

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ ПРОЦЕССОВ  
РАЗДЕЛЕНИЯ. ХРОМАТОГРАФИЯ

УДК 544.723.2

ОСОБЕННОСТИ УДЕРЖИВАНИЯ ДИЭФИРОВ ЛЮТЕИНА  
НА С16-СТАЦИОНАРНЫХ ФАЗАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ДИАМЕТРАМИ ПОР

© 2023 г. В. И. Дейнека<sup>а,\*</sup>, С. М. Староверов<sup>б,с</sup>, Г. Г. Васияров<sup>с</sup>,  
Т. Г. Буржинская<sup>а</sup>, И. П. Блинова<sup>а</sup>

<sup>а</sup>Белгородский государственный национальный исследовательский университет, 308015, Белгород, Россия

<sup>б</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Россия

<sup>с</sup>Акционерное общество “Биохиммак СТ”, 119234, Москва, Россия

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

Поступила в редакцию 26.12.2022 г.

После доработки 01.02.2023 г.

Принята к публикации 02.02.2023 г.

Показано, что “мертвое” время колонки, определенное по удерживанию урацила больше “мертвого” времени, определенного по удерживанию гомологов — диэфиров лютеина для С16-обращенных фаз на трех колонках с сорбентами с различным диаметром пор (80, 110 и 160 Å). Это подтверждает известное предположение о том, что при превышении размера молекулы сорбата 10% размера диаметра пор возможны проблемы с удерживанием сорбата. Для молекул меньшего размера (алкилбензоатов) “мертвый” объем, определенный по удерживанию урацила оказался меньше “мертвого” времени, определенного по удерживанию этих гомологов на тех же стационарных фазах, подтверждая, что основная причина найденного эффекта — размерный фактор.

**Ключевые слова:** особенности удерживания, “мертвое” время, диаметр пор сорбентов, диэфиры лютеина, урацил, алкилбензоаты

**DOI:** 10.31857/S0044453723080034, **EDN:** QTRNХЕ

Коммерчески доступные “мономерные” обращенно-фазовые сорбенты представляют собой функционализированные алкилдиметилхлорсиланом пористые силикагели [1]. При этом обычно для синтеза используются силаны с радикалами  $C_nH_{2n+1}$  нормального строения различной длины, но наиболее востребованными продуктами оказываются октадецильные (С18) сорбенты [2]. По способности удерживать и разделять смеси веществ стационарные С18-фазы различных производителей могут существенно различаться [3] по нескольким причинам. Во-первых, сорбенты могут быть получены с различной степенью силилирования поверхности [2, 3]. Во-вторых, они могут различаться по активности остаточных силанольных групп [3]. В-третьих, существенное влияние на свойства стационарных фаз имеют их геометрические характеристики — удельная поверхность и пористость [4]. По этой причине предложен целый ряд различных вариантов характеристики обращенных фаз [5], включающий каротиноидный тест [6] для оценки гидрофобности и селективности к форме (на примере разделения полностью *транс*- и 13*Z*-изомера β-каротина). В работе [7] исследуя удерживание лютеина, ликопина и β-каротина пришли к выводу о том, что наибольшее

удерживание каротиноидов наблюдается для С18-фаз с размером пор более 100 Å. Но более подробное влияние размера пор на параметры удерживания некоторых каротиноидов, имеющих линейные размеры более 30 Å было исследовано в работе [8] на примере линейки гексадецильных фаз марки Диасфер с порами 80, 110 и 200 Å. Интерес к таким исследованиям связан с предположением о том, что при длине сорбата, превышающей на 10% диаметр пор возможны эффекты, связанные с размерным фактором [9].

Настоящая работа является продолжением исследования влияния размера пор на удерживание каротиноидов.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Диэфиры лютеина экстрагировали из высушенных лепестков цветков *Tagetes erecta*, выращенных в Белгороде в 2022 г. Экстракцию производили растиранием растительного материала под слоем ацетона в фарфоровой ступке вне доступа прямого солнечного света. Экстракт отделяли от остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Полученный экстракт разбавляли ацетонитрилом в 4 раза и очищали методом твердофаз-

ной очистки на патронах ДИАПАК C18. Диэфиры лютеина реэкстрагировали с патрона ацетонном, разбавляли в 2 раза ацетонитрилом перед хроматографированием. В работе использованы также алкилбензоаты, синтезированные из соответствующих спиртов и бензойной кислоты.

Для заполнения хроматографических колонок синтезировали сорбенты на базе трех сферических силикагелей [8] с различными диаметрами пор (традиционно указываются в Å после марки сорбента) и с размером частиц (указываются в мкм перед обозначением гексадецильного радикала):

- 4.0 × 250 мм Диасфер 80-5C16;
- 4.6 × 250 мм Диасфер 110-5C16;
- 4.0 × 250 мм Диасфер 200-5C16.

Разделение каротиноидов осуществляли на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматограммы регистрировали при длине волны детектора 445 нм, хранили и обрабатывали в программе Agilent ChemStation.

Мертвое время хроматографической системы определяли двумя способами: а) по удерживанию урацила и б) по удерживанию гомологов — диэфиров лютеина по уравнениям:

$$t_R(n+2) = at_R(n) + b, \quad (1)$$

где  $t_R(n)$  и  $t_R(n+2)$  — времена удерживания последовательных диэфиров лютеина. Коэффициенты уравнения  $a$  и  $b$  определяли в MS Excel, и мертвое время рассчитывается по формуле:

$$t_0 = \frac{-b}{a-1}. \quad (2)$$

Уравнение (1) вытекает из требования одинакового изменения логарифмов факторов удерживания членов гомологического ряда при добавлении метиленовой (или двух метиленовых) групп:

$$\lg k(n+2) = \lg k(n) + \Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2),$$

где  $\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2)$  — вклад данных групп в суммарное удерживание (инкремент). В таком случае получаем уравнение:

$$\frac{k(n+2)}{k(n)} = \frac{t_R(n+2) - t_0}{t_R(n) - t_0} = 10^{\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2)}, \quad (3)$$

из которого следует уравнение:

$$t_R(n+2) = 10^{\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2)} t_R(n) - \left(10^{\Delta(\text{CH}_2-\text{CH}_2)} - 1\right) t_0, \quad (4)$$

и далее — уравнения (1) и (2).

Исследования были выполнены с использованием подвижных фаз, составленных из этилацетата (50 или 55 об. %) и ацетонитрила (50 и 45 об. %) при исследовании удерживания диэфиров лютеина и составленных из ацетонитрила (60 об. %) и дистиллированной воды (40 об. %) при исследовании

удерживания эфиров (этилового, пропилового и бутилового) бензойной кислоты. При хроматографировании экстрактов ксантофиллов колонки защищали предколонкой 4.0 × 10 мм Кромасил 100–5C18.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Считается, что в различных сорбентах могут существовать цилиндрические, конические, типа чернильницы и щелеобразные поры [10–12], к которым следует добавить и галерейные поры [13]. При этом вход в существующие в сорбенте мезопоры может быть уже, чем в самых широких местах этих пор (для существования гистерезиса в изотермах низкотемпературной адсорбции азота), что накладывает еще большие ограничения на допустимый размер сорбатов. В этом случае для молекул диэфиров ксантофиллов (с линейным размером больше 30 Å) диффузия внутрь пор может быть стерически сильно затрудненной (как и выход из этих пор), при этом массообмен будет серьезно замедляться вследствие внутренней диффузии из поры в пору в галерейных порах. Следует также иметь в виду, что средний диаметр пор после химического модифицирования центральными радикалами заметно уменьшается. Поэтому становится понятным свойство удерживания каротиноидов, найденное в работе [14], по которому “мертвое” время колонки, определенное по урацилу,  $t_0(u)$ , оказывается меньше “мертвого” времени, рассчитанного по удерживанию гомологов,  $t_0(h)$ . И действительно, молекулы каротиноидов (но не урацила) не способны свободно проникать в узкие места пор. Следовательно, при росте среднего диаметра пор различие между  $t_0(u)$  и  $t_0(h)$  для каротиноидов должно уменьшаться.

Результаты определения “мертвого” времени по удерживанию урацила и по расчетному методу по удерживанию диэфиров лютеина из экстракта цветков *Tagetes erecta* для трех хроматографических систем с различными размерами пор представлены в табл. 1.

Для исследования был выбран очищенный методом твердофазной экстракции экстракт цветков бархатцев, хроматограммы которого содержали пять различных диэфиров с ранее определенным составом [15] — от лаурата-миристата до пальмитата-стеарата лютеина, рис. 1. Из представленных данных следует, что чем меньше диаметр пор, тем больше различие (и соотношение) между двумя величинами “мертвого” времени, что может быть следствием только меньшей доступности некоторых участков поверхности силикагеля для каротиноидов по сравнению с урацилом. Отметим, что при этом и среднее квадратичное отклонение расчетного “мертвого” времени по гомологам для последовательных

**Таблица 1.** Сопоставление результатов определения “мертвого” времени по удерживанию урацила и по удерживанию диэфиров лютеина ( $n = 4$ )

№	Хроматографическая система	Способ определения	Среднее $t_0$ , мин	$\sigma_r$ , %
1	250 × 4.0 мм Диасфер 80-5C16 <sup>3</sup>	По урацилу	2.70	0.1
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	1.44 1.88	6.9
2	250 × 4.6 мм Диасфер 110-5C16 <sup>4</sup>	По урацилу	2.95	<0.1
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	2.40 1.23	2.3
3	250 × 4.0 мм Диасфер 200-5C16 <sup>3</sup>	По урацилу	2.34	0.2
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	2.10 1.12	1.2

Примечания. Все колонки были защищены предколонкой 10 × 4.6 мм Кромасил 110-5C18,  $\sigma_r$  – относительное средне-квадратичное отклонение, № 1 и № 3 – подвижная фаза 50 об. % этилацетата и 50 об. % ацетонитрила, № 2 – подвижная фаза 55 об. % этилацетата и 45 об. % ацетонитрила.

хроматографирований оказывается наибольшим для колонки с наименьшим объемом пор (при  $R^2$  не менее 0.99999 для всех параллельных определений для всех исследованных хроматографических систем) и существенно выше, чем для результатов определения “мертвого” времени по урацилу.

Полученные результаты для корректности были сопоставлены с аналогичными результатами, определенными на тех же колонках, но с исполь-

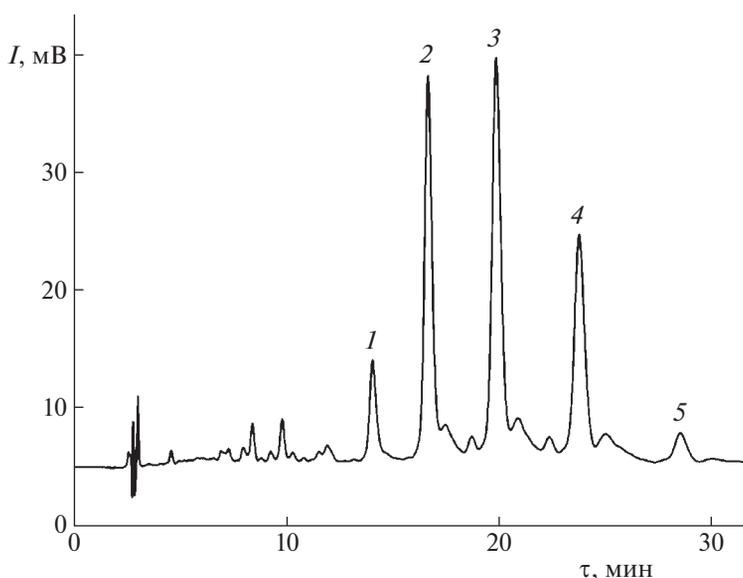
**Таблица 2.** Сопоставление результатов определения “мертвого” времени по удерживанию урацила и по удерживанию эфиров бензойной кислоты ( $n = 4$ )

№	Хроматографическая система	Способ определения	Среднее $t_0$ , мин	$\sigma_r$ , %
1	250 × 4.0 мм Диасфер 80-5C16	По урацилу	1.34	0.2
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	1.78 0.80	0.4
2	250 × 4.6 мм Диасфер 110-5C16	По урацилу	2.24	0.1
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	2.73 0.82	0.3
3	250 × 4.0 мм Диасфер 200-5C16	По урацилу	1.96	0.1
		По гомологам $t_0(u)/t_0(h)$	2.15 0.91	0.2

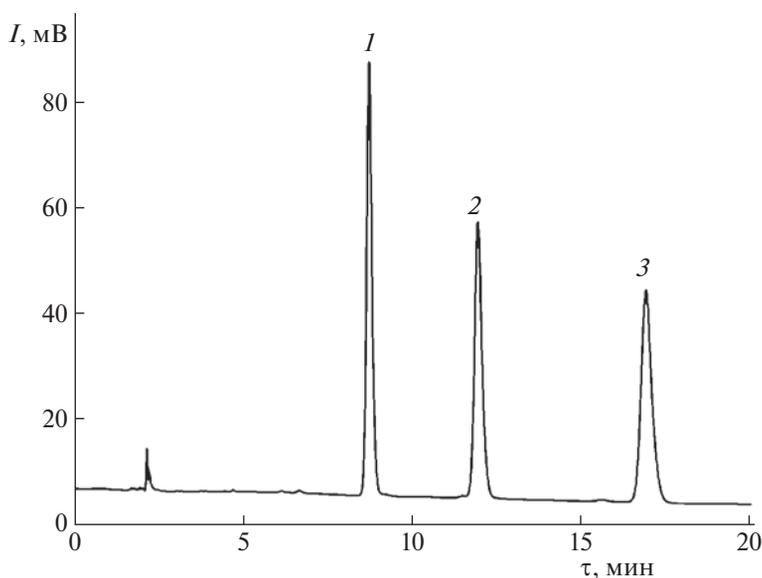
Примечания. Подвижная фаза 60 об. % ацетонитрила и 40 об. % воды.

зованием соединений с меньшими размерами. Для расчета “мертвого” времени по удерживанию гомологов были использованы три эфира бензойной кислоты – этиловый, пропиловый и бутиловый, рис. 2. Но при этом пришлось изменить и состав подвижной фазы. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Во всех случаях “мертвое” время, определенное по урацилу оказалось меньше, чем по удержи-



**Рис. 1.** Разделение диэфиров лютеина на колонке 250 × 4.6 мм Диасфер-110-5C16 в элюенте 60 об. % этилацетата и 40 об. %. Диэфиры лютеина: 1 – лаурат-миристан, 2 – димиристан, 3 – миристан-пальмитат, 4 – дипальмитат, 5 – пальмитат-стеарат.



**Рис. 2.** Разделение алкилбензоатов на колонке  $250 \times 4.6$  мм Диасфер-110-5C16 в элюенте 60 об. % ацетонитрила и 40 об. % воды. Эфиры бензойной кислоты: 1 – этилбензоат, 2 – пропилбензоат, 3 – бутилбензоат.

ванию эфиров бензойной кислоты, что логично при предположении о не проникновении урацила и при проникновении алкилбензоатов в привитую обращенную фазу. Иначе говоря, алкилбензоаты удерживаются по распределительному механизму, тогда как урацил – по механизму выталкивания на привитую обращенную фазу. В данном случае повторяемость “мертвого” времени, рассчитанного по гомологам, оказалась существенно более надежной, чем при использовании диэфиров лутеина, и соотношение  $t_0(u)$  к  $t_0(h)$  было близким для трех колонок.

Таким образом, приведенные данные подтверждают влияние размеров пор на их доступность для молекул сорбатов относительно больших размеров.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Verzele M., Mussche P.* // J. Chromatogr. 1983. V. 254. P. 117.
2. *Kimata K., Iwaguchi K., Onishi S. et al.* // J. Chromatogr. Sci. 1989. V. 27. P. 721.
3. *Walters M.J.* // J. Assoc. Anal. Chem. 1987. V. 70. P. 465.
4. *Godinho J.M., Naese J.A., Toler A.E. et al.* // J. Chromatogr. A. 2020. V. 1634. 461678.
5. *Žuvela P., Skoczylas M., Liu J.J. et al.* // Chem. Rev. 2019. V. 119. P. 3674.
6. *Lesellier E., West C., Tchaplal A.* // J. Chromatogr. A. 2006. V. 1111. P. 62.
7. *Ligor M., Kováčova J., Gadzała-Kopciuch R.M. et al.* // Chromatogr. 2014. V. 77. P. 1047.
8. *Дейнека В.И., Староверов С.М., Васяров Г.Г. и др.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2021. Т. 21. № 6. С. 819.
9. *Schuster S.A., Henry R.A.* // LCGC North America. 2018. V. 36. P. 134.
10. *Zdravkov B.D., Čermák J.J., Šefara M. et al.* // Central Eur. J. Chem. 2007. V. 5. P. 385.
11. *Horvat G., Pantić M., Knez Ž. et al.* // Gels. 2022. V. 8. P. 438.
12. *Kaneko K.* // J. Membrane Sci. 1994. V. 96. P. 59.
13. *Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Сидоров А.Н. и др.* // Физикохимия поверхности и защита материалов 2017. Т. 53. С. 262.
14. *Дейнека В.И., Буржинская Т.Г., Дейнека Л.А.* // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22. № 4. С. 393.
15. *Лапишова М.С., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. и др.* // Журн. аналит. химии. 2013. Т. 68. С. 1130.