



УДК 543.544.5:544.723.232:547.912

## Инкрементные соотношения при анализе удерживания каротиноидов: использование ортогонального разделения

Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Шаркунова Н.А.

*Белгородский государственный университет, Белгород*

Поступила в редакцию 10.09.2008 г.

### Аннотация

Работа посвящена исследованию инкрементных соотношений в удерживании каротиноидов в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ в неводных подвижных фазах (системы «ацетон – ацетонитрил»). Для объяснения найденных закономерностей предложена модель, основанная на смещении точки конвергенции по оси абсцисс, которая применима для «псевдогомологов» - веществ различных гомологических рядов с одинаковым последовательным изменением строения молекул. Для экспериментального исследования удерживания компонентов сложных смесей (экстракта плодов сладкого перца) применен метод ортогонального разделения.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, ТСХ, удерживание, инкременты, каротиноиды,

The paper is devoted to investigation of increment relationships for carotenoides retention in reversed-phase HPLC with anhydrous mobile phases of “acetonitrile – acetone” system. The model has been based upon assumption of the convergence point shift for explanation of “pseudohomologues” (PG) retention increments, PG being the solutes of different homologues series with identical successive structure alteration. Experimental validation of the model has been confirmed by orthogonal separation of complex solutes mixture of sweet pepper fruits extracts.

**Key words:** HPLC, TLC, retention, increments, carotenoids.

### Введение

Несмотря на то, что к настоящему времени опубликовано огромное число работ по исследованию каротиноидного состава различных объектов растительного и животного происхождения, даже попыток обобщить закономерности удерживания нами не обнаружено. Это удивительно, поскольку по разнообразию функциональных групп (на концах молекулы) с каротиноидами могут соперничать только триглицериды. Производные бензола, обычно использовавшиеся для поиска подобных закономерностей удерживания [1], можно считать существенно менее удачными сорбатами вследствие сильного влияния одних функциональных групп на другие по индуктивным и мезомерным механизмам. В отличие от каротиноидов известен целый ряд обстоятельных исследований закономерностей удерживания триглицеридов как с использованием различных вариантов эквивалентных

углеродных чисел [2 - 4], так и с использованием инкрементного подхода [5 - 6]. Лишь в нашей предыдущей публикации [7] были исследованы некоторые аспекты инкрементного подхода к анализу каротиноидов, основанные в основном на свойствах удерживания сорбатов гомологических рядов (диэфиров ксантофиллов). При этом была показана возможность переноса метиленовых инкрементов между различными гомологическими рядами, что позволило разделить ряд сложных смесей растительных экстрактов на составляющие их гомологические ряды.

Основная цель настоящей работы – дальнейшее исследование закономерностей удерживания каротиноидов с использованием двухмерной хроматографии.

### Материалы и методы исследования

В работе использована хроматографическая система, составленная из насоса Altex 110А, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографические колонки: 4×250 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм, 4×250 мм, Кромасил-100-С18, 5 мкм защищенные предколоночным фильтром. Детектор – спектрофотометрический с варьруемой длиной волны (детектор Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5. Для ТСХ использовали пластины с силикагелем «Сорбфилл». Спектры индивидуальных компонентов и разделенных фракций каротиноидов записывали на спектрофотометре КФК-3-01.

Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: ацетон ч.д.а. ЗАО «Экос-1», ацетонитрил х.ч., ООО «ХромРесурс».

В работе использовали экстракты свежего сладкого перца красной и оранжевой окрасок (*Capsicum annuum*), сушеных плодов и чашечек физалиса декоративного (*Physalis alkekengi*), сушеных лепестков бархатцев оранжевой окраски (*Tagetes erecta* и/или *T. patula*). Экстракцию из свежих плодов осуществляли последовательным добавлением ацетона к навеске перца и растирания в фарфоровой ступке с кварцевым песком с отделением каждой порции ацетона. Каротиноиды из суммы фракций экстрагировали в *n*-гексан для последующего разделения методом ТСХ на фракции в элюентах, содержащих на 20 мл *n*-гексана 2-3 мл ацетона. Индивидуальные фракции экстрагировали ацетоном, отделяя от сорбента фильтрованием.

### Результаты исследования и обсуждение

При разработке полуэмпирических систем для количественной взаимосвязи между удерживанием (в условиях обращено-фазовой ВЭЖХ) и строением сорбатов ключевая роль может быть отведена инкрементам, соответствующим одинаковому изменению структуры веществ в некотором ряду. Наиболее простой случай - добавление метиленовых групп в рядах гомологов был рассмотрен ранее [7]. В общем случае среди каротиноидов можно выбрать множество троек сорбатов  $A \rightarrow B \rightarrow V$ : где *A* – исходная симметричная молекула; *B* – молекула со структурным изменением на одном конце молекулы; *V* – молекула с двумя такими же структурными изменениями с обеих сторон. Тогда два инкремента:

$$\Delta_1 = \lg k(B) - \lg k(A) \text{ и } \Delta_2 = \lg k(V) - \lg k(B)$$

соответствуют одинаковому последовательному изменению структуры и, как обычно предполагается [1, 8], должны быть одинаковыми.

Схождение линий тренда для всех членов гомологического ряда в одной точке (точке конвергенции [9]) хорошо известно, и выполняется для рядов диэфиров ксантофиллов [7]. Но сорбаты А, Б и В уже не принадлежат к одному гомологическому ряду (назовем их «псевдогомологами»); их точки конвергенции в общем случае могут иметь различные абсциссы, но в рассматриваемых рядах вероятно одинаковое смещение точек по оси абсцисс по мере добавления одинаковых полярных функциональных групп [10 - 11]. Но тогда, как нетрудно убедиться, последовательные инкременты не должны быть эквивалентными. Сместим начало координат на графике относительного удерживания в точку конвергенции (для этого нужно добавить к логарифму фактора удерживания константу С). Тогда координатная диагональ описывается тривиальным уравнением:

$$(\lg k(A) + C) = 1 \cdot (\lg k(A) + C).$$

Если бы сорбаты Б и В были гомологами сорбата А, то для них уравнения относительного удерживания имели бы вид:

$$(\lg k(B) + C) = (1 + b)(\lg k(A) + C),$$

$$(\lg k(B) + C) = (1 + 2b)(\lg k(A) + C),$$

где удвоение прироста тангенса угла наклона ( $2b$ ) обеспечивает равенство последовательных инкрементов при любом составе подвижной фазы. Пусть точки конвергенции смещаются по оси абсцисс на параметр  $a$ :

$$(\lg k(B) + C) = (1 + b)(\lg k(A) + C - a),$$

$$(\lg k(B) + C) = (1 + 2b)(\lg k(A) + C - 2a).$$

Тогда можно рассчитать последовательные инкременты:

$$\Delta_1 = (\lg k(B) + C) - (\lg k(A) + C) = b \lg k(A) + bC - a - ab, \quad (1)$$

$$\Delta_2 = b \lg k(A) + bC - a - 3ab. \quad (2)$$

Следовательно, равенство  $\Delta_1$  и  $\Delta_2$  для «псевдогомологов» может выполняться нестрого, - с точностью до  $2ab$ , причем разность этих параметров не зависит от состава подвижной фазы.

Простым примером псевдогомологов может быть тройка легкодоступных сорбатов: А =  $\beta$ -каротин, который входит в состав многих фруктов и овощей (в нашем случае этот компонент выделен из наиболее неполярной части экстракта красного перца *Capsicum annuum*). Б =  $\beta$ -криптоксантина пальмитат и В = зеаксантина дипальмитат – два основных пика в экстракте плодов (и чашечки) физалиса декоративного (*Physalis alkekengi*) [12], рис.1.

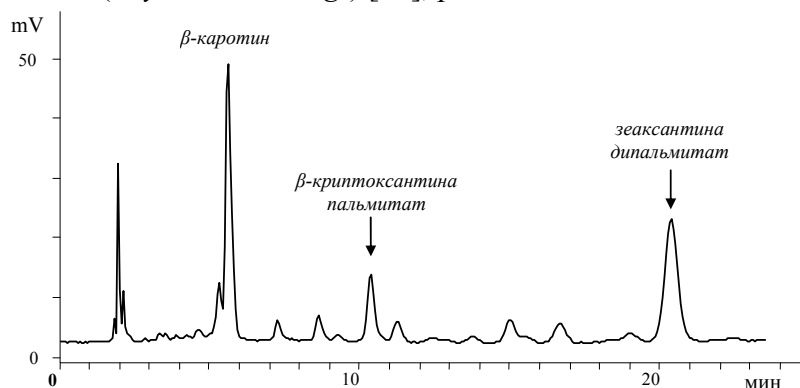
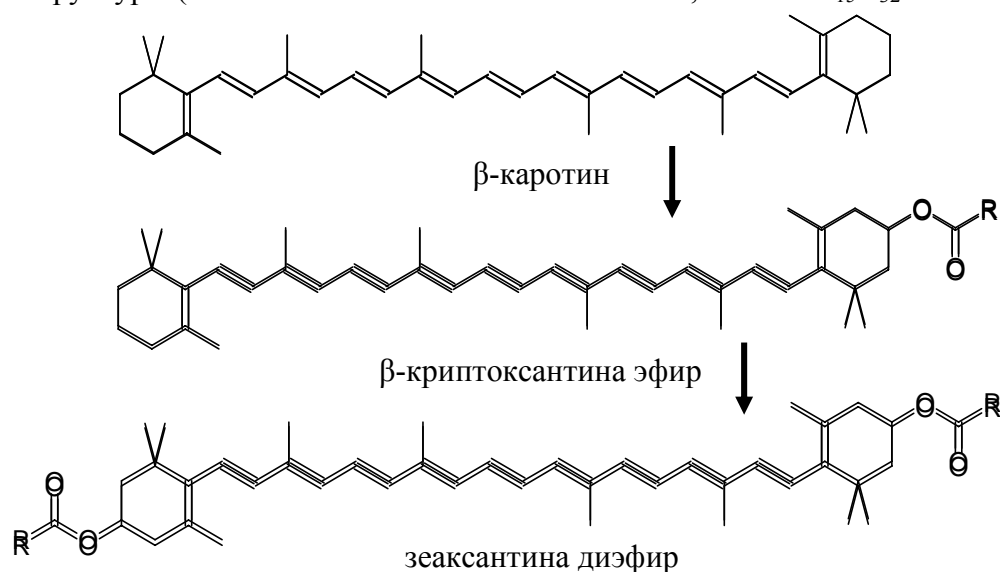


Рис.1. Разделение некоторых каротиноидов в условиях ОФ ВЭЖХ  
Колонка: 250×4 мм, Кромасил-100-С18, 5 мкм, Подвижная фаза: 85 %  
ацетона, 15% ацетонитрила, 1 мл/мин. Детектор: 445 нм.

В рассматриваемом ряду происходит одинаковое последовательное изменение структуры (основные компоненты – пальмитаты, т.е.  $R = C_{15}H_{32}$ ):



Данные по удерживанию этих сорбатов в трех различных составах подвижных фаз системы ацетон – ацетонитрил, представлены в табл.1 и на рис.2. Очевидно, прямые линии трендов относительного удерживания действительно имеют тенденцию пересечения в одной точке, что характерно для «псевдогомологов». Но при этом различия в инкрементах:

$$\Delta_1 = \lg k(\beta\text{-криптоксантина\_пальмитат}) - \lg k(\beta\text{-каротин}) \text{ и}$$

$$\Delta_2 = \lg k(\text{зеаксантина\_дипальмитат}) - \lg k(\beta\text{-криптоксантина\_пальмитат})$$

хорошо заметны. Первый инкремент оказывается примерно на 5 % больше (что находится в соответствии с предложенной выше моделью) второго; абсолютное различие между ними (0.016 – 0.017) намного превышает погрешности экспериментального определения логарифмов факторов удерживания (0.002). Более того, это различие постоянно (в пределах указанной погрешности) в исследованном диапазоне составов подвижных фаз, что также подтверждает справедливость предложенной выше модели.

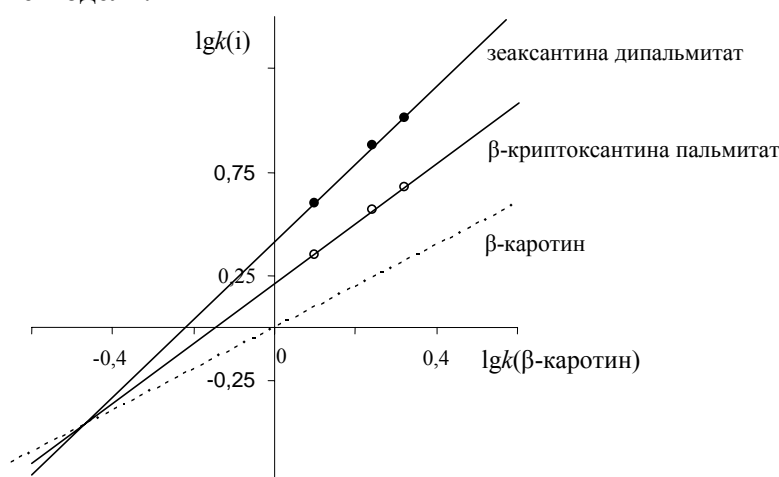


Рис.2. Удерживание пальмитатов зеаксантина и β-криптоксантина относительно β-каротина

Колонка: 250·4 мм, Кромасил-100-С18, 5 мкм;  
элюенты системы «ацетон – ацетонитрил».

Поэтому можно рассчитывать только на одинаковое последовательное изменение тангенса угла наклона линий тренда для указанной последовательности. Для рассматриваемого случая было найдено:

$$\lg k(\beta\text{-криптоксантина\_пальмитат}) = 0.2143 + 1.4407 \cdot \lg k(\beta\text{-каротин});$$

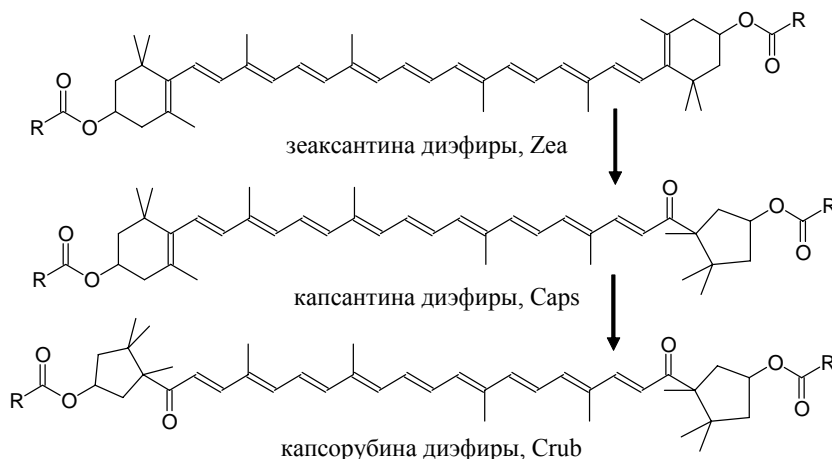
$$\lg k(\text{зеаксантина\_дипальмитат}) = 0.4145 + 1.8741 \cdot \lg k(\beta\text{-каротин}).$$

Последовательное изменение тангенсов углов наклона составило 0.4407 и 0.8741; второе число отличается от удвоенного значения первого числа меньше, чем на 1 %, что уже может быть следствием погрешности определения параметров относительного удерживания.

Таблица 1. Инкременты для удерживания  $\beta$ -каротина,  $\beta$ -криптоксантина-пальмитата и зеаксантина дипальмитата в условиях ОФ ВЭЖХ в элюентах системы «ацетон-ацетонитрил»

Инкремент	Параметры удерживания каротиноидов в элюентах с объемной долей ацетона:		
	100 %	90 %	85 %
$\Delta_1$	0.257	0.325	0.354
$\Delta_2$	0.241	0.310	0.337
$\Delta_1 - \Delta_2$	0.016	0.015	0.017

Для разделения некоторых троек гомологов исследование их удерживания при совместном присутствии невозможно вследствие наложения пиков различных эфиров. Например, использованный в данной работе красный перец, относится к объекту, каротиноиды которого наиболее часто исследовались в мировой практике: только в журнале «Journal of Agricultural and Food Chemistry» опубликовано более двух десятков работ посвященных исследованию этого источника каротиноидов. Объект интересен и в плане тематики данной работы, поскольку в нем может быть найдена тройка сорбатов: диэфиры капсорубина (А), диэфиры капсантина (Б) и диэфиры зеаксантина (В), которые в различном соотношении содержатся в плодах растения. При окраске в оранжевые цвета основными пигментами являются диэфиры зеаксантина. Кстати именно такие перцы являются наиболее полезными для профилактики возрастного заболевания зрительного аппарата. Диэфиры зеаксантина синтезируются в плодах перца из  $\beta$ -каротина, а при активации в тканях плода соответствующих ферментов зеаксантин постепенно превращается в капсантин и капсорубин, сообщая плодам красную окраску [13]:



В условиях обращено-фазовой ВЭЖХ такой спектр гомологов занимает большой интервал времен удерживания, что приводит в лучшем случае к сложной суперпозиции пиков [7], а в худшем – к созлоированию ряда компонентов параллельных рядов гомологов. Тогда интерпретация хроматограмм существенно усложняется, вследствие чего обычная практика определения каротиноидов методом ВЭЖХ включает предварительное омыление экстракта пигментов [15]. Правда, при этом остается надеяться, что омыление в спиртовом растворе щелочи не затрагивает остальные функциональные группы и полученный продукт достоверно представляет исходный каротиноидный состав.

Альтернативой омылению может служить двухмерная хроматография в варианте «ортогонального» разделения [16]. Если в первом измерении проводить разделение в условиях нормально-фазовой хроматографии в условиях эффективности обычных ТСХ пластин, то для гомологов с достаточно длинными углеводородными радикалами удерживание будет определяться числом и видом полярных функциональных групп, мало завися от длины радикала. Затем для разделенных фракций в качестве второго измерения, ортогонального первому, можно воспользоваться обращено-фазовой хроматографией. Кстати, фракции, выделенные в условиях нормально-фазовой ВЭЖХ, могут быть дополнительно исследованы спектрометрическими методами в УФ и видимой областях электромагнитного спектра (своего рода «третье измерение» с учетом высокой информативности спектров каротиноидов [17]).

На рис.3 представлены хроматограммы трех фракций, выделенных из суммы каротиноидов красного перца методом нормально-фазовой хроматографии в условиях: пластины Сорбфил для ТСХ 10×10 см, подвижная фаза 20 мл *n*-гексана + 2 мл ацетон:

- а) фракция диэфиров зеаксантина,  $R_f = 0.85$ , спектр I, рис.4;
- б) фракция диэфиров капсантина,  $R_f = 0.60$ , спектр II, рис.4;
- в) фракция диэфиров капсорубина,  $R_f = 0.31$ , спектр III, рис.4.

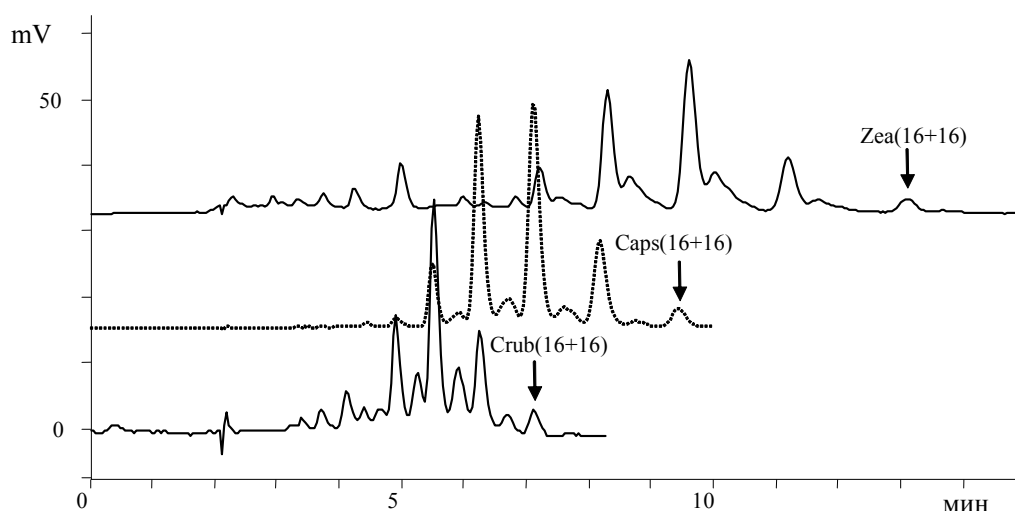


Рис.3. Разделение фракций гомологов зеаксантинового, капсантинового и капсорубинового рядов

Колонка: 250·4 мм, Диасфер-110-C18, 5 мкм; элюент 10 об.% ацетонитрила в ацетоне. Детектор: 445 нм.

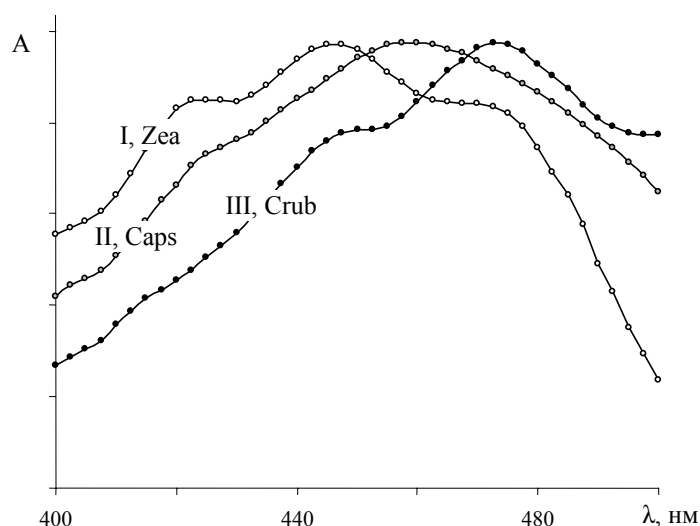


Рис.4. Спектры фракций каротиноидов после разделения методом ТСХ

При сопоставлении хроматограмм на рис.3 можно сделать вывод о том, что, во-первых, предположение о примерном постоянстве количественного соотношения типов диэфиров [17] внутри различных гомологов одного растительного материала в целом соблюдается и в случае диэфиров ксантофиллов сладкого перца. Во-вторых, кроме полностью *транс*-изомеров на хроматограммах присутствуют в заметном количестве и *цис*-изомеры, что подтверждается увеличением доли соответствующих пиков при записи хроматограмм при  $\lambda = 340$  нм вследствие наличия так называемой *цис*-полосы поглощения [16]. В-третьих, пики диэфиров капсорубина практически совпадают (со смещением на два пика) с пиками диэфиров капсантина. Но диэфиры капсантина элюируются немногим раньше (при таком же смещении на два пика) пиков диэфиров зеаксантина, что подтверждает предложенную и рассмотренную выше модель, по которой  $\Delta_2 < \Delta_1$ . В рассматриваемом ряду диэфиров инкремент рассчитывается для однотипных диэфиров:

$$\Delta_1 = \lg k(\text{зеаксантина\_диэфира}) - \lg k(\text{капсантина\_диэфира}),$$

$$\Delta_2 = \lg k(\text{капсантина\_диэфира}) - \lg k(\text{капсорубина\_диэфира}).$$

По количественным параметрам удерживания гомологов индивидуально выделенных фракций диэфиров зеаксантина, капсантина и капсорубина, представленным в табл.2, можно сделать несколько выводов, полностью согласующихся с предложенной выше моделью. Во-первых, гомологическая разность (или инкремент на две метиленовые группы) остается постоянным (в пределах погрешности измерений (0.002) для трех гомологических рядов. Во-вторых, средние значения этих инкрементов постепенно уменьшаются от производных зеаксантина к производным капсорубина, что также является прямым следствием смещения точки конвергенции по оси абсцисс.

Поскольку среди сорбатов, представленных в табл.2, имеются различные типы эфиров, то в соответствии с уравнениями 1 и 2 инкременты должны зависеть от удерживания вещества сравнения, поэтому (в-третьих) и  $\Delta_1$  и  $\Delta_2$  возрастают от дилауратов до дипальмитатов. Далее, как и следовало предполагать,  $\Delta_1 > \Delta_2$  для всех типов эфиров, а  $\Delta_1 - \Delta_2$  остается достаточно постоянным.

Таблица 2. Параметры удерживания диэфиров ксантофиллов *Capsicum annuum*

Диэфиры	$t_R$ , мин	$\lg k(i)$	$\Delta(-CH_2CH_2-)$		
капсорубин					
Дилаурат	4.37	0.175			
Лаурат-мирилат	4.88	0.253	0.077		
Димирилат	5.49	0.330	0.077		
Мирилат-пальмитат	6.23	0.408	0.078		
Дипальмитат	7.09	0.485	0.076		
капсантин				$\Delta_2$	
Дилаурат	5.48	0.329		0.153	
Лаурат-мирилат	6.22	0.407	0.079	0.155	
Димирилат	7.1	0.485	0.078	0.155	
Мирилат-пальмитат	8.16	0.564	0.079	0.156	
Дипальмитат	9.42	0.642	0.078	0.157	
зеаксантин				$\Delta_1$	$\Delta_1-\Delta_2$
Дилаурат	7.18	0.492		0.163	0.010
Лаурат-мирилат	8.27	0.571	0.079	0.164	0.009
Димирилат	9.58	0.651	0.080	0.165	0.010
Мирилат-пальмитат	11.2	0.731	0.080	0.167	0.012
Дипальмитат	13.1	0.811	0.080	0.169	0.012

Колонка: 250×4 мм, Диасфер-110-С18, 5 мкм; элюент: 10 об.% ацетонитрила в ацетоне.

### Заключение

Для объяснения инкрементных соотношений в удерживании каротиноидов в работе предложена модель, учитывающая смещение координат точки конвергенции, хорошо согласующаяся с экспериментальными данными. Модель была проверена анализом параметров удерживания троек сорбатов из групп гомологов, выделенных из сложной смеси (пигментов сладкого перца) методом ортогональной хроматографии.

### Список литературы

1. Smith R.M. Functional group contributions to the retention of analytes in reversed-phase high-performance liquid chromatography. // J. Chromatogr. A. 1993. v.656. P.381-415
2. Podlacha O., Toregard B. Some new observations on the equivalent carbon numbers of triglycerides and relationship between changes in equivalent carbon number and molecular structure // J. Chromatogr. 1989. v.482. P. 215-226.
3. Geeraert E., De Schepper D. Structure elucidation of triglycerides by chromatographic techniques. Part 2: RPHPLC of triglycerides and brominated triglycerides // J. High Resol. Chromatogr. CC. 1983. v.6. P. 123-132.
4. Lin J.-T., Snyder L. R., McKeon T.A. Prediction of relative retention times of triacylglycerols in nonaqueous reversed-phase high-performance liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 1998. v.808. P. 43-49.



5. Дейнека В.И., Староверов В.М., Фофанов Г.М., Балятинская Л.Н. Инкрементный подход при определении состава триглицеридов // Хим.-фарм. ж. 2002, т.36. №7. С. 44-47.
6. Дейнека В.И., Фофанов Г.М., Хлебников В.А., Балятинская Л.Н. Инкрементный подход в расчете жирнокислотного состава триглицеридов // Хранение и переработка сельхозсырья. 2002. №11. С.20-23.
7. Дейнека В.И., Дейнека Л.А. Инкрементный подход в анализе каротиноидов методом ОФ ВЭЖХ. Разделение диэфиров ксантофиллов. // Сорбц. и хроматограф. процессы. 2006. Т.6. №3. С. 366-375
8. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне. 1988. 390 с.
9. Colin H., Krstulović A.M., Gonnord M.-F., Guiochon G. Investigation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography – effects of stationary and mobile phases on retention of homologous series. // Chromatographia. 1983. v.17(1). P. 9-15.
10. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ //Ж. физ. химии. 2006. т.80. №3. С. 511-516.
11. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживания в ВЭЖХ. Сопоставление инкрементных зависимостей //Ж. физ. химии. 2006. т.80. №4. С. 704-708.
12. Weller P., Breithaupt D.E. Identification and Quantification of Zeaxanthin Esters in Plants Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry // J. Agric. Food Chem. 2003. v.51. P. 7044-7049
13. Minguez-Mosquera M.I., Hornero-Méndez D. Formation and Transformation of Pigments during the Fruit Ripening of *Capsicum annuum* Cv. *Bola* and *Agridulce* // J. Agric. Food Chem. 1994. v.42. P. 30-44
14. Matsufuji H., Nakamura H., Chino M., Takeda M. Antioxidant Activity of Capsanthin and the Fatty Acid Esters in Paprika (*Capsicum annuum*) // J. Agric. Food Chem. 1998. v.46. P. 3468-3472
15. Ittah Y., Kanner J., Granit R. Hydrolysis Study of Carotenoid Pigments of Paprika (*Capsicum annuum* L. Variety Lehava) by HPLC/Photodiode Array Detection. // J. Agric. Food Chem. 1993. v.41. P. 899-901
16. Pellet J. et al “Ortogonal” separation for reversed-phase liquid chromatography. // J. Chromatogr. A. 2006. v.1101. P.122-135.
17. Rodrigues-Amaya D.B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods, ILSI Press, Washington. 2001. 64 p.

---

**Дейнека Виктор Иванович** – Доцент, д.х.н., доцент кафедры общей химии БелГУ, Белгород

**Дейнека Людмила Александровна** – к.х.н., доцент кафедры общей химии БелГУ, Белгород

**Шаркунова Наталия Александровна** – магистрант биолого-химического факультета БелГУ, г. Белгород

**Deineka Victor Ivanovitch** – Professor assistant, DrSci(Chemistry) Belgorod State University, E-mail: [deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

**Deineka Lyudmila A.** – Professor assistant, PhD Belgorod State University, Belgorod

**Sharkunova Natalia A.** – Magistrant of Biological-Chemical Department Belgorod State University, Belgorod