



УДК 544.723.23

Сопоставление сорбции некоторых антоцианов на традиционной обращенной фазе и на сополимере стирола и дивинилбензола

Дейнека В.И.¹, Макаревич С.Л.¹, Дейнека Л.А.¹,
Доронин А.Г.¹, Селеменев В.Ф.²

¹ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»,
Белгород

²ФГБОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 27.03.2014 г.

Аннотация

Сопоставлено хроматографическое поведение 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов (пеларгонидина, цианидина, дельфинидина, петунидина, пеонидина и мальвидина) – на двух типах обращенных фаз – на традиционном C18-сорбенте и на сополимере стирола и дивинилбензола. На основании карт разделения и расчетных значений энтальпии переноса сорбатов из подвижной фазы на стационарную установлены общие черты и различия в сорбции антоцианов. Несмотря на найденные различия показано, что полимерные сорбенты могут быть использованы для определения антоцианов в жестких условиях, неприемлемых для обычных обращенных фаз.

Ключевые слова: обращенно-фазовая ВЭЖХ, антоцианы, карты удерживания, C18-фаза, сополимер стирола и дивинилбензола, стандартная энтальпия сорбции.

The comparison of 3-glucosides of six common anthocyanidins (pelargonidin, cyanidin, delphinidin, petunudin, peonidin and malvidin) chromatographic behavior upon two types of reversed-phases (conventional C18 as well as copolymer of styrene-divinylbenzene) was investigated. On the basis of resolution maps and standard enthalpy of solute transfer from mobile phase onto stationary phase the common features and the differences were elucidated. In spite of the discrepancies it was established that polymer sorbents may be used for anthocyanins determination in severe conditions that are not well suitable for conventional reversed-phases.

Keywords: reversed phase HPLC, anthocyanins, separation maps, C18-phases, styrene-divinylbenzene copolymer, standard enthalpy of sorption

Введение

Обращенно-фазовая хроматография относится к наиболее часто используемым методам высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Популярность метода определяется его универсальностью – возможностью разделения как гидрофильных, так и гидрофобных соединений, и их смесей. До настоящего времени в ВЭЖХ используют главным образом сорбенты, получаемые конденсацией силанольных групп силикагеля с некоторыми алкилсиланами [1]; наиболее популярными из них являются сорбенты с *n*-C₁₈H₃₇-радикалом, впрочем, реже применяют стационарные фазы и с иными углеводородными радикалами.

Более того производятся стационарные фазы с различными вариантами функционализации – «мономерные» и «полимерные» [2]. Однако силилирование всех силанольных групп поверхности силикагеля по стерическим причинам [3] не может быть исчерпывающим, поэтому важной характеристикой конкретной марки стационарной фазы является активность остаточных силанольных групп. Эта активность является одним из факторов, обуславливающих невоспроизводимость хроматографических свойств стационарных фаз различных марок, а порой и различных партий одной и той же марки [4]. Применение разнообразных технологий дополнительной обработки сорбентов на основе силикагеля не позволило полностью устранить существующие проблемы.

В последнее время появился условно новый истинно полимерный материал для обращенно-фазовой ВЭЖХ – сополимер стирола и дивинилбензола. Технологии интенсивной сшивки макромолекул позволили получить микро-, макро- и даже гигапористые неразбухающие в растворителе продукты, которые могут быть упакованы в традиционные хроматографические колонки [5]. Но пока известно лишь несколько промышленно выпускаемых марок таких сорбентов и их свойства только предстоит исследовать. Цель настоящей работы – исследование поведения некоторых антоцианов на стационарной фазе на основе сополимера стирола и дивинилбензола в сопоставлении с их поведением на традиционном обращенно-фазовом сорбенте.

Эксперимент

Для разделения антоцианов и их идентификации использовали жидкостной хроматограф Agilent Infinity 1200 с диодно-матричным детектором. 3-глюкозиды дельфинидина (Dp3G), цианидина (Cy3G), петунидина (Pt3G), пеларгонидина (Pg3G), пеонидина (Pn3G) и мальвидина (Mv3G) выделяли из очищенных экстрактов плодов винограда и земляники методом полупрепаративной ВЭЖХ на хроматографической системе Shimadzu. Хроматографическое поведение антоцианов исследовали на двух хроматографических колонках 4.6×250 мм Symmetry® C18, 5 мкм (фаза I) и 4.6× 150 мм MCI Gel CHP20/C04, 4 мкм (фаза II) в подвижных фазах системы «ацетонитрил : муравьиная кислота : вода» в соотношении 8 ÷ 6 : 10 : 92 ÷ 94 об. % в изократическом режиме.

Обсуждение результатов

Карты разделения 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов на фазах I и II, построенные по методу относительного анализа удерживания [6], представленные на рис.1, похожи друг на друга – в разумных составах подвижных фаз удерживание растет в ряду:



т.е. удерживание, как и следовало предположить для обращенно-фазовой хроматографии, падает при добавлении ОН-группы и (в меньшей степени) растет при введении СН₃О-группы в кольцо В. В области точек конвергенции (в левом нижнем углу карты разделения, рис.1) антоцианы в обоих случаях сгруппировались по числу гидроксильных групп только в случае фазы I. Для фазы II ход линий тренда не соответствует обращенно-фазовому варианту, что и не удивительно, поскольку проникновение аналитов в стационарную фазу исключено. Смещение линий трендов

вниз и вправо при добавлении гидроксильных групп, как и в первом случае, сохраняется.

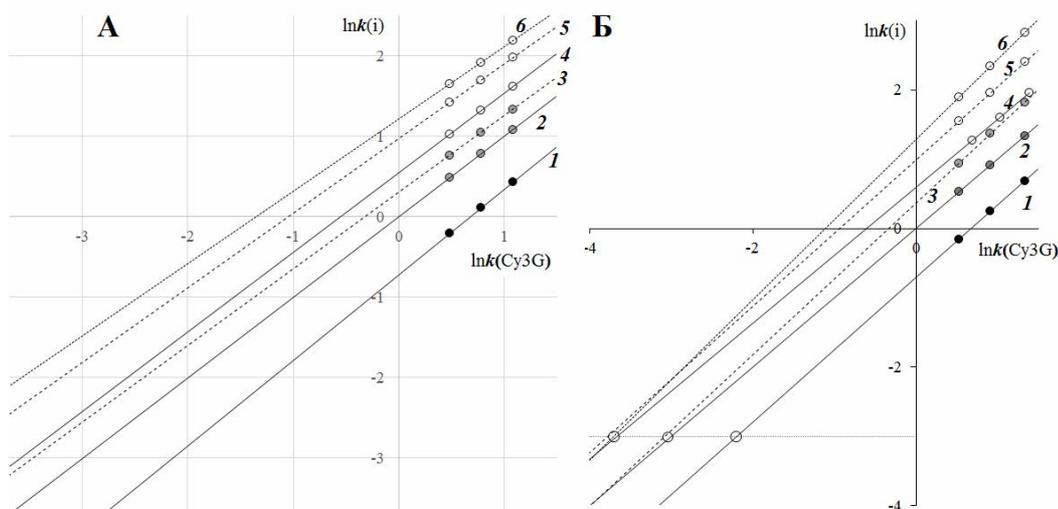


Рис. 1. Карта разделения 3-глюкозидов шести антоцианидинов
 А - колонка: 4.6×150 мм, MCI Gel CNP20/C04 (4 мкм); Б - колонка: 4.6×250 мм, Symmetry® C18, 5 мкм; элюенты системы «вода - ацетонитрил – 10 об.% муравьиной кислоты».
 3-глюкозиды: 1 – дельфинидина (Dp3G); 2 - цианидина (Cy3G); 3 – петунидина (Pt3G);
 4 – пеларгонидина (Pg3G); 5 – пеонидина (Pn3G); 6 – мальвидина (Mv3G).

Относительно параметров a_1 линейной зависимости относительного удерживания (реперное соединение – Cy3G) в координатах логарифмов факторов удерживания ($\ln k(i)$) антоцианов по уравнению (1):

$$\ln k(i) = a_0 + a_1 \cdot \ln k(\text{Cy3G}) \quad (1)$$

можно обнаружить некоторые принципиальные различия между свойствами сопоставляемых фаз. Так, например, в ряду Pg3G – Cy3G – Dp3G в случае C18-фазы параметр a_1 растет на 0.020 и 0.044, как и при переходе от Pn3G к Pt3G – на 0.035. Это логично для «неполярного» удерживания: несмотря на рост полярности в этом направлении при последовательном добавлении ОН-групп должна увеличиваться сумма энергий дисперсионных взаимодействий вследствие простого увеличения числа атомов. Добавление ОСН₃-групп (т.е. добавление пяти атомов в молекулу сорбата) в кольцо В антоцианов приводит во всех случаях к более чем вдвое большему росту параметра a_1 – на величины от 0,077 до 0.099.

В случае фазы II в ряду Pg3G – Cy3G – Dp3G a_1 также последовательно возрастает, но добавление СН₃О-группы приводит к уменьшению этого параметра так, как если бы её введение стерически мешало сорбции антоцианов.

Найденные различия могут свидетельствовать в пользу принципиально различных механизмов сорбции антоцианов на сопоставляемых фазах, несмотря на общее свойство – рост удерживания с ростом гидрофобности аналитов.

Хроматограммы смеси 3-глюкозидов на фазе I и на фазе II представлены на рис.2; они свидетельствуют о том, что полимерная колонка по эффективности разделения антоцианов не уступает традиционной фазе (полуширины пиков сопоставимы) и может заменить химически модифицированные силикагели.

Для дальнейшего сопоставления удерживания антоцианов на сопоставляемых фазах была определена стандартная энтальпия переноса аналитов с подвижной фазы на стационарную (или энтальпия сорбции), подтвердившие заметные различия в свойствах стационарных фаз I и II, табл.1. Для расчета термодинамических параметров в ВЭЖХ обычно используют уравнение (2) [7]:

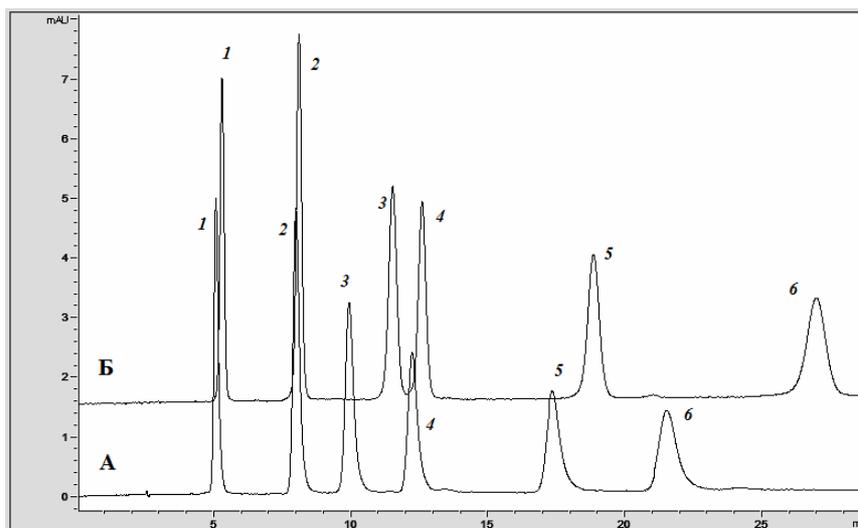


Рис. 2. Разделение 3-глюкозидов шести антоцианидинов на двух типах стационарных обращенных фаз

А - колонка: 4.6×150 мм, MCI Gel CHP20/C04 (4 мкм); Б - колонка: 4.6×250 мм, Symmetry® C18, 5 мкм; элюент «вода – 7 об.% ацетонитрила – 10 об.% муравьиной кислоты», 1 мл/мин; 40°C, 515 нм. 3-глюкозиды: 1 – дельфинидина (Dp3G); 2 - цианидина (Cy3G); 3 – петунидина (Pt3G); 4 – пеларгонидина (Pg3G); 5 – пеонидина (Pn3G); 6 – мальвидина (Mv3G).

$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H_T^\circ}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_T^\circ}{R} + \ln \phi, \quad (2)$$

где ΔH_T° и ΔS_T° - стандартные энтальпия и энтропия переноса антоцианов, ϕ - так называемое фазовое соотношение колонки.

Данное уравнение применимо в том случае, если в используемом интервале температур не изменяется механизм сорбции, и если при этом изменением энтальпии и энтропии можно пренебречь. Однако правомочность предположения о том, что логарифм фазового соотношения постоянен при изменении температуры, в лучшем случае, не очевидна.

Таблица. Стандартная энтальпия переноса антоцианов из подвижной фазы в стационарную при $T = 313 \text{ K}$ в подвижной фазе - 10 об.% муравьиной кислоты и 7 об.% ацетонитрила в воде

№	Антоциан	ΔH° , кДж/моль для стационарных фаз:				
		MCI Gel CHP20/C04			Symmetry® C18	
		V_0 (урацил)	V_0 (NO_3^-)	V_0^*	V_0	V_0^*
1	Dp3Glu	-25.7	-25.5	-26.0	-29.0	-29.2
2	Cy3Glu	-25.4	-25.2	-25.6	-28.9	-29.2
3	Pt3Glu	-24.2	-23.4	-24.5	-31.4	-31.6
4	Pg3Glu	-25.2	-25.2	-25.5	-29.8	-30.1
5	Pn3Glu	-23.8	-23.8	-24.0	-30.9	-31.1
6	Mv3Glu	-23.1	-23.0	-23.3	-32.9	-33.1

* - поправка на расширение подвижной фазы.

Строго говоря, в хроматографии надежно определяется только время удерживания аналита, $t_R(i)$, - все остальные расчеты основаны исключительно на допущениях и их надежность в лучшем случае не очевидна. Так, для всех расчетов необходимо знание так называемого «мертвого» времени колонки, t_M . Для антоцианов невозможно использовать метод расчета, основанный на оценке удерживания гомологов, ввиду отсутствия таковых для антоцианов, поэтому в данной работе в качестве метчика мертвого объема мы использовали урацил [8] – результаты представлены в первых колонках для каждой из фаз.

Исследуя изменение расчетного значения энтальпии при изменении мертвого времени, можно оценить устойчивость полученных данных как следствие неопределенности погрешности в определении мертвого времени колонки. Так, уменьшение V_0 на 2% (при использовании для его оценки нитрат-иона вместо урацила) привело к уменьшению ΔH^0 менее, чем на 1%, что свидетельствует в пользу хорошей устойчивости результатов к неопределенности в надежности определения мертвого объема.

Наконец, следует учитывать еще один фактор. Он связан с тем, что, как отмечалось ранее [9] использование фазового соотношения колонки вместо мольного соотношения термодинамически не корректно. Так, в первом приближении можно пренебречь изменением объема пор сорбента при росте температуры, но вследствие заметного расширения органических растворителей при этом число моль подвижной фазы должно уменьшиться, поэтому вместо константы $\ln \phi$ следует использовать зависящий от температуры логарифм мольного отношения, $\ln N(T)$.

$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H_T^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_T^0}{R} + \ln N(T) \quad (3)$$

Отметим, что для исключения вклада в зависящую от температуры функцию $\ln N(T)$ при невозможности определения истинного значения мольного соотношения достаточно определить относительное изменение логарифма в предположении, что основной вклад в этот параметр вносит изменение количества подвижной фазы в колонке с ростом температуры. Для этого мы провели исследования по изменению объема, занимаемого одним и тем же количеством элюента при температурах 30 ÷ 60°C (в диапазоне измерения времен удерживания аналитов, использованном в данной работе). Это позволило рассчитать относительное изменение числа моль подвижной фазы при каждой из температур и исключить полученное число из логарифма фактора удерживания по уравнению (4).

$$\ln k(i) - \ln \frac{N_V(T)}{N_V(303)} = -\frac{\Delta H_T^0}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S_T^0}{R} + const \quad (4)$$

где $N_V(T)$ – число моль подвижной фазы, занимающей при температуре T некоторый объем V ; $N_V(303)$ – число моль подвижной фазы, занимающей при температуре $T=303$ К тот же объем V .

Как видно из представленных в табл. данных, эта поправка приводит к более заметным корректировкам энтальпии, хотя назвать ее критической в данном случае нельзя, поэтому можно анализировать величины стандартной энтальпии сорбции аналитов без опасений за корректность полученных результатов. Сопоставление энтальпий сорбции антоцианов позволяет сделать ряд важных выводов. Во-первых, - о том, что энтальпия сорбции антоцианов на традиционной обращенной фазе в среднем на 20% больше (по модулю), чем на полимерной фазе, т.е. число парных дисперсионных взаимодействий больше на фазе I. Поэтому механизм сорбции

антоцианов на C18 фазах должен включать, по крайней мере, частичное погружение антоцианов в стационарную фазу, что исключено для фазы II.

Во-вторых, различие между энтальпиями сорбции использованных в работе антоцианов для каждой из фаз не превышает 10%, на основании чего можно предположить, что основной вклад в удерживание вносят дисперсионные взаимодействия со стационарной фазой одинаковой основной части молекул (атомы идентичных по строению колец А и С, глюкозидного радикала и частично – кольца В), при этом вклад в это свойство различающихся (одного или двух) заместителей кольца В относительно невелик и различен для фаз I и II. Так, на традиционной C18 фазе наиболее экзотермичной является сорбция 3-глюкозида мальвидина, из чего следует, что метокси-группа повышает липофильность соединений, что согласуется с увеличением числа атомов в молекуле (т.е. суммы энергии дисперсионных взаимодействиях между сорбатом и сорбентом). Это подтверждается и тем, что немногим меньшее (по модулю) значение имеет энтальпия сорбции пеоницина и петунидина, содержащих по одной метокси-группы в структуре. Энтальпия сорбции мальвидин-3-глюкозида на фазе II оказывается, наоборот, наименьшей, тогда как наиболее экзотермическими оказываются процессы переноса с подвижной фазы на стационарную антоцианов с гидроксильными группами (Dp3G, Cy3G) и пеларгонидин-3-глюкозид. Это подтверждает различия в механизмах сорбции антоцианов на исследуемых фазах.

Заключение

Разделение антоцианов на традиционной C18 и полимерной (сополимер стирола и дивинилбензола) фазах осуществляется по различающимся механизмам, хотя общие черты разделения антоцианов сохраняются. Новая стационарная фаза по эффективности разделения не уступает традиционной, поэтому возможно ее использование для разделения антоцианов или других сорбатов в более жестких хроматографических условиях.

Список литературы

1. Prathap B., Dey A., Srinivasa rao G.H., Johnson P., Arthanariswaran P. A Review - Importance of RP-HPLC in Analytical Method Development // *Internat. J. Novel Trends in Pharm. Sci.* 2013. Vol. 3. P. 15-23.
2. Doyle C.A., Dorsey J.G. Reversed-Phase HPLC: Preparation and Characterization of Reversed-Phase Stationary Phases / In «Handbook of HPLC». Ed. Elena Katz [et al.]. *Chromatographic science*; Vol. 78. Marcel Dekker. Inc. 1998. P. 293-324.
3. Химия поверхностных соединений / Под ред. Г.В. Лисичкина. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2003. 592 с.
4. Kele M. Guiochon G. Repeatability and reproducibility of retention data and band profiles on reversed-phase liquid chromatography columns I. Experimental protocol // *J. Chromatogr. A.* 1999. Vol.830. P. 41–54.
5. Qu J.-B., Wan X.-Z., Zhai Y.-Q., Zhou W.-Q., Su Z.-G., Ma G.-H. A Novel stationary phase derivatized from hydrophilic gigaporous polystyrene-based microspheres for high-speed protein chromatography // *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 1216. P. 6511–6516.
6. 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.

7. Шатц В.Д., Сахартова О.В. Высокоэффективная жидкостная хроматография. Рига: Зинатне, 1988. С.85.

8. Engelhardt H., Muller H., Dreyer B. Is There a "True" Dead Volume for HPLC Columns? // Chromatographia. 1984. Vol.19. P. 240-244.

9. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживания в ВЭЖХ и термодинамика процессов разделения // Ж. физ. химии. 2006. Т.80, №7. С. 1333-1335.

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н. профессор кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

Макаревич Сергей Леонидович – аспирант кафедры общей химии НИУ БелГУ, Белгород

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

Доронин Андрей Геннадьевич – студент 4 курса биолого-химического факультета НИУ БелГУ, Белгород

Селеменев Владимир Федорович - зав.кафедрой аналитической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж

Deineka Victor I. - Dr.Sci. (Chemistry). Professor. Belgorod National Research University. Belgorod. E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Makarevich Sergey L. - Postgraduate of Chemistry Belgorod National Research University. Belgorod. E-mail: sergmazay@yandex.ru

Deineka Ludmila A. - Ph.D. (Chemistry) Belgorod National Research University. Belgorod. E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Doronin Andrei G. - Student of Belgorod National Research University. Belgorod. E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Selemenev Vladimir F. - doktor of Chemistry, professor, head of Department of Analytical Chemistry, Voronezh State University, Voronezh