
ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПРОЦЕССОВ
РАЗДЕЛЕНИЯ. ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК 544.723.2

**СОПОСТАВЛЕНИЕ ДВУХ ВАРИАНТОВ КАРТ РАЗДЕЛЕНИЯ
 В ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ**
© 2022 г. В. И. Дейнека^{а,*}, Е. Ю. Олейниц^а, И. П. Блинова^а, Л. А. Дейнека^а^аБелгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, Россия

*e-mail: deineka@bsu.edu.ru

Поступила в редакцию 26.09.2021 г.

После доработки 15.11.2021 г.

Принята к публикации 15.02.2022 г.

Впервые сопоставлены два типа карт разделения¹, основанные на 1) зависимости логарифма фактора удерживания от объемной доли органического модификатора и на 2) методе анализа относительного удерживания; оба типа карт согласованы между собой. Показано, что для сопоставления энергий взаимодействия сорбатов сложной смеси необходимо использовать параметры квадратичных уравнений зависимости удерживания от объемной доли органического модификатора, экстраполированные на нулевое содержание органического модификатора в подвижной фазе. Установлено, что для сопоставления энергий взаимодействия сорбатов с органическими модификаторами подвижных фаз удобны карты разделения второго типа с линейными линиями трендов. Показаны дополнительные возможности применения этого метода в специальных случаях. Сделан вывод, что возможна замена экологически вредного ацетонитрила на более благоприятный ацетон для разделения 3-глюкозидов основных шести антоцианидинов.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, карты разделения двух типов, согласованность, физический смысл параметров аппроксимации, “зеленая” хроматография

DOI: 10.31857/S0044453722080076

В настоящее время обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) – наиболее часто используемый хроматографический метод [1]. При этом использование метода осложнено существованием более 600 марок коммерчески доступных стационарных фаз, свойства которых зависят от технологии приготовления с некоторыми различиями даже между колонками одной марки, но разных партий. Соответственно, возникают проблемы сопоставления этих фаз для определения возможности замены или при оптимизации селективности разделения сложных смесей сорбатов.

Под селективностью разделения пары соединений в хроматографии подразумевается отношение исправленных времен, исправленных объемов или факторов удерживания сорбатов i и j [2]:

$$\alpha = \frac{V'_R(j)}{V'_R(i)} = \frac{t'_R(j)}{t'_R(i)} = \frac{k_R(j)}{k_R(i)}, \quad (1)$$

если $k_R(j) > k_R(i)$,

где α – селективность (или фактор разделения), V'_R и t'_R – исправленные объемы или времена удерживания, а $k_R(i)$ или $k_R(j)$ – факторы удерживания, соответственно, компонентов i и j .

Но селективность трудно признать надежной характеристикой, поскольку этот параметр обычно зависит от состава подвижной фазы даже для данных сорбатов и данной стационарной фазы. При этом нередки случаи, при которых смена соотношения компонентов подвижной фазы приводит к инверсии порядка элюирования некоторых пар сорбатов. Поэтому сопоставление селективности разделения сорбатов в одном или в ограниченном числе составов подвижных фаз даже выбранной системы на различных стационарных фазах в общем случае бесперспективно. Поэтому, например, неточно утверждение о том, что дигликозиды антоцианидинов удерживаются в условиях ОФ ВЭЖХ слабее, чем моногликозиды [3].

Используемый в настоящее время метод, основанный на линейных соотношениях энергий сольватации (LSER, [1]) в широком диапазоне составов подвижных фаз, требует значительных временных затрат. При этом различия между экспериментальными и расчетными значениями су-

¹ Данный термин использовался также в третьем издании книги: Снайдер Ллойд Р., Киркленд Джозеф Дж., Долан Джон У. Введение в современную жидкостную хроматографию. М.: Изд-во АО “РИЦ “Техносфера”, 2020.

Таблица 1. Зависимость удерживания четырех антоцианов от состава подвижной фазы системы CH_3CN – HCOOH (10 об. %)–вода

№	Сорбат	Параметры уравнения (3)			R^2
		a_0	a_1	a_2	
1	Дельфинидин-3-глюкозид, Dp3G	1.3628	–0.1878	0.0028	0.99995
2	Дельфинидин-3-рутинозид, Dp3R	1.6524	–0.2169	0.0035	0.99996
3	Цианидин-3-глюкозид, Cy3G	1.6365	–0.1942	0.0036	0.99995
4	Цианидин-3-рутинозид, Cy3R	1.9659	–0.2258	0.0044	0.99996

ществены даже для сорбатов “тренировочного ряда” [4].

С другой стороны, можно учесть, что изменение удерживания сорбатов с ростом концентрации органического модификатора подвижной фазы в узком диапазоне концентраций модификатора обычно описывается линейным уравнением Снайдера [5]:

$$\lg k(i) = a_0(i) - a_1\varphi(\text{ОМ}), \quad (2)$$

где логарифм фактора удерживания сорбата i линейно зависит от φ (объемной доли органического модификатора (ОМ)), а $a_0(i)$ – асимптотическая характеристика – логарифм фактора удерживания сорбата в подвижных фазах с $\varphi = 0$. Однако в широком диапазоне составов подвижных фаз экспериментальные данные лучше описываются квадратичным уравнением [6]:

$$\lg k(i) = a_0 - a_1\varphi(\text{ОМ}) + a_2\varphi^2(\text{ОМ}). \quad (3)$$

Параметры уравнения (3) для четырех антоцианов приведены в табл. 1.

С другой стороны, в некотором диапазоне составов подвижных фаз по модели вытеснения [7] при сорбции сорбата на стационарной фазе высвобождается n молей органического модификатора по уравнению:

$$\lg k(i) = a_i - n(i) \lg c(\text{ОМ}). \quad (4)$$

Такое же уравнение описывает удерживание и вещества, принимаемого в качестве вещества сравнения:

$$\lg k(\text{R}) = a_R - n(\text{R}) \lg c(\text{ОМ}). \quad (5)$$

Исключая концентрацию ОМ из уравнений (4) и (5), получаем уравнение относительного удерживания:

$$\lg k(i) = \frac{n(i)}{n(\text{R})} \lg k(\text{R}) + a_i - \frac{n(i)}{n(\text{R})} a_R, \quad (6)$$

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \lg k(\text{R}). \quad (7)$$

И хотя величины чисел высвобождения молекул органического модификатора не постоянны во всем диапазоне составов подвижных фаз, их соотношение (a), как показывает эксперимент, остается постоянным в широком диапазоне составов.

В настоящей работе предлагается использование карт разделения, представляющих собой графическое изображение зависимости логарифмов факторов удерживания группы разделяемых веществ от состава подвижной фазы (метод 1) или от удерживания одного из этих веществ (метод 2), определенных для различных составов подвижных фаз выбранной элюентной системы. Впервые оценивается согласованность обоих типов подвижных фаз и предлагается способ сопоставления селективности выбранной стационарной фазы в различных подвижных фазах.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использовали экстракты антоцианов из коллекции лаборатории, полученные настаиванием растительных материалов в 0.1 М водном растворе соляной кислоты при комнатной температуре вне доступа прямого солнечного света. Экстракты хранили в морозильной камере в пластиковой посуде. Разделение антоцианов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматограммы записывали при 520 нм. Использовали хроматографическую колонку: 150 × 4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм); температура термостата колонок 40°C. Мертвое время определяли по шавелевой кислоте. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали с использованием программы ChemStation.

Для сокращенного обозначения антоцианов в работе использовали: Dp – дельфинидин (3,5,7,3',4',5'-гексагидроксофлавилий), Cy – цианидин (3,5,7,3',4'-пентагидроксофлавилий), Pt – петунидин (3,5,7,3',4'-пентагидроксо-5'-метокси-флавилий), Pn – пеонидин (3,5,7,4'-тетрагидрок-

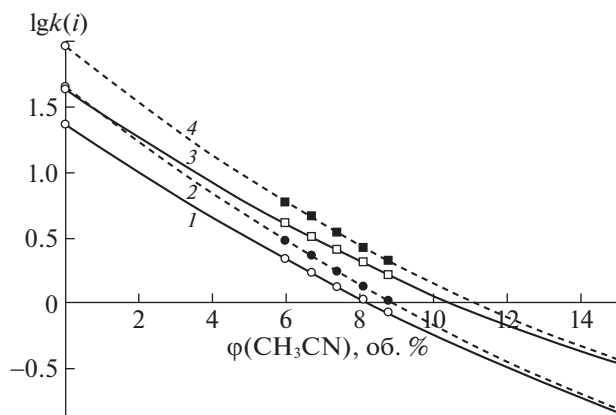


Рис. 1. Карта разделения первого типа, основанная на уравнении зависимости логарифма фактора удерживания от объемной доли органического модификатора; вещества: 1 – Dp3G, 2 – Dp3R, 3 – Cy3G, 4 – Cy3R; элюентная система: CH₃CN–10 об. % HCOOH–вода, 40°C.

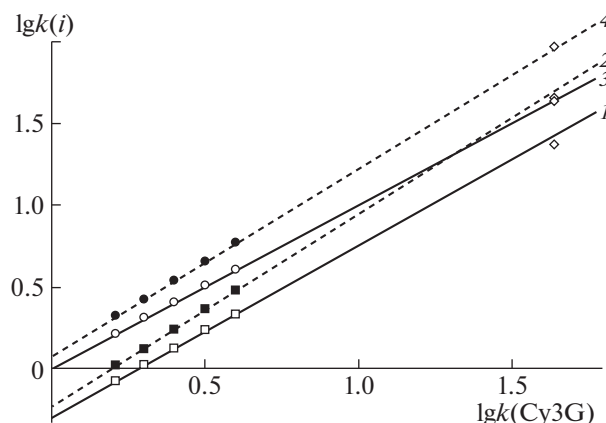


Рис. 2. Карта разделения второго типа, основанная на уравнении относительного удерживания; вещества: 1 – Dp3G, 2 – Dp3R, 3 – Cy3G, 4 – Cy3R; элюентная система: CH₃CN–10 об. % HCOOH–вода, 40°C.

со-3'-метоксифлавилий), Mv — мальвидин (3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',5'-диметоксифлавилий). Глюкозиды обозначали буквой G, а рутинозиды (рамнозилглюкозиды) — буквой R.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Обработка экспериментальных данных по уравнению (3) позволяет построить первый тип карт разделения для данной стационарной фазы и выбранной элюентной системы. Так, например, для четырех антоцианов — 3-глюкозидов и 3-рутинозидов (рамнозилглюкозидов) дельфинидина и цианидина (Dp3G, Dp3R, Cy3G и Cy3R) плодов черной смородины такая карта разделения представлена на рис. 1.

Важное свойство этого способа анализа удерживания состоит в том, что предполагается возможность экстраполяции удерживания сорбатов на $\phi = 0$ в подвижной фазе. Впрочем, получаемые при этом параметры весьма условны, поскольку при малых содержаниях органического модификатора многие стационарные фазы C18 подвержены коллапсу фаз [8]. Следовательно, строгая экспериментальная проверка корректности экстраполяционных результатов далеко не всегда возможна. Тем не менее, эти значения уже не зависят от концентрации и типа органического модификатора, т.е. зависят только от свойств самой стационарной фазы. Поэтому информационно важный порядок удерживания группы сорбатов, зависящий только от взаимодействия сорбата со стационарной фазой (из водного раствора кис-

лотного модификатора) необходимо строить по экстраполяционным логарифмам удерживания именно в отсутствие органического модификатора в подвижной фазе. В нашем случае:

$$t_{\text{R}}(\text{Dp3G})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Cy3G})_{\text{aq}} < \\ < t_{\text{R}}(\text{Dp3R})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Cy3R})_{\text{aq}}.$$

Именно указанный порядок следует использовать для сопоставления свойств различных стационарных фаз относительно выбранных сорбатов. При этом тип элюентной системы, т.е. выбор органического модификатора при получении исходных данных, уже не имеет значения.

Изменение указанного порядка в подвижных фазах, содержащих органический модификатор (например, ацетонитрил), зависит от энергии взаимодействия этого сорбата и с подвижной, и со стационарной фазой, которая также насыщается органическим модификатором (ацетонитрилом). При добавках ацетонитрила в подвижную фазу падение удерживания обоих 3-рутинозидов происходит быстрее, чем 3-глюкозидов, поэтому порядок элюирования быстро изменится на другой:

$$t_{\text{R}}(\text{Dp3G})_i < t_{\text{R}}(\text{Dp3R})_i < t_{\text{R}}(\text{Cy3G})_i < t_{\text{R}}(\text{Cy3R})_i.$$

Именно такой порядок элюирования данных четырех сорбатов наблюдается в обычных составах подвижных фаз практически во всех опубликованных работах по разделению антоцианов плодов черной смородины в реально используемых составах подвижных фаз, например, в работах [9–14].

Таблица 2. Относительное удерживание трех антоцианов при использовании цианидин-3-глюкозида в качестве вещества сравнения в подвижной фазе системы CH_3CN – HCOOH (10 об. %)–вода

№	Сорбат	Параметры уравнения (7)			a_0^*/a_0^{**}
		a_0	a_1	R^2	
1	Дельфинидин-3-глюкозид, Dp3G	–0.294	1.017	0.99996	1.363/1.419
2	Дельфинидин-3-рутинозид, Dp3R	–0.229	1.175	0.99998	1.652/1.694
3	Цианидин-3-глюкозид, Cy3G	0	1	–	1.637/1.637
4	Цианидин-3-рутинозид, Cy3R	0.081	1.144	1.00000	1.966/1.953

Примечание: a_0^* – из уравнений (3); a_0^{**} – расчет по уравнениям (7).

В общем случае изменений порядков элюирования двух (и более) веществ может быть несколько, но для определения каждого из них необходимо указать только стартовый порядок и зависимость удерживания каждого компонента от состава подвижной фазы. Для учета второй характеристики квадратичная зависимость по уравнению (3) не удобна. Для этого лучше составить карту разделения второго типа – по уравнению (7), с сорбатом сравнения Cy3G (рис. 2).

Отметим, что при построении карты селективности можно не обращать внимания на точность приготовления подвижной фазы (включая смену партии растворителя), и для построения карты достаточно использования двух различных составов подвижных фаз, что существенно сокращает затраты времени.

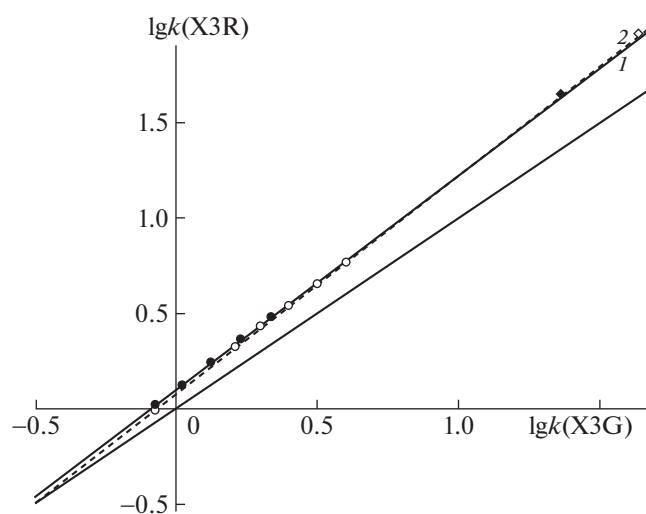


Рис. 3. Корреляции между величинами удерживания 3-рутинозидов и 3-глюкозидов дельфинидина и цианидина для элюентной системы CH_3CN –10 об. % HCOOH –вода; линии 1 – Dp3R vs Dp3G, 2 – Cy3R vs. Cy3G.

На рис. 2, кроме точек, построенных по тем же экспериментальным данным, что и при построении карты разделения первого типа, нанесены точки (ромбы в правой верхней части рисунка) с использованием экстраполяционных величин a_0 , найденных по уравнению (3). Близость расположения этих точек к прямым линиям трендов по уравнению (7), которую можно оценить и по данным, приведенным в табл. 2, свидетельствует о согласованности двух типов карт разделения.

При этом второй метод позволяет построить еще один вид карты разделения второго типа, применив два различных образца сравнения – Cy3G для Cy3R и Dp3G для Dp3R, (рис. 3), в том же диапазоне составов подвижной фазы. Эта карта свидетельствует о том, что изменение удерживания 3-глюкозидов при переходе к 3-рутинозидам (присоединением рамнозильного радикала к существующему глюкозидному) для двух антоцианидинов (дельфинидина и цианидина) описывается близкими зависимостями. Это важно при идентификации пиков на хроматограммах при ограниченном наборе стандартных соединений. Более того, для одного и того же состава подвижной фазы и одной и той же стационарной фазы зависимость удерживания 3-рутинозидов от удерживания 3-глюкозидов пяти антоцианидинов также описывается линейной зависимостью [15]. Наконец, известен еще один вариант использования сравнительных диаграмм для хроматограмм, записанных при одном и том же составе подвижных фаз, как прямой перенос метода сходственных рядов, предложенного М.Х. Карапетянцем на удерживание однотипных производных различных оснований, например, антоцианидинов [16].

Применим предложенные карты разделения для сопоставления удерживания изомерных 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов (дельфинидина, цианидина, петинидина, пеларгонидина, пеонидина и мальвидина) в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Разделение этих ан-

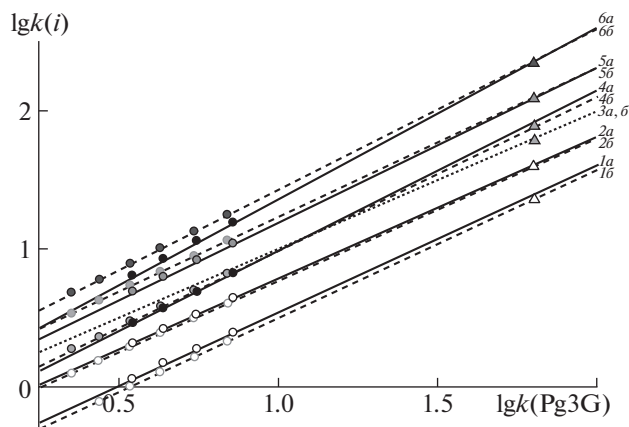


Рис. 4. Карта разделения второго типа для 3-глюкозидов основных природных антоцианидинов в двух элюентных системах: CH_3COCH_3 –10 об. % HCOOH –вода (с индексами *a*) и CH_3CN –10 об. % HCOOH –вода (с индексами *b*); вещества: 1 – Dp3G, 2 – Cy3G, 3 – Pg3G, 4 – Pt3G, 5 – Pn3G, 6 – Mv3G.

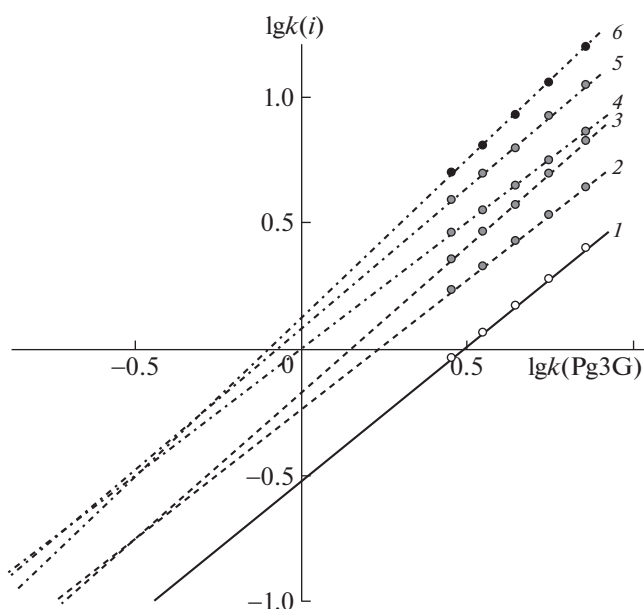


Рис. 5. Группировка линий трендов по числу гидроксильных групп в структуре антоцианов; элюентная система: CH_3COCH_3 –10 об. % HCOOH –вода; нумерацию сорбатов см. рис. 4.

тоцианов на колонке Symmetry™ C18 в двух элюентных системах – на основе традиционного ацетонитрила и при его замене на “зеленый” (т.е. экологически более благоприятный ацетон) при подкислении подвижных фаз муравьиной кислотой (10 об. %), представлено на рис. 4.

При линейной аппроксимации на данном рисунке для одинаковых антоцианов в разных элюентных системах эти линии имеют тенденцию к

пересечению в правой части карты разделения. При этом линии для мальвидина и пеонидина пересекаются в точках с одной и той же абсциссой, что можно интерпретировать как достижение составов с нулевым содержанием органического модификатора с эквивалентными свойствами подвижных фаз обеих элюентных систем. Для этих веществ и Pg3G координаты точек пересечения совпадают с полученными по уравнению (3) в элюентах систем: ацетон–10 об. % муравьиной кислоты–вода и ацетонитрил–10 об. % муравьиной кислоты–вода, как предполагалось выше. Соответственно, в обеих элюентных системах порядок энергии взаимодействия антоцианов с C18-фазой становится одинаковым вследствие равенства нулю концентраций органических модификаторов для подвижных фаз в этом случае:

$$t_{\text{R}}(\text{Dp3G})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Cy3G})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Pg3G})_{\text{aq}} < \\ < t_{\text{R}}(\text{Pt3G})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Pn3G})_{\text{aq}} < t_{\text{R}}(\text{Mv3G})_{\text{aq}},$$

и этот порядок в реальных составах подвижных фаз включает только одну инверсию:

$$t_{\text{R}}(\text{Dp3G}) < t_{\text{R}}(\text{Cy3G}) < t_{\text{R}}(\text{Pt3G}) < \\ < t_{\text{R}}(\text{Pg3G}) < t_{\text{R}}(\text{Pn3G}) < t_{\text{R}}(\text{Mv3G}).$$

Наконец, при экстраполяции удерживания антоцианов на подвижные фазы с большой элюирующей силой (перемещающаяся влево на карте разделения) прямые линии аппроксимации антоцианов группируются по числу OH-групп в аликоне в элюентах на основе ацетона (рис. 5), как и в элюентах на основе ацетонитрила [17].

Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований “Аспиранты”, номер 20-33-90031.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Žuvela P., Skoczylas M., Jay Liu J. et al. // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 3674.
2. Ettre L.S. // Pure Appl. Chem. 1993. V. 65. P. 819.
3. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. // Curr. Anal. Chem. 2008. V. 4. P. 75.
4. Jirkl Š., Machovcová M., Ševčík J.G.K. // Acta Chromatographica. 2016. V. 28. P. 59.
5. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. // J. Chromatogr. A. 1979. V. 165. P. 3.
6. Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., Tijssen R. et al. // Ibid. 1978. V. 149. P. 519.
7. Murakami F. // J. Chromatogr. 1979. V. 178. P. 393.
8. Walter T.H., Iraneta P., Capparella M. // J. Chromatogr. A. 2005. V. 1075. P. 177.

9. *Nielsen I.L.F., Haren G.R., Magnussen E.L. et al.* // J. Agric. Food Chem. 2003. V. 51. P. 5861.
10. *Šimerdová B., Bobříková M., Lhotská I. et al.* // Foods. 2021. V. 10. 1745.
11. *Bordonaba J.G., Crespo P., Terry L.A.* // Food Chem. 2019. V. 129. P. 1265.
12. *Дейнека Л.А., Шапошник Е.И., Гостищев Д.А. и др.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2009. Т. 9. № 4. С. 529.
13. *Slimestad R., Solheim H.* // J. Agric. Food Chem. 2002. V. 50. P. 328.
14. *Jakobek L., Seruga M., Medvidović-Kosanović M. et al.* // Deutsche Lebensmittel-Rundschau. 2007. V. 103. P. 58.
15. *Дейнека В.И., Кульченко Я.Ю., Олейниц Е.Ю. и др.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2020. Т. 20. № 2. С. 150.
16. *Дейнека В.И., Кульченко Я.Ю., Чулков А.Н. и др.* // Журн. физ. химии. 2019. Т. 93. № 5. С. 790.
17. *Дейнека В.И., Олейниц Е.Ю., Саласина Я.Ю. и др.* // Там же. 2021. Т. 95. С. 1278.