



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544.723.2:544.32

doi: 10.17308/sorpchrom.2023.23/11141

Особенности определения энтальпии сорбции антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ

Виктор Иванович Дейнека^{1✉}, Андрей Николаевич Чулков²,
Елена Юрьевна Олейниц¹, Иван Станиславович Пронин¹,
Ирина Петровна Блинова¹, Ирина Ивановна Тыняная¹,
Ярослава Юрьевна Саласина¹, Владимир Федорович Селеменев³

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия, deineka@bsu.edu.ru✉

²Белгородское отделение Центра оценки качества зерна, Белгород, Россия

³Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

Аннотация. Определены изменения термодинамических параметров переноса некоторых антоцианов из подвижной фазы на стационарную по упрощенному способу. Исследования проводили в условиях обращенно-фазовой хроматографии на колонке марки Symmetry C18 в подвижной фазе, содержащей 8 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Ранее было установлено, что удерживание антоцианов зависит от давления на входе в хроматографическую колонку, поэтому для получения правильных результатов при смене температуры необходимо изменять скорость подачи подвижной фазы для достижения того же давления. При этом получаемые параметры не зависят от того, при каком давлении на входе в колонку они были получены. Поэтому в предлагаемом в настоящей работе упрощенном (более быстром) способе измерения осуществляются только при одном давлении на входе в колонку. Однозначно определяемые из экспериментальных данных энтальпии переноса 3-глюкозидов шести основных природных антоцианидинов относительно мало различаются между собой: наименьшая энтальпия найдена для пеонидин-3-глюкозида (-27.9 ± 0.3 кДж/моль), а наибольшая – для дельфинидин-3-глюкозида (-33.1 ± 0.3 кДж/моль), при этом закономерности изменения этого параметра при добавлении гидрокси- или метокси- групп не являются отчетливо выраженными. Изменение энтропии, $\Delta\Delta S^\circ$ параметров для пеларгонидин-3-глюкозида показало, что для антоцианов наблюдается энтальпийно-энтропийная компенсация, объясняющая трудности выяснения влияния добавляемых функциональных групп на термодинамические параметры. Для исключения эффекта указанной компенсации предлагается рассчитывать $\Delta\Delta G^\circ$, как параметра, рассчитываемого по разности (для удаления параметра, зависящего от фазового соотношения) натуральных логарифмов факторов удерживания анализируемого вещества и вещества сравнения – пеларгонидин-3-глюкозида. Как и следовало предполагать, в этом случае добавление гидрофильных гидрокси-групп приводит (с учетом знака) к росту относительное изменение изобарно-изотермического потенциала $\Delta\Delta G^\circ$ на ~ 1.7 кДж/моль на одну группу, а добавление гидрофобных метокси-групп, наоборот, – к уменьшению $\Delta\Delta G^\circ$ на ~ -1.0 кДж/моль на одну группу с неплохой аддитивностью вкладов групп (± 0.1 кДж/моль). Показано также, что $\Delta\Delta G^\circ$ возрастает на 2.6 ± 0.2 кДж/моль при переходе от 3-глюкозидов к 3,5-диглюкозидам пяти антоцианидинов. Рассчитаны также изменения $\Delta\Delta G^\circ$ при усложнении углеводного радикала в положении 3.

Ключевые слова: антоцианы, термодинамические параметры удерживания, обращенно-фазовая ВЭЖХ, зависимость удерживания от давления, прямые расчеты изменения изобарно-изотермического потенциала.

Благодарности: работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания ВУЗам в сфере научной деятельности на 2023-2025 годы, проект № FZGU-2023-0009

Для цитирования: Дейнека В.И., Чулков А.Н., Олейниц Е.Ю., Пронин И.С., Блинова И.П., Тыняная И.И., Саласина Я.Ю., Селеменев В.Ф. Особенности определения энтальпии сорбции антоцианов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ // Сорбционные и хроматографические процессы. 2023. Т. 23, № 2. С. 171-181. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11141>



Original article

Peculiarities of the determination of the sorption enthalpy of anthocyanins under conditions of reverse-phase HPLC

Victor I. Deineka¹✉, Andrey N. Chulkov², Elena Yu. Oleinits¹,
Ivan S. Pronin¹, Irina P. Blinova¹, Irina I. Tynyanaya¹,
Yaroslava Yu. Salasina¹, Vladimir F. Selemenev³

¹Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, deineka@bsu.edu.ru✉

²Belgorod branch "Center for assessing the quality of grain and products of its processing", Belgorod, Russian Federation

³Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Abstract. Changes in the thermodynamic parameters of the transfer of some anthocyanins from the mobile phase to the stationary phase were determined using a simplified method. The studies were carried out under conditions of reversed-phase chromatography on a Symmetry C18 column in a mobile phase containing 8 vol.% acetonitrile, 10 vol.% formic acid in water. It was previously found that the retention of anthocyanins depends on the pressure at the inlet to the chromatographic column, therefore, in order to obtain the correct results with a change in temperature, it is necessary to change the flow rate of the mobile phase to achieve the same pressure. In this case, the obtained parameters do not depend on the pressure at which they were obtained at the column inlet. Therefore, in the simplified (faster) method proposed in this study, measurements were carried out only at one pressure at the column inlet. The enthalpies of transfer of 3-glucosides of six main natural anthocyanidins, unambiguously determined from experimental data insignificantly differ from each other: the lowest enthalpy was found for peonidin-3-glucoside (-27.9 ± 0.3 kJ/mol), and the highest enthalpy was determined for delphinidin-3-glucoside (-33.1 ± 0.3 kJ/mol), while the patterns of change in this parameter upon the addition of hydroxy or methoxy groups were not clearly expressed. Entropy change, $\Delta\Delta S^\circ$ parameters for pelargonidin-3-glucoside showed that enthalpy-entropy compensation is observed for anthocyanins, which explains the difficulties in elucidating the effect of added functional groups on thermodynamic parameters. For the elimination of the effect of this compensation, it was proposed to calculate $\Delta\Delta G^\circ$, as a parameter calculated by the difference (for the removal of the parameter depending on the phase ratio) of the natural logarithms of the retention factors of the analyte and the reference substance - pelargonidin-3-glucoside. As expected, in this case the addition of hydrophilic hydroxy groups leads (taking into account the sign) to an increase in $\Delta\Delta G^\circ$ by ~ 1.7 kJ/mol per group, and the addition of hydrophobic methoxy groups, on the contrary, leads to a decrease in $\Delta\Delta G^\circ$ by ~ -1.0 kJ/mol per group with good additivity of group contributions (± 0.1 kJ/mol). It was also shown that $\Delta\Delta G^\circ$ increases by 2.6 ± 0.2 kJ/mol during the transition from 3-glucosides to 3,5-diglucosides of five anthocyanidins. Changes of $\Delta\Delta G^\circ$ for the more complex carbohydrate radical in position 3 were also calculated.

Keywords: anthocyanins, thermodynamic retention parameters, reverse phase HPLC, dependence of the retention on pressure, direct calculations of change in isobaric isothermal potential.

Acknowledgments: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation as part of a state order for universities in the field of scientific activity for 2023-2025, project no. FZGU-2023-0009

For citation: Deineka V.I., Chulkov A.N., Oleinits E.Yu., Pronin I.S., Blinova I.P., Tynyanaya I.I., Salasina Ya.Yu, Selemenev V.F. Peculiarities of the determination of the sorption enthalpy of anthocyanins under conditions of reverse-phase HPLC. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2023. 23(2): 171-181. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2023.23/11141>

Введение

Удерживание веществ в хроматографии и их разделение зависит от энергии их взаимодействия со стационарной фазой и с компонентами подвижной фазы. Анализ устанавливающегося равновесия между двумя фазами необходим для

обоснования теоретических моделей удерживания в хроматографии [1, 2]. К числу важных направлений такого анализа удерживания относят определение термодинамических характеристик переноса веществ с подвижной фазы на стационарную, для чего традиционно используют уравнение Вант Гоффа [3]:



$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \varphi, \quad (1)$$

где $k(i)$ – фактор удерживания сорбата i , ΔH^0 – изменение энтальпии переноса сорбата i из подвижной фазы на стационарную, ΔS^0 – изменение энтропии этого же процесса, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура, φ – фазовое соотношение колонки. При этом для расчета фактора удерживания необходимо определение t_0 , рассматриваемое как время удерживания не сорбируемого компонента:

$$k(i) = \frac{t_R(i) - t_0}{t_0}, \quad (2)$$

где $t_R(i)$ – время удерживания сорбата i .

Простые и хорошо известные уравнения (1) и (2) на самом деле не столь тривиальны. Так, ΔH^0 – физико-химический параметр, измеряемый по определению при некотором постоянном давлении [4]. В колоночной хроматографии при измерении времени удерживания давление на входе в колонку всегда отличается от давления на выходе, что необходимо для перемещения подвижной фазы. Но вследствие низкой сжимаемости жидкостей в жидкостной хроматографии это различие не принципиально. Тем не менее в ряде работ было установлено, что реально фактор удерживания в обращенно-фазовой ВЭЖХ зависит от давления на входе в колонку [5] не только для полимерных и олигомерных соединений, но и для молекул небольшого размера. Некоторые причины, приводящие к этому эффекту, обсуждены в работе [6]. Более того, в работе [7] нелинейность в графике Вант Гоффа в широком диапазоне температур связывают с возможными конформационными изменениями в стационарной C18-фазе при изменении температуры, вследствие чего величины «мертвого» объема могут быть различными для веществ различного строения.

Зависимость удерживания антоцианов от давления в условиях обращенно-фазовой хроматографии на «мономерной» C18-фазе была установлена в работе [8].

В этой работе было найдено, что натуральный логарифм фактора удерживания сорбата при постоянной температуре и относительно небольших давлениях (менее 200 бар) может быть аппроксимирован квадратичным уравнением:

$$\ln k(i) = b_0 + b_1 \cdot P + b_2 \cdot P^2, \quad (3)$$

где P – давление (избыточное) на входе в колонку.

Использование этого уравнения позволило рассчитать логарифмы факторов удерживания сорбатов при различных температурах, но при одинаковых расчетных давлениях на входе в колонку. Изменения энтальпий, рассчитанные при постоянных скоростях подвижной фазы, для каждого из 3-глюкозидов шести обычных природных антоцианидинов (дельфинидина, цианидина, пегунидина, пеларгонидина, пеонидина и мальвидина) различались на ~10%. Так, ΔH^0 рассчитанные при скоростях 0.8 и 0.2 см³/мин, например, для мальвидин-3-глюкозида составили -26.9 и -23.7 кДж/моль, соответственно. Но при расчете при одинаковых давлениях (либо 0, либо 50, либо 100 бар) для мальвидин-3-глюкозида получили очень близкие результаты (например, -22.3, -22.2 и -21.9 кДж/моль, соответственно).

Наличие логарифма фазового соотношения в уравнении (1) не позволяет рассчитать изменение энтропии для каждого из соединений. Оценка фазового соотношения по доле углерода в используемом сорбенте [9] не может быть признанной корректной, поскольку, во-первых, привитой слой не эквивалентен жидкой фазе алканов вследствие неплотной прививки на поверхности силикагеля. Даже при максимальной степени дериватизации силикагеля плотность прививки силанольных групп примерно вдвое меньше, чем упаковка n -алканов в твердом состоянии [10]. Во-вторых, плотность прививки алкильных групп на поверхности C18-сорбентов может быть различной, и удерживание при этом изменяется [11]. Но можно вследствие вычитания $\ln \varphi$ оценить

изменение как энтропии, $\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, так и энтальпии, $\Delta\Delta H^0(i \rightarrow j)$, относительно вещества, принятого в качестве вещества сравнения.

Второе уравнение предполагает использование t_0 , но вопрос определения «мертвого» времени [12] очень сложный, и этот параметр зависит от механизма удерживания сорбатов. Так для веществ, проникающих в привитую фазу, использование времени удерживания несорбируемого компонента не приемлемо.

Таким образом, расчет энтальпии переноса сорбатов из подвижной фазы на стационарную по традиционной схеме (при постоянной скорости подвижной фазы без учета давления на входе в колонку) может привести к ошибочным результатам. Но способ определения термодинамических параметров, использованный в работе [8] время затратный, поэтому цель настоящего исследования - разработка более быстрого способа определения термодинамических параметров переноса антоцианов с подвижных фаз на стационарные.

Экспериментальная часть

Для сокращенного обозначения антоцианов в работе использованы буквенные обозначения: 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'-метоксифлавилий), Pn – пеонидин (3,5,7,4'-тетрагидроксо-3'-метоксифлавилий), Mv – мальвидин (3,5,7,4'-тетрагидроксо-3',5'-диметоксифлавилий). Добавление к аббревиатуре 3Glu или 3,5diGlu обозначает 3-глюкозиды или 3,5 диглюкозиды соответствующих агликонов; три 3-диглюкозида обозначены: 3Rut – 3-рутинозид, 3(6"-рамнозилглюкозид); 3Sopho – 3-софорозид, 3(2"-глюкозилглюкозид), 3Sam – 3-самбубиозид, 3(2"-ксилозилглюкозид); два 3-триглюкозида обозначены: 3GRut – 3(2"-рамнозилрутинозид); 3XRut – 3(2"-ксилозилрутинозид).

В работе использовали экстракты антоцианов из природных растительных материалов: листьев багряника канадского (*Cercis canadensis*) – как источник Dp3Glu, Cy3Glu, Pt3Glu, Pn3Glu и Mv3Glu [13], плодов барбариса обыкновенного (*Berberis vulgaris*) – как источника Pg3Glu [14], плодов винограда японского (*Vitis coignetiae*) – как источника 3,5-диглюкозидов [15], вишни обыкновенной (*Prunus cerasus*) – как источника Cy3Sopho и Cy3GRut [16], и черной малины (*Rubus occidentalis*) – как источника Cy3Sam и Cy3XRut [17]. Экстракты в 0.1 М водном растворе соляной кислоты хранили в морозильной камере в пластиковой посуде.

Разделение антоцианов осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Хроматограммы записывали при 515 нм, рис. 1. В работе использовали хроматографическую колонку 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм); основная подвижная фаза 8 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Для сопоставления изменения изобарно-изотермических потенциалов переноса 3-глюкозидов антоцианидинов определяли зависимость их удерживания от концентрации ацетонитрила в двух элюентных системах: (а) 6 – 10 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде и (б) 15 – 18 об.% ацетонитрила, 0.5 об.% H₃PO₄ в воде. Объем вводимой пробы 20 мкл. Мертвое время определяли по удерживанию щавелевой кислоты. Хроматограммы регистрировали и обрабатывали программой ChemStation, а расчеты выполняли в MS Excel.

Выход хроматографической системы в режим контролировали по полному совпадению двух последовательно записанных хроматограмм; это обеспечивает погрешность в определении $\ln k$ не больше 0.002. После смены температуры скорость подачи подвижной фазы снижали до достижения давления на входе в колонку, равного использованному в

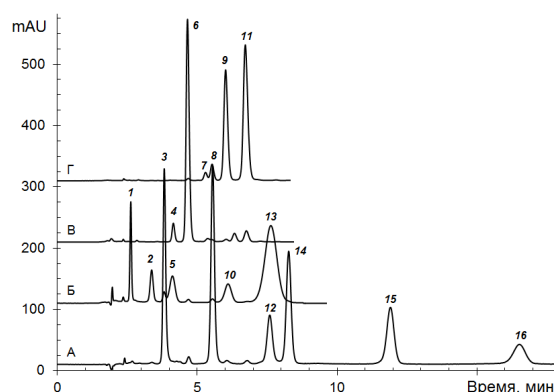


Рис. 1. Разделение антоцианов экстрактов А – листьев багрянника канадского и плодов барбариса; Б – плодов японского винограда; В – плодов вишни; Г – плодов черной малины.

Антоцианы: 1 – Dp3,5diGlu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Dp3Glu; 4 – Cy3Sopho; 5 – Pt3,5diGlu; 6 – Cy3GRut; 7 – Cy3Sam; 8 – Cy3Glu; 9 – Cy3XRut; 10 – Pn3,5diGlu; 11 – Cy3Rut; 12 – Pt3Glu; 13 – Mv3,5diGlu; 14 – Pg3Glu; 15 – Pn3Glu; 16 – Mv3Glu.

Fig. 1. Separation of anthocyanins extracts A – leaves of *Cercis canadensis* and barberry fruits; B – fruits of Japanese grapes; B – cherry fruits; G – black raspberry fruits
 Anthocyanins: 1 – Dp3,5diGlu; 2 – Cy3,5diGlu; 3 – Dp3Glu; 4 – Cy3Sopho; 5 – Pt3,5diGlu; 6 – Cy3GRut; 7 – Cy3Sam; 8 – Cy3Glu; 9 – Cy3XRut; 10 – Pn3,5diGlu; 11 – Cy3Rut; 12 – Pt3Glu; 13 – Mv3,5diGlu; 14 – Pg3Glu; 15 – Pn3Glu; 16 – Mv3Glu.

предыдущем опыте с погрешностью не более 1 бар.

Обсуждение результатов

Поскольку в работе [8] было показано, что результаты расчета термодинамических характеристик практически одинаковы при использовании данных по удерживанию антоцианов при любом постоянном давлении, то достаточно определить удерживание при всех температурах при использовании скоростей подачи подвижной фазы, обеспечивающих одинаковое давление на входе в колонку. Корректность использования щавелевой кислоты в качестве неудерживаемого соединения для определения t_0 связана с тем, что антоцианы удерживаются по поплавному механизму [18], в котором только агликон проникает в привитой слой, а гидрофильный углеводный заместитель остается на поверхности фазы.

Полученные результаты для 3-глюкозидов шести обычных природных агликонов представлены в табл. 1. В таблице использован еще один вариант сопоставления термодинамических параметров

сорбции антоцианов, корректно исключаяющий $\ln \phi$ – разность изобарно-изотермических потенциалов с использованием вещества сравнения (Pg3Glu), $\Delta \Delta G^0$:

$$\Delta \Delta G^0(i \rightarrow j) = \Delta \Delta H^0(i \rightarrow j) - T \cdot \Delta \Delta S^0(i \rightarrow j), \quad (4)$$

где i и j – сопоставляемые вещества. Отметим, что такой расчет совпал с результатами простого быстрого способа:

$$\Delta \Delta G^0(i \rightarrow j) = RT \ln k(j) - RT \ln k(i). \quad (5)$$

По представленным в табл. 1 данным можно сделать вывод о том, что добавление метокси- и гидрокси-групп в структуру Pg3Glu почти аддитивно складывается при расчетах изменения изобарно-изотермического потенциала и соответствует порядку элюирования антоцианов: $t_R(\text{Dp3Glu}) < t_R(\text{Cy3Glu}) < t_R(\text{Pt3Glu}) < t_R(\text{Pg3Glu}) < t_R(\text{Pn3Glu}) < t_R(\text{Mv3Glu})$.

Но роста (по модулю) энтальпий переноса всех шести 3-глюкозидов с подвижной на стационарную фазу в этом же порядке не найдено. Более того, для тройки антоцианов (Dp3Glu, Cy3Glu и Pg3Glu), для которых число полярных OH-групп в структуре кольца В уменьшается с 3 до 1,

Таблица 1. Результаты расчетов термодинамических параметров удерживания антоцианов в подвижной фазе 8 об. % ацетонитрила и 10 об. % муравьиной кислоты на колонке 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 мкм при постоянном давлении на входе в колонку

Table 1. The results of calculations of the thermodynamic parameters of the retention of anthocyanins in the mobile phase of 8 vol. % acetonitrile and 10 vol. % formic acid on a 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 μm column at constant column inlet pressure

№	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, Дж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	Dp3Glu	-33.1±0.3**	-4.9	-27.1	3.5
2	Cy3Glu	-29.2±0.3	-1.0	-8.4	1.6
3	Pt3Glu	-29.8±0.3	-1.6	-6.7	0.5
4	Pg3Glu	-28.2±0.3	0	0	0
5	Pn3Glu	-27.9±0.3	0.3	4.5	-1.1
6	Mv3Glu	-29.0±0.3	-0.7	4.2	-2.0

Примечание: * – расчет относительно Pg3Glu; ** – погрешности определены по данным работы [5].

соответственно, при росте удерживания экзотермичность снижается. Следовательно, экспериментально найденный порядок элюирования антоцианов обеспечивается энтропийной составляющей, что заставляет вспомнить о так называемой «энтальпийно-энтропийной» компенсации.

По заместительной модели удерживания в обращенно-фазовой хроматографии наклон зависимости логарифма удерживания сорбата от логарифма молярной концентрации органического модификатора водно-органических подвижных фаз указывает на число высвобождаемых молекул органического растворителя при сорбции [19]. На картах разделения второго типа [20] логарифмы факторов удерживания всех сорбатов строятся как функции логарифма фактора удерживания вещества сравнения, R , (в нашем случае $R=Pg3Glu$) по уравнению (6).

$$\lg k(i) = a_0(i) + a_1(i) \cdot \lg k(R) \quad (6)$$

При этом получают набор прямых линий, у которых наклон, $a_1(i)$, равен отношению числа моль молекул органического модификатора, высвобождаемых при сорбции каждого из сорбатов относительно такого же параметра для вещества сравнения.

Результаты определения a_1 для пяти 3-глюкозидов относительно Pg3Glu в двух

элюентных системах, содержащих ацетонитрил, представлены в табл. 2. Для ряда Dp3Glu – Cy3Glu – Pg3Glu в элюентах, подкисленных 10 об. % муравьиной кислоты, параметры $a_1(i)$ равны 1.072–1.028–1.000, соответственно. Это указывает на рост числа молекул ацетонитрила высвобождаемых при сорбции на C18-фазе при добавлении ОН-групп в структуру антоциана. Это не обязательно указывает на повышение чисел сольватации антоцианов ацетонитрилом. Более вероятно то, что вытесняется большее число молекул ацетонитрила, заполняющих рыхлый слой привитых C18-радикалов, при проникновении в него молекул большего размера. Поскольку в этом слое имеются молекулы не только ацетонитрила, но и муравьиной кислоты, то возможна сольватация антоцианов по гидроксильным группам в привитом слое молекулами муравьиной кислоты, что обеспечивает не только повышение экзотермичности процесса сорбции, но и уменьшение энтропии антоцианов в сорбированном состоянии.

В подвижных фазах, подкисленных орто-фосфорной кислотой, наклоны прямых зависимостей на картах разделения второго типа для этих же антоцианов при добавлении ОН-групп растут еще больше, табл. 2. Это согласуется с

Таблица 2. Параметры уравнения (5) на картах разделения второго типа в двух элюентных системах: *a* – «ацетонитрил-10 об. % муравьиной кислоты-вода», и *b* – «ацетонитрил-0.5 об. % орто-фосфорно кислоты-вода»

Table 2. Parameters of equation (5) on separation maps of the second type in two eluent systems: *A* – "acetonitrile – 10 vol. % formic acid-water", and *b* – "acetonitrile – 0.5 vol. % ortho-phosphoric acid-water"

№	Антоцианы	Элюентная система <i>a</i>		Элюентная система <i>b</i>	
		a_0	a_1	a_0	a_1
1	Dp3G	-0.566	1.072	-0.585	1.139
2	Cy3G	-0.260	1.028	-0.262	1.053
3	Pt3G	-0.126	1.134	-0.141	1.129
4	Pn3G	0	1	0	1
5	Pn3G	0.148	1.089	0.128	1.072
6	Mv3G	0.258	1.188	0.225	1.152

Таблица 3. Изменение термодинамических параметров удерживания антоцианов при добавлении глюкозидного радикала к некоторым 3-глюкозидам в подвижной фазе 8 об. % ацетонитрила и 10 об. % муравьиной кислоты на колонке 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм при постоянном давлении на входе в колонку

Table 3. Change in the thermodynamic parameters of anthocyanin retention upon addition of a glucoside radical to some 3-glucosides in the mobile phase 8 vol. % acetonitrile and 10 vol. % formic acid on a 150×4.6 mm Symmetry C18, 3.5 μm column at constant column inlet pressure

№	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^{0*}(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, кДж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	Cy3Glu	-29.2 ± 0.3	0	0	0
2	Cy3,5diGlu	-30.7 ± 0.3	-1.5	-13.3	2.8
3	Pt3Glu	-29.8 ± 0.3	0	0	0
4	Pt3,5diGlu	-29.7 ± 0.3	0.1	-8.5	2.8
5	Pn3Glu	-27.9 ± 0.3	0	0	0
6	Pn3,5diGlu	-26.4 ± 0.3	1.6	-2.6	2.4
7	Mv3Glu	-29.0 ± 0.3	0	0	0
8	Mv3,5diGlu	-26.6 ± 0.3	2.3	-0.7	2.5

Примечание * – расчет относительно Pg3Glu; ** – погрешности определены по данным работы [5].

тем, что в привитом слое уже нет муравьиной кислоты, и пустоты заполняются только молекулами ацетонитрила, поэтому и вытесняется большее число этих молекул.

Повышение липофильности (и роста удерживания антоцианов) при добавлении метокси-группы в структуру антоцианов (переход в ряду Pg3Glu → Pn3Glu → Mv3Glu) приводит к немонотонному изменению энтальпии и энтропии и предсказание или объяснение их изменения проблематично.

В табл. 3 приведены результаты определения изменения термодинамических параметров удерживания антоцианов при

добавлении глюкозидного радикала в положение 5 для четырех 3-глюкозидов.

Для всех четырех случаев, представленных в табл. 3, изменение энергии Гиббса – положительное и примерно одинаковое (от 2.4 до 2.8 кДж/моль), что указывает, во-первых, на падение удерживания при таком изменении структуры, определенное как важная закономерность в работе [21]. Во-вторых, это свидетельствует об эффективности инкрементной модели (уравнение 7) в этом случае.

$$\lg k(X3,5diGlu) \approx \lg k(X3Glu) + \Delta(5Glu). \quad (7)$$

Но относительно $\Delta\Delta H^0$ и $\Delta\Delta S^0$ для всех пар антоцианов наблюдаются заметные

Таблица 4. Изменение термодинамических параметров удерживания антоцианов при добавлении гликозидных радикалов к имеющемуся гликозидному радикалу в Cy3Glu
 Table 4. Changes in the thermodynamic parameters of anthocyanin retention upon addition of glycosidic radicals to the existing glycosidic radical in Cy3Glu

№	Тип гликозидов	Антоциан	ΔH^0 , кДж/моль	$\Delta\Delta H^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль	$\Delta\Delta S^0(i \rightarrow j)$, Дж/(моль·К)	$\Delta\Delta G^0(i \rightarrow j)$, кДж/моль
1	моногликозид	Cy3Glu	-29.2	0	0	0
2	диглюкозиды	Cy3Sopho	-31.3	-2.1	-11.3	1.5
3		Cy3Sam	-30.3	-1	-4.5	0.4
4		Cy3Rut	-30.7	-1.4	-2.6	-0.6
5	триглюкозиды	Cy3GRut	-31.6	-2.3	-10.9	1.1
6		Cy3XRut	-30	-0.8	-2.7	0

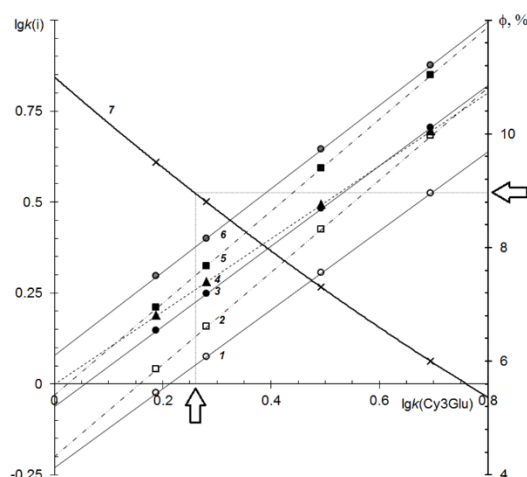


Рис. 2. Карта разделения второго типа для 6 антоцианов в элюентной системе «ацетонитрил – 10 об.% муравьиной кислоты – вода».

Антоцианы: 1 – Cy3Sopho; 2 – Cy3GRut; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu; 5 – CyXRut; 6 – Cy3Rut. 7 – линия для зависимости объемной доли ацетонитрила от $lgk(Cy3Glu)$

Fig. 2. Separation map of the second type for 6 anthocyanins in the eluent system "acetonitrile - 10 vol.% formic acid - water".

Anthocyanins: 1 – Cy3Sopho; 2 – Cy3GRut; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu; 5 – CyXRut; 6 – Cy3Rut. 7 – line for the dependence of the volume fraction of acetonitrile on $lgk(Cy3Glu)$.

различия, которые нивелируются энтропийно-энтальпийной компенсацией [22].

При прибавлении как второго, так и третьего углевода к гликозидному радикалу в положении 3 цианидина изменение энтальпии немного растет (по модулю), но удерживание производных цианидина определяется также и энтропийной составляющей, табл. 4.

Энтальпийно-энтропийная компенсация - важное свойство хроматографического поведения антоцианов в условиях обращенно-фазовой хроматографии, ко-

торое зависит от концентрации органического компонента в водно-органических подвижных фазах. Поэтому на самом деле имеет смысл анализировать термодинамические параметры сорбции веществ для чисто водных растворов (для выбранной стационарной фазы). Но экспериментальное получение данных о $\Delta G^0(i)$, практически не доступно, в первую очередь, вследствие коллапса фаз при высоком содержании воды [23]. Использование процедуры аппроксимации на нулевую концентрацию органического



модификатора было предложено Р. Калижаном [24] для нахождения $\lg k_{aq}$ – как свойства, коррелирующего с независимо определяемым параметром липофильности – экспериментальным, LOGP, или расчетным, CLOGP.

При добавлении органического модификатора в подвижную фазу удерживание падает, что связано с усилением сольватации сорбатов в подвижной фазе. Возможно и изменение состояния сорбата в сорбированном состоянии, хотя основной тип взаимодействий для этой фазы – дисперсионные взаимодействия, которые могут быть дополнены в некоторых случаях образованием водородных связей с остаточными силанольными группами [25]. Анализ изменения энтропии и энтальпии становится в значительной мере сложным и запутанным. Но знание энтальпии имеет большое значение при оптимизации разделения сорбатов за счет изменения температуры [26].

Анализ хроматографического поведения по наклонам линий трендов на картах разделения второго рода по уравнениям (5) обеспечивает простой и быстрый способ предсказания не только удерживания при заданном составе подвижной фазы, но и возможных изменений в порядке элюирования сложных смесей сорбатов во всем приемлемом (по величине $\lg k$)

Список литературы/References

1. Miyabe K. Thermodynamic Interpretation of Retention Equilibrium in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Sci.* 2009; 25(2): 219-220. <https://doi.org/10.1021/ac0202233>
2. Saifutdinov B.R., Buryak A.K. Thermodynamics of the Adsorption of Isomeric Dipyridyls and Their Derivatives from Water–Organic Solutions on HYPERCARB™ Porous Graphitic Carbon. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2019; 93(9): 1796-1803. <https://doi.org/10.1134/S0036024419090218>
3. Cole L.A., Dorsey J.G. Temperature Dependence of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. 1. Stationary-

диапазоне составов подвижных фаз. Для этого к карте разделения добавляется еще одна линия (уже не прямая) – например, обратная обычной зависимость объемной доли органического модификатора от удерживания реперного соединения, $\lg k(R)$, рис. 2.

Заключение

Таким образом, в работе предложен способ определения энтальпии переноса антоцианов с подвижной на стационарную фазу, учитывающий известную зависимость удерживания от давления на входе в колонку. Показано, что анализ зависимости энтальпии от строения антоцианов осложняется энтальпийно-энтропийной компенсацией. При этом изменения изобарно-изотермического потенциала удобнее использовать при установлении закономерностей сорбции, а изменения энтальпии необходимы для оптимизации разделения за счет изменения температуры.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет известных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

- Phase Considerations. *Anal. Chem.* 1992; 64(13): 1317-1323. <https://doi.org/10.1021/ac00037a004>
4. Calvert J.G. Glossary of atmospheric chemical terms. *Pure Appl. Chem.* 1990; 62(11): 2167-2219. <https://doi.org/10.1351/pac199062112167>
 5. Fekete S., Veuthey J.-L., McCalley D.V., Guillaume D. The effect of pressure and mobile phase velocity on the retention properties of small analytes and large biomolecules in ultra-high pressure liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2012; 1270: 127-138. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.10.056>
 6. Martin M., Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J.*



- Chromatogr. A.* 2005; 1090: 16-38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.005>
7. Chester T.L., Coym J.W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J. Chromatogr. A.* 2003; 1003: 101-111. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00846-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00846-x)
8. Deineka V.I., Makarevich S.L., Blinova I.P., Deineka L.A. Determining the enthalpy of the transfer of anthocyanidins from the mobile phase to the stationary phase during reversed-phase chromatography on a C18 stationary phase. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy.* 2022; 22(4): 386-392. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10565> (In Russ.)
9. Sentell K.B., Dorsey J.G. On the Calculation of the Stationary Phase Volume in Reversed Phase Chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 1988; 11(9-10): 1875-1885. <https://doi.org/10.1080/01483918808069031>
10. Deineka V.I., Nguyen Anh Van, Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2019; 93(12): 2490-2493. <https://doi.org/10.1134/S0036024419120057>
11. Cole L.A., Dorsey J.G. Temperature Dependence of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. 1. Stationary-Phase Considerations. *Anal. Chem.* 1992; 64(13): 1317-1323. <https://doi.org/10.1021/ac00037a004>
12. Krstulović A.M., Colin H., Guiochon G. Comparison of Methods Used for the Determination of Void Volume in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Anal. Chem.* 1982; 54(14): 2438-2443. <https://doi.org/doi.org/10.1021/ac00251a009>
13. Doronin A., Deineka V., Deineka L., Tretiakov M., Tokhtar V., Andrey C. Peculiarities of Use of Bentonite Clay at Solid-Phase Purification of Anthocyanins and Flavonoids from Leaves of Plants // *Proceedings of the 1st International Symposium Innovations in Life Sciences (ISILS 2019).* *Adv. Biol. Sci. Res.* 2019. 7; 90-93. <https://doi.org/doi.org/10.2991/isils-19.2019.21>
14. Sorokopudov V.N., Khlebnikov V.A., Deineka V.I. Antociany nekotoryh rastenij semejstva *Berberidaceae*. *Khimija Rastitel'nogo Syr'ja.* 2005; 4: 57-60. (In Russ.)
15. Kim M.J., Paramanatham A., Lee W.S., Yun J.W., Chang S.Hwan., Kim D.C., Park H.S., Choi Y.H., Kim G.S., Ryu C.H., Shin S.C., Hong S.C. Anthocyanins Derived from *Vitis coignetiae* Pulliat Contributes Anti-Cancer Effects by Suppressing NF- κ B Pathways in Hep3B Human Hepatocellular Carcinoma Cells and In Vivo. *Molecules.* 2020; 25: 5445. <https://doi.org/10.3390/molecules25225445>
16. Sokół-Łętowska A., Kucharska A.Z., Hodun G., Gołba M. Chemical Composition of 21 Cultivars of Sour Cherry (*Prunus cerasus*) Fruit Cultivated in Poland. *Molecules.* 2020; 25: 4587. <https://doi.org/10.3390/molecules25194587>
17. Tian Q., Monica Giusti M., Stoner G.D., Schwartz S.J. Characterization of a new anthocyanin in black raspberries (*Rubus occidentalis*) by liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 2006; 94(3): 465-468. <https://doi.org/doi.org/10.3390/molecules25194587>
18. Deineka V.I., Deineka L.A., Saenko I.I., Chulkov A.N. A Float Mechanism of Retention in Reversed-Phase Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2015; 89(7): 1300-1304. <https://doi.org/10.1134/S0036024415070079>
19. Murakami F. Retention behaviour of benzene derivatives on bonded reversed-phase columns. *J. Chromatogr.* 1979; 178(2): 393-399. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)92497-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)92497-X)
20. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A. Comparing Two Versions of a Separation Map in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2022; 96(8): 1768-1772. <https://doi.org/10.1134/S0036024422080076>



21. Welch C.R., Wu Q., Simon J.E. Recent Advances in Anthocyanin Analysis and Characterization. *Curr. Anal Chem.* 2008; 4(2): 75-101. <https://doi.org/10.2174/157341108784587795>

22. Pan A., Kar T., Rakshit A.K., Moulik S.P. Enthalpy-Entropy Compensation (EEC) Effect: Decisive Role of Free Energy. *J. Phys. Chem. B.* 2016; 120(40): 10531-10539. <https://doi.org/doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b05890>

23 Przybyciel M., Majors R. Phase collapse in reversed-phase liquid chromatography. *LC GC North America* 2002; 20(6): 516, 520-523.

24. Kaliszan R. QSRR: quantitative structure-(chromatographic) retention relationships. *Chem. Rev.* 2007; 107(7): 3212-3246. <https://doi.org/10.1021/cr068412z>

25. Bocian S., Buszowski B. Residual silanols at reversed-phase silica in HPLC - A contribution for a better understanding. *J. Sep Sci.* 2012; 35(10-11): 1191-200. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200055>

26. Deineka V.I., Oleinits E.Yu., Kul'chenko Ya.Yu., Blinova I.P., Deineka L.A. Control of the Selectivity of Separation and the Determination of Anthocyanins of Fruits of *Vaccinium* Family Plants Using Acetonitrile-Formic Acid-Water Eluents. *J. Anal. Chem.* 2020; 75(11): 1443-1450. <https://doi.org/10.1134/S1061934820090087>

Информация об авторах / Information about the authors

В.И. Дейнека – профессор кафедры общей химии, д.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

А.Н. Чулков – главный специалист Белгородского филиала «Центр оценки качества зерна и продуктов его переработки», Белгород, Россия

Е.Ю. Олейниц – ассистент кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.С. Пронин – магистрант ИФХиБ, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.П. Блинова – доцент кафедры общей химии, кандидат химических наук, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

И.И. Тыняная – доцент кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

Я.Ю. Саласина – старший преподаватель кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород, Россия

В.Ф. Селемев – профессор кафедры аналитической химии, д.х.н., Воронежский государственный университет, Воронеж, Россия

V.I. Deineka – Professor of General Chemistry Department. Dr. Sci.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: deineka@bsuedu.ru

A.N. Chulkov – Chief Specialist of the Belgorod branch of the Center for Grain and Processed Products Quality Assessment, Belgorod, Russian Federation, e-mail: ach87@mail.ru

E.A. Oleynits – Assistant of the Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: oleinits_e@bsu.edu.ru

I.S. Pronin – Master's student of IFHiB, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation

I.P. Blinova – Docent of General Chemistry Department. Dr. Ph.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: blinova@bsuedu.ru

I.I. Tynyanaya – Associate Professor of the Department of General Chemistry, Candidate of Chemical Sciences, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: tynyanaya@bsu.edu.ru

Ya.Yu. Salasina – Senior Lecturer of General Chemistry Department. Dr. Ph.(Chemistry), Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation, e-mail: salasina@bsuedu.ru

V.F. Selemenev – Professor of Analytical Chemistry Department, Dr. Sci.(Chemistry), Voronezh State University, Voronezh, Russian Federation

Статья поступила в редакцию 09.02.2023; одобрена после рецензирования 12.03.2023; принята к публикации 22.03.2023.

The article was submitted 09.02.2023; approved after reviewing 12.03.2023; accepted for publication 22.03.2023.