано, что основным методом разделения и определения является высокоэффективная жидкостная хроматография. Методы сорбции и концентрирования нарингенина отсутствуют. Экспериментально определена величина pK нарингенина.

3. Синтезированы наночастицы магнетита, модифицированные полиэтиленгликолем со средним размером 8 ± 2 нм. Изучено влияние pH, массы сорбента, времени перемешивания и температуры на сорбцию нарингенина. Показано, что степень извлечения в интервале $(97 \pm 1)\%$ достигается при сорбции нарингенина в интервале концентраций $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-5}$ М при pH 9, массы сорбента 13 мг, времени сорбции 1 мин при температуре 20-25°C. Сорбция на магнитных наночастицах, модифицированных ПЭГ позволяет проводить концентрирование нарингенина из объемов 25, 50 и 100 мл с коэффициентами концентрирования, изменяющимися в интервале $(1.8 - 6.5) \cdot 10^3$.
4. Изучено влияние природы элюента на десорбцию нарингенина и показано, что количественная десорбция $(98 \pm 2)\%$ достигается при использовании смеси этанола с 1%-ной уксусной кислотой, времени перемешивания 30 мин и объеме элюента 4 мл. Показано, что в оптимальных условиях сорбции и десорбции возможно селективное фотометрическое определение нарингенина в присутствии кверцетина, морины, рутина и мирицетина.