

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

УДК 544.723.2:543.544

СТРОЕНИЕ ПОВЕРХНОСТИ “МОНОМЕРНЫХ” И “ПОЛИМЕРНЫХ” ОБРАЩЕННЫХ СТАЦИОНАРНЫХ ФАЗ И МЕХАНИЗМЫ РАЗДЕЛЕНИЯ КАРОТИНОИДОВ

© 2022 г. В. И. Дейнека¹*, Т. Г. Буржинская¹, Л. А. Дейнека¹

¹ФГАОУ ВО “Белгородский государственный национальный исследовательский университет”,
Институт фармации, химии и биологии, ул. Победы, 85, Белгород, 308015 Россия

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

Поступила в редакцию 21.07.2022 г.

После доработки 29.07.2022 г.

Принята к публикации 10.08.2022 г.

Сопоставлены закономерности удерживания каротиноидов в условиях обращенно-фазовой хроматографии на “мономерных” и “полимерных” стационарных фазах. Показано, какие хроматографические свойства характерны для “мономерных” обращенных фаз как следствие специфики строения поверхности сорбентов. Основные из свойств включают распределительный механизм сорбции, причем внедрение каротиноидов внутрь фазы легко осуществимо благодаря большому пространству между привитыми алкильными радикалами. “Полимерные” обращенные фазы отличаются самоассоциацией алкильных радикалов по типу алканов в твердой фазе, что обеспечивает адсорбционный механизм, наиболее предпочтительный для молекул с линейными фрагментами структур. Такой вид удерживания не коррелирует с параметром липофильности (CLogP), но удобен для разделения эфиров ксантофиллов благодаря более высокой специфической селективности по сравнению с “мономерными” обращенными фазами.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, каротиноиды, “мономерные” обращенные фазы, “полимерные” обращенные фазы, строение поверхности

DOI: 10.31857/S0044185622060055

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноиды являются важнейшими вторичными метаболитами растений, относящимися к терпенам (тетратерпены). Они имеют каркас, построенный конденсацией восьми изопреноидных фрагментов, поэтому являются высоко липофильными соединениями [1]. Они не растворимы в воде, но из-за наличия большого числа сопряженных двойных С=С-связей их растворимость даже в органических растворителях редко превышает несколько г на 1 л [2]. Каротиноиды можно разделить на две группы: каротины — состоящие только из углерода и водорода, и ксантофиллы — соединения, имеющие в своем составе функциональные группы, содержащие атомы кислорода. Как соединениям с высокой биологической активностью, каротиноидам посвящено большое число публикаций (более 650000 источников по данным поисковой системы Google Академия), включающих хроматографические методы анализа. Ксантофиллы могут быть разделены по гидрофильности на силикагеле, что давно используется в методе ТСХ [3]. Но в настоящее время предпочтение отдается обращенно-фазовой ВЭЖХ, в рамках

которой особую популярность приобрели “полимерные” стационарные фазы С30 [4]. За много лет исследований хроматографического поведения каротиноидов в условиях обращенно-фазовой хроматографии установлен ряд закономерностей [5, 6], но работ, которые полностью объясняли и предсказывали селективность разделения каротиноидов нами в доступной нам литературе не обнаружено.

Цель настоящей работы — разработка основанного на строении поверхности “мономерных” и “полимерных” обращенных фаз подхода для объяснения и предсказания особенностей хроматографического поведения каротиноидов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Каротиноиды экстрагировали из растительных материалов, разделяли полупрепаративно методом ТСХ на силикагелевых пластинах Сорбфил, необходимые зоны использовали для реэстракции ацетоном, затем добавляли ацетонитрил и фильтровали через насадочный мембранный по-

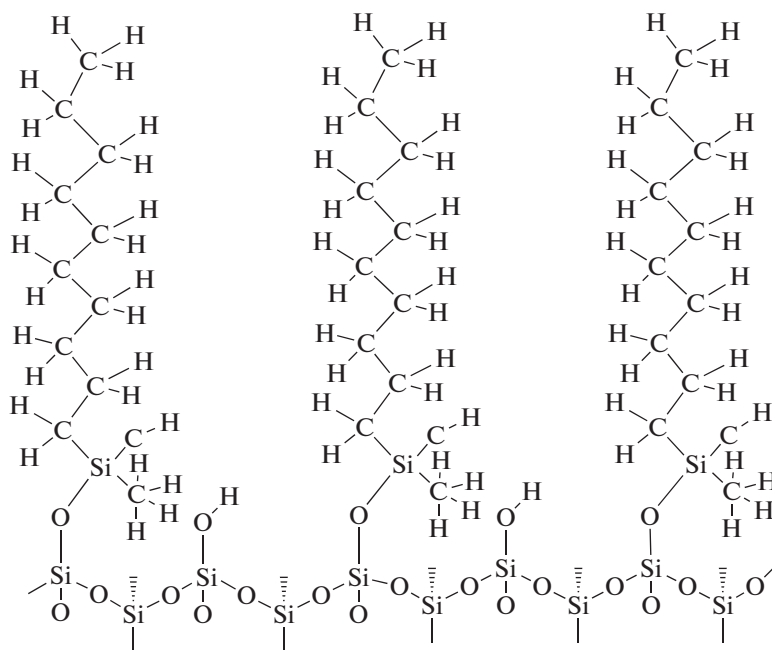


Рис. 1. Структура поверхности «мономерной» обращенной фазы.

ристый фильтр (0.45 мкм) перед хроматографированием.

Разделение каротиноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором на колонках: 1) 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5-C18; 2) 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5-C8; 3) 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5-C4; 4) 150 × 4.6 мм Agilent Eclips XDB-C18, 5 мкм; 250 × 4.6 мм YMC C30, 5 мкм. Разделение проводили при температуре 30°C. Хроматограммы регистрировали при длине волны детектора 450 нм, хранили и обрабатывали в программе Agilent ChemStation.

CLogP рассчитывали в программном пакете ChemSketch 12.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Строение и вытекающие из этого свойства «мономерной» обращенной стационарной фазы. Идеализированный вариант «мономерной» C18 фазы был предложен в работе [7]. Модель основывалась на известных свойствах кристаллов кварца, кристобалита и тридимита, в которых ориентация связанных между собой кремнекислородных тетраэдров чередуется вершинами: —вверх—вниз—вверх—вниз—. Поэтому только на половине поверхностных тетраэдров имеется гидроксильная (силанольная) группа, обращенная от поверхности силикагеля. Это полностью согласуется с правилом Журавлева-Киселева о присутствии на поверхности полностью гидроксильированного силикагеля около 4.8 силанольных групп на 1 нм². Более того, из-за

наличия двух метильных групп в якорной группе при традиционном получении «мономерных» обращенных фаз за счет силилирования поверхности силикагеля алкилдиметилхлорсиланом только половина этих групп в лучшем случае может быть дериватизирована, рис. 1.

В таком случае расстояние между привитыми алкильными радикалами вдвое больше, чем между алканами в твердом состоянии, и между этими радикалами могут уместиться такие же алкильные радикалы сорбатов, или тонкие (т.е. толщиной в один атом углерода) плоские молекулы не слишком большого размера в ширину. При такой модели:

1) объясняется поглощение стационарной фазой большого числа молекул органического модификатора подвижных фаз [8];

2) обеспечивается распределительный механизм удерживания каротиноидов (и других не сильно гидрофильных соединений) предпочтительнее механизма гидрофобного выталкивания молекул сорбата на поверхность сорбента;

3) снижение концентрации органического модификатора в подвижной фазе должно приводить к структурным изменениям в расположении алкильных радикалов, при котором их самосольватация (или ассоциация) станет неизбежной и алкильные группы будут прижаты к поверхности сорбента, что приведет к коллапсу фаз [9];

4) проникновение сорбатов до поверхности силикагелевой основы объясняет влияние оста-

точных силанольных групп на удерживание ксантофиллов;

5) следует учесть, что силикагель имеет аморфную структуру с нарушенным дальним порядком. При этом строгое выстраивание привитых радикалов в один ряд исключено, и, следовательно, для проникновения внутрь молекул сорбата больших размеров в ширину потребуется большее число конформационных изменений в привитых радикалах. Это было предложено для объяснения большего удерживания *цис*-изомеров ликопина по сравнению с *транс*-изомером [10] в условиях обращенно-фазовой хроматографии на “мономерной” стационарной C18-фазе.

В литературе отмечается, что принципиально возможно удерживание в обращенно-фазовой хроматографии по двум механизмам – по абсорбции (т.е. по распределению сорбата между стационарной и подвижной фазами) и по адсорбции (т.е. по гидрофобному выталкиванию сорбата на поверхность стационарной фазы) [11]. Учтем, что при экстракции веществ из водных растворов в несмешивающийся с водой органический растворитель степень извлечения будет тем больше, чем больше объем органического растворителя. В таком случае, мы предлагаем сопоставить удерживание сорбатов на стационарных фазах с различной длиной привитых радикалов, синтезированных на одной и той же марке силикагеля. Так, для колонок одинакового размера стационарных фаз марки Kromasil 100-5C4, 100-5C8 и 100-5C18 в одном и том же составе подвижной фазы (60 об. % ацетона и 40 об. % ацетонитрила) получены времена удерживания β -каротина, равные 2.46, 3.72 и 11.84 мин, соответственно. Это свидетельствует о распределительном механизме удерживания β -каротина, тогда как для хлорогеновой кислоты (5CQA), не способной проникать в глубь привитой фазы из-за гидрофильного радикала хинной кислоты, удерживание на этих же колонках различалось не более, чем на 10%.

Распределительный механизм удерживания на “мономерных” стационарных фазах является основанием для существования корреляций [12] между логарифмом фактора удерживания, $\lg k(i)$, и логарифмом распределения между октанолом-1 и водой, $C\text{LogP}$. Так структура ряда из трех каротинов: ликопин, γ -каротин и β -каротин, – последовательно включает одинаковые структурные изменения; для них наблюдается линейность между указанными выше параметрами (условия определения параметров удерживания: стационарная фаза Agilent Eclips XDB-C18, подвижная фаза 60 об. % ацетона и 40 об. % ацетонитрила), рис. 2. Также линейность найдена для другого набора соединений – ликопина, фитофлуина и фитина (условия определения параметров удерживания: стационарная фаза Kromasil 100-5C18, по-

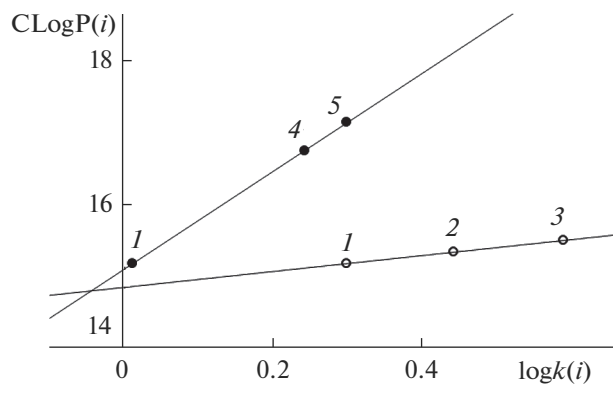


Рис. 2. Корреляция между $C\text{LogP}$ и $\lg k$ для некоторых каротинов на “мономерной” фазе. Соединения: 1 – ликопин; 2 – γ -каротин; 3 – β -каротин; 4 – фитофлуин; 5 – фитин.

движная фаза 60 об. % этилацетата и 40 об. % ацетонитрила).

Для диэфиров ксантофиллов, обычно образованных насыщенными жирными кислотами, наблюдается линейность зависимости логарифма фактора удерживания от числа атомов углерода в радикалах кислот [13]. При этом в методе не разделяются метамеры – вещества, имеющие одинаковую сумму атомов углерода в двух радикалах – как, например, димиристат и лаурат-пальмитат лютеина [14].

Пункт 5) объясняет изменение селективности разделения полностью *транс* β -каротина и 13-*цис*-изомера [15] с ростом плотности привитых C18-радикалов на поверхности сорбента.

Строение и вытекающие из этого свойства “полимерной” обращенной стационарной фазы. Для обоснования гипотезы строения таких фаз как следствие жесткой ассоциации алкильных радикалов по типу алканов в твердой фазе, приводящих к замене распределительного механизма на адсорбционный, впервые высказанной в работе [14], перечислим экспериментально установленные закономерности удерживания сорбатов.

1) Переход от “мономерной” C18 фазы (марки Kromasil) к “полимерной” C30 фазе (марки YMC), который должен был бы сказаться в существенном увеличении фактора удерживания β -каротина при распределительном механизме, приводит наоборот – к снижению $\lg k$ от 0.697 до 0.487.

2) При этом улучшается разделения пары α -каротин и β -каротин и кардинально изменяется селективность разделения ликопина и β -каротина с инверсий времен удерживания, рис. 3. Такой эффект указывает на резкое изменение механизма сорбции каротиноидов – абсорбция заменяется адсорбцией на агломератах алкильных групп с бороздками на их поверхности, благоприятными для сорбции линейных молекул. Следовательно,

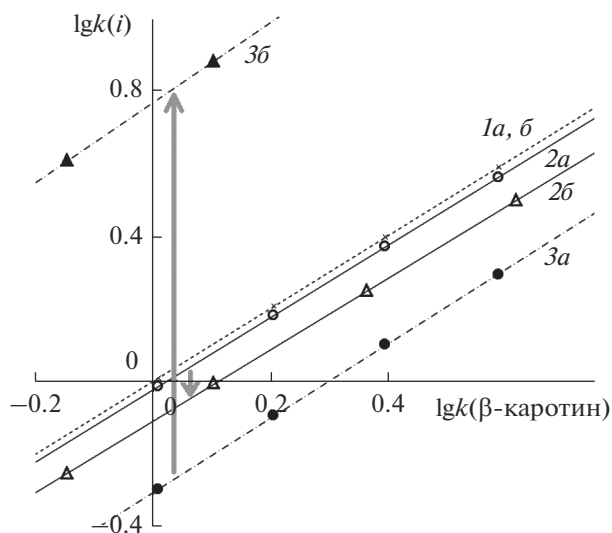


Рис. 3. Удерживание ликопина (3), α -каротина (2) относительно β -каротина (1) на “мономерной” (а) и “полимерной” (б) фазах.

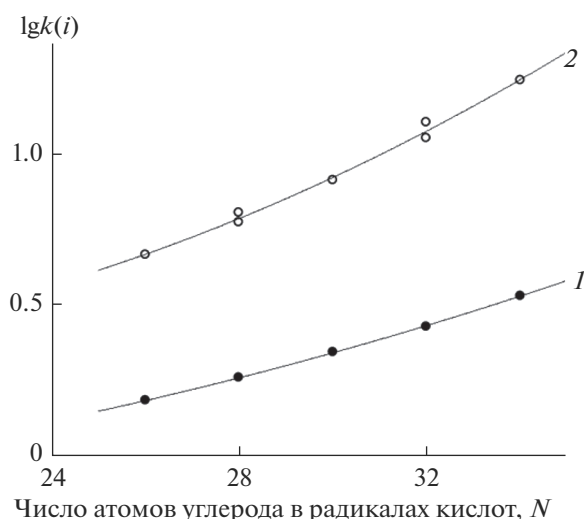


Рис. 4. Зависимость удерживания диэфиров зеаксантина от числа атомов углерода в радикалах кислот при температуре 50 (1) и 30 (2) °С. Подвижная фаза 90 об. % ацетона – 10 об. % ацетонитрила; колонка: 250 × 4.6 мм УМС С30.

диэфиры (как и моноэфиры) ксантофиллов должны прочно удерживаться на “полимерных” фазах.

3) Уход от распределительного механизма к адсорбционному изменяет порядок элюирования каротинов, указанный на рис. 2, на противоположный [16].

4) По литературным данным различий в хроматографическом поведении гомологов на “полимерных” и “мономерных” фазах не обнаруже-

но, хотя в работе [17] в условиях градиентного элюирования (исключающего расчет количественных характеристик удерживания) обнаружен ряд необычных особенностей разделения диэфиров. Но в работе [14] при изократическом элюировании было установлено, что линейность в зависимости логарифмов факторов удерживания диэфиров лютеина от числа атомов углерода в радикалах кислот на “полимерной” С30-колонке не выполняется и наблюдается разделение метамеров. В настоящей работе было установлено, что инкременты (разность между логарифмами факторов удерживания последовательных членов гомологического ряда) возрастают с ростом длины углеводородной цепи радикалов кислот диэфиров зеаксантина, рис. 4. При этом изомеры, например, с $N(C) = 28$ разделяются: лауратпальмитат зеаксантина удерживается прочнее димиристата зеаксантина. Однако и в нашей работе для серии эфиров *para*-нитробензойной кислоты (от гексилового до нонилового) получена линейная зависимость удерживания от числа атомов углерода. Причина такого различия пока не установлена.

5) На графиках Вант-Гоффа (зависимости натурального логарифма фактора удерживания от обратной абсолютной температуры) для С30 фаз обнаруживается излом, которого нет для “мономерной” обращенной фазы [14]. При этом с ростом температуры энтальпия переноса сорбатов с подвижной фазы на стационарную (наклон линий трендов) для “полимерной” фазы уменьшается, приближаясь к энтальпии для “мономерной” фазы. Это не удивительно, поскольку с ростом температуры подвижность радикалов кислот увеличивается и исчезают бороздки на агрегатах алкильных радикалов, превращая адсорбционный механизм в распределительный. Понятно также, что и в случае “мономерных” фаз вероятность ассоциации алкильных радикалов не равна нулю и возрастает с понижением температуры, поэтому и в этом случае возможен излом линий на графике Вант-Гоффа, что было подтверждено экспериментально [18, 19].

В пользу предложенного выше строения (вертикальных) “полимерных” обращенных фаз, которые синтезируют вначале конденсацией между собой алкилтрихлорсиланов (после частичного гидролиза) с последующей иммобилизацией полученных олигомеров на силикагеле. Возможность ассоциации алкильных групп в этом случае подтверждена оптимизацией геометрии ассоциатов в программе ChemSketch 12.0, рис. 5.

Свобода пространственной ориентации кремнекислородных тетраэдров иммобилизованных на поверхности силикагеля за счет одной Si-O-Si-связи, позволяет при небольших конформационных превращениях алкильных радикалов

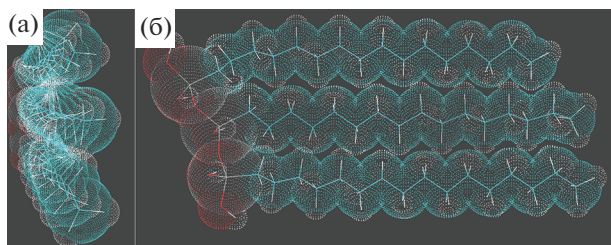


Рис. 5. Ассоциация алкильных радикалов на поверхности "полимерной" обращенной фазы.

обеспечить стабилизацию структур за счет их самоассоциации. Т.е. поверхность силикагеля покрыта иммобилизованными островками ассоциатов с бороздками для адсорбции молекул линейного строения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Различие хроматографического поведения каротиноидов на "мономерных" и "полимерных" фазах определяется особенностями строения поверхности данных сорбентов. В случае "мономерных" обращенных фаз удерживание происходит по распределительному механизму. На "полимерных" обращенных фазах механизм изменяется на адсорбционный, особенно удобный для удерживания сорбатов (или их фрагментов) линейного строения, комплементарных к бороздкам на поверхности ассоциатов алкильных групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Perera C.O., Yen G.M.* // *Int. J. Food Prop.* 2007. V. 10. P. 201.
2. *Craft N.E., Soares J.H., Jr.* // *J. Agric. Food Chem.* 1992. V. 40. P. 431–434.
3. *Zeb A., Murkovic M.* // *J. Planar Chromatogr.* 2010. V. 23. P. 94.
4. *Giuffrida D., Donato P., Dugo P., Mondello L.* // *J. Agric. Food Chem.* 2018. V. 66. P. 3302.
5. *Sander L.C., Sharpless K.E., Craft N.E., Wise S.A.* // *Anal. Chem.* 1994. V. 66. P. 1667.
6. *Ligor M., Kovačova J., Gadzała-Kopciuch R.M. et al.* // *Chromatogr.* 2014. V. 77. P. 1047.
7. *Дейнека В.И., Нгуен Ань Ван, Дейнека Л.А.* // *ЖФХ.* 2019. Т. 93. С. 1860.
8. *Bocian Sz., Vajda P., Felinger A., Buszewski B.* // *Anal. Chem.* 2009. V. 81. P. 6334.
9. *Przybyciel M., Majors R.E.* // *LC • GC Europe.* 2002. October. P. 2.
10. *Дейнека В.И., Буржинская Т.Г., Дейнека Л.А., Блинова И.П.* // *ЖАХ.* 2021. Т. 76. С. 135.
11. *Vailaya A., Horváth C.* // *J. Chromatogr. A.* 1998. V. 829. P. 1–27.
12. *Podunavac-Kuzmanović S.O., Jevrić L.R., Tepić A.N., Šumić Z.* // *Hem. Ind.* 2013. V. 67. P. 933.
13. *Colin H., Krstulović A.M., Gonnord M.-F., Guiochon G.* // *Chromatogr.* 1983. V. 17. P. 9.
14. *Дейнека В.И., Лапинова М.С., Захаренко Е.В., Дейнека Л.А.* // *ЖФХ.* 2013. Т. 87. С. 1943.
15. *Lesellier E., West C., Tchaplal A.* // *J. Chromatogr. A.* 2006. V. 1111. P. 62.
16. *Bijttebier S., D'Hondt E., Noten B. et al.* // *J. Chromatogr. A.* 014. V. 1332. P. 46.
17. *Young J.C., Abdel-Aal E.-S.M., Rabalski I., Blackwell B.A.* // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. P. 4965.
18. *Cole L.A., Dorsey J.G.* // *Anal. Chem.* 2002. V. 64. P. 1324.
19. *Gritti F., Guiochon G.* // *Anal. Chem.* 2006. V. 78. P. 4642.