



УДК 543.544.52:543.054

## Пробоподготовка при ВЭЖХ определении антоцианов и бетацианинов. Эффект растворителя образца

Дейнека В.И., Сидоров А.Н., Дейнека Л.А., Тынная И.И.

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

Поступила в редакцию 18.01.2016 г.

В работе приводятся экспериментальные данные, позволяющие подтвердить идею о появлении артефактов на хроматограммах от ложных пиков до снижения эффективности хроматографических систем. Суть идеи состоит в том, что если образцы растворены в растворителе, имеющем большую элюирующую силу по сравнению с используемой подвижной фазой, то возможен преждевременный вынос разделяемых соединений из хроматографической системы. В экспериментах для подвижных фаз и для растворения анализов использовали одни и те же системы растворителей, различающиеся лишь элюирующей силой.

**Ключевые слова:** ВЭЖХ, растворитель пробы, артефакты, эффективность.

## Sample preparation for anthocyanins and betacyanins HPLC determination. The effect of the sample solvent

Deineka V.I., Sodorov A.N., Deineka L.A., Tynyanaya I.I.

*Belgorod National Research University, Russia, Belgorod*

The paper is devoted to the explanation of artefacts appearance on the chromatograms. Thus the artefacts may be the consequence of the high concentration of the organic component in the sample solvent if the elution strength of the solvent exceeds that of the mobile phase utilized for solutes separation. In this case sample will be distributed between the mobile and stationary phases with a smaller distribution constant, at least in the initial phase of the chromatographic column. The phenomenon will result in solute peak repelling before the peak equilibrium position of on the chromatogram. The idea was confirmed by a series of experimental data. So, the appearance of "false" peaks was proved to be the consequence of the high concentration of acetonitrile in the sample of the betacyanin extract of the fruit of *Chenopodium foliosum* L. For a series of samples of the extract of the fruit of *Ribes rubrum* L. and *Ribes nigrum* L. with different concentration of acetonitrile it has been shown that in the case of the mismatch of the elution powers of the sample solvent and of the mobile phase initially a decrease in the efficiency of the chromatographic system (expressed by number of theoretical plates) is observed, and then false peaks may appear. In some (but not in all) cases, the effect can be partially suppressed by volume of injected sample reducing.

**Keywords:** HPLC, solvent samples, artifacts, efficiency.

### Введение

Искажение пиков триацилглицеринов в условиях обращенно-фазовой хроматографии в подвижной фазе, составленной из ацетона и ацетонитрила (6 : 4 по объему), при вводе пробы, растворенной в хлороформе, но не в ацетоне, было

обнаружено в работе [1]. В последовавшем далее более подробном исследовании данного явления в работе [2] были использованы различные параметры характеристики растворителей и их смесей, включая параметр растворимости Хильдебрандта и индекс полярности Роршайдера ( $P'$ ) для сопоставления подвижных фаз и растворителей пробы. В итоге, признавая невозможность получения универсального решения поставленной задачи, авторы для хроматографирования триацилглицеринов предложили простые правила:

1) прежде всего, следует использовать в качестве растворителя образца подвижную фазу;

2) при возникновении проблем с растворимостью лучшим растворителем является

- ацетон;

- в случае высокомолекулярных липидов - смесь ацетона и тетрагидрофурана (ТГФ) с тем же  $P'$ , что и у подвижной фазы,

- ТГФ, при объеме вводимой пробы менее 5 мкл.

Исследуя артефакты (дисперсию, раздвоение и иные искажения формы пиков) при хроматографировании не менее сложных объектов – каротиноидов, авторы работы [3] вынуждены были признать невозможность построения математических моделей, поддающихся даже численному решению, предсказывающих или описывающих найденные артефакты. Их появление связывали с различиями физических свойств растворителя пробы и подвижной фазы и с различиями в растворимости каротиноидов в них же. В другой работе [4] было показано, что для исключения артефактов в условиях градиентного элюирования каротиноидов и хлорофиллов нельзя использовать ацетон (90%) в качестве растворителя вводимой пробы. Наконец, в работе с рядом лекарственных препаратов, растворенных в алифатических спиртах (от бутанола до октанола) было показано, что время удерживания зависит как от конкретного спирта, так и от объема вводимой пробы без особых проблем в эффективности системы и при отсутствии раздвоения пиков [5].

Отметим, что публикаций по влиянию растворителя пробы на вид хроматограмм антоцианов или бетацианинов в научной печати нами не было обнаружено. Кроме того, во всех цитированных работах невозможно было определить истинные причины артефактов, поскольку растворители пробы и подвижные фазы качественно отличались друг от друга, а все известные характеристики растворителей определены вне их отношения к рассматриваемому соединению. По этой причине представляется интересным вариант исследования, в котором и для растворителя пробы и для подвижной фазы используются одни и те же растворители, но в различном соотношении, что исключает неопределенность в априорной характеристике компонентов растворов, что и стало целью настоящей работы на примере хроматографии антоцианов и бетацианинов.

## Эксперимент

Разделение веществ осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным детектором. Все хроматограммы регистрировали, хранили и обрабатывали в среде ChemStation. Число теоретических тарелок рассчитывали по традиционной формуле:

$$N = 5.54 \cdot \left( \frac{t_R}{\Delta_{1/2}} \right)^2, \quad (1)$$

где  $t_R$  – время удерживания аналита, мин;  $\Delta_{1/2}$  – полуширина пика, мин.

Для разделения бетацанинов использовали (условия 1): хроматографическую колонку: 250×4.6 мм Reprosil-Pur C18-AQ, 5 мкм; подвижную фазу: 4 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 1 об. %  $\text{HCOOH}$  в воде, скорость подачи 1 мл/мин; при температуре 30°C; запись хроматограммы при 538 нм. Для разделения антоцианов использовали (условия 2) хроматографическую колонку Symmetry® C18 250×4.6 мм; подвижную фазу: 8 об. %  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 10 об. %  $\text{HCOOH}$  в воде, 1 мл/мин, температура 40°C; запись хроматограммы при 515 нм. Вещества экстрагировали из растительных материалов и очищали методом твердофазной экстракции.

## Обсуждение результатов

Общеизвестно, что удерживание веществ в хроматографии зависит от концентрации компонентов составной подвижной фазы. Так, в обращенно-фазовой хроматографии в соответствие с эмпирическим уравнением Снайдера [6] логарифм фактора удерживания вещества в некотором диапазоне составов водно-органических подвижных фаз линейно уменьшается (константа  $B$  всегда меньше 0) с ростом концентрации органического модификатора:

$$\lg k(i) = A + B \cdot \varphi, \quad (2)$$

где  $k$  – фактор удерживания вещества  $i$ ;  $\varphi$  – объемная доля органического модификатора, об. %,  $A$  и  $B$  – эмпирические коэффициенты, зависящие от многих параметров.

При этом диапазон водно-органических составов, в которых соблюдается уравнение (1), невелик и различный для метанола, ацетонитрила и тетрагидрофурана, наиболее часто использующихся в обращенно-фазовой ВЭЖХ. Для более широких диапазонов составов лучше применимо более сложное [7] уравнение (3):

$$\ln k(i) = A \cdot \varphi^2 + B \cdot \varphi + C + E \cdot \varphi^{1/2}, \quad (3)$$

Разумеется, растворитель, в котором растворено анализируемое вещество или смесь веществ, также на некотором участке колонки выполняет роль подвижной фазы. И если концентрация органического компонента в растворителе пробы велика, то растворитель пробы может обладать более высокой элюирующей силой. В таком случае хроматографируемое вещество будет распределяться между стационарной и подвижной фазами с меньшей константой распределения, по крайней мере, на начальном участке хроматографической колонки. Следствием может быть «вынос» сорбата относительно равновесного положения пика на хроматограмме. Степень такого «выноса» теоретически трудно предсказать по ряду причин, включающих возможную неравновесность распределения компонента раствора пробы между двумя фазами, поэтому проще и нагляднее выполнить экспериментальные исследования, в которых будет изменяться состав растворителя пробы при неизменном составе подвижной фазы.

Первые же эксперименты, выполненные при определении некоторых веществ в условиях обращенно-фазовой хроматографии, не противоречили предложенным выше объяснениям. Так, хроматограмма бетацанинов из плодов шпината земляничного (мари многолистной, *Chenopodium foliosum* L.), записанная для образца, содержавшего вдвое большую концентрацию ацетонитрила по сравнению с использованной подвижной фазой, оказалась сложной с «лишними» пиками. Образец, разбавленный водой вдвое, позволил определить в экстракте амарантин и

изоамарантин (по сравнению с удерживанием бетацианинов амаранта метельчатого, или багряного — *Amaranthus paniculatus*) в виде нормальных пиков, рис. 1.

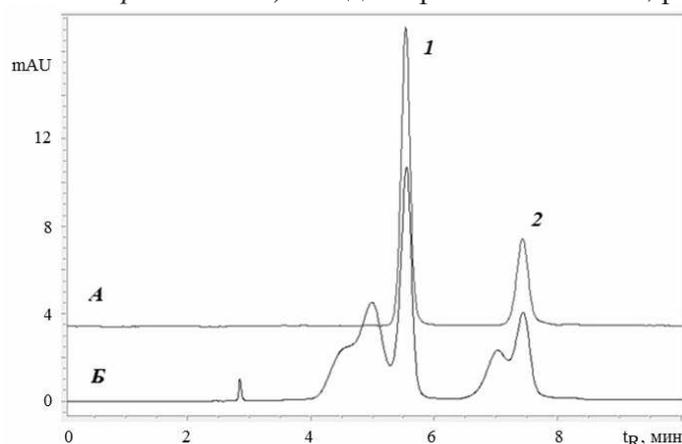


Рис. 1 Разделение бетацианинов плодов *Chenopodium foliosum* L.

Условия 1. А – образец, растворенный в подвижной фазе, Б – образец растворен в смеси: 8 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  и 2 об. %  $\text{HCOOH}$  в воде. Вещества: 1 – амарантин, 2 – изоамарантин

Для дальнейшего исследования были приготовлены четыре раствора, содержавшие одинаковое количество антоцианов красной смородины (*Ribes rubrum* L.), одно и то же количество муравьиной кислоты (10 об. %), но различное количество ацетонитрила – от 50 до 8 об. %. Образцы вводили в хроматографическую систему в условиях 2 порциями объемом 20 мкл. Полученные при этом хроматографические профили полностью подтвердили справедливость высказанных ранее предположений, рис. 2. Так, для образца, растворенного в растворе с наибольшей концентрацией ацетонитрила, получен один большой и даже не уширенный ложный пик (со временем удерживания около 3 мин) и набор трех пиков нормальной формы. Однако при этом сумма площадей этих трех пиков ( $\text{Cu3Sam}$ ,  $\text{Cu3XRut}$  и  $\text{Cu3Rut}$ ) составила примерно 10 % от суммы таких же пиков для образца, содержащего антоцианы в растворителе, с тем же, что и подвижная фаза, составом. По этой причине при публикации материалов исследований желательно приводить хроматограммы в полной шкале - от начала до окончания записи, а не какую либо часть хроматограммы. Для образцов с промежуточным составом растворителя получены хроматограммы с очевидными артефактами - ложными пиками различной формы и положения.

Затем в тех же условиях были записаны хроматограммы экстрактов плодов черной смородины (*Ribes nigrum* L.) с меньшим шагом по концентрации ацетонитрила. Оказалось, что в интервале концентраций  $\text{CH}_3\text{CN}$  в пробе от 0 до 12.5 об. % изменения в хроматограммах касаются только эффективности пиков, выраженной числом теоретических тарелок с максимумом около состава, соответствующего подвижной фазе, табл. Но для раствора с концентрацией 15 об.%  $\text{CH}_3\text{CN}$  была получена хроматограмма с артефактами, которые практически исчезли при уменьшении вдвое объема вводимой пробы (но при заметно уменьшенной эффективности системы), рис.3. Для образца в растворе, содержавшем 50 об %  $\text{CH}_3\text{CN}$  даже четырехкратное уменьшение объема вводимой пробы (до 5 мкл) не позволило получить хроматограмму без артефактов, рис.3.

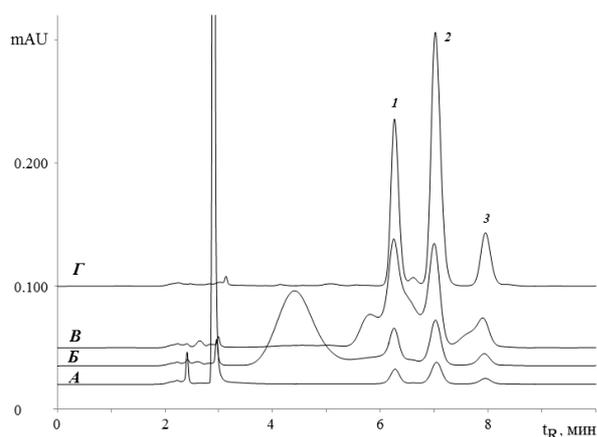


Рис. 2. Влияние состава растворителя пробы на вид хроматограммы

Условия 2. Образцы одинаковой концентрации по антоцианам растворены в растворах содержащих 10 об. % HCOOH и различное количество ацетонитрила в воде: А – 50; Б – 25; В – 12.5 и С – 8 об.%. Объем вводимой пробы 20 мкл. Вещества: 1 – цианидин-3-самбубиозид; 2 – цианидин-3-ксилозидрутинозид; 3 – цианидин-3-рутинозид

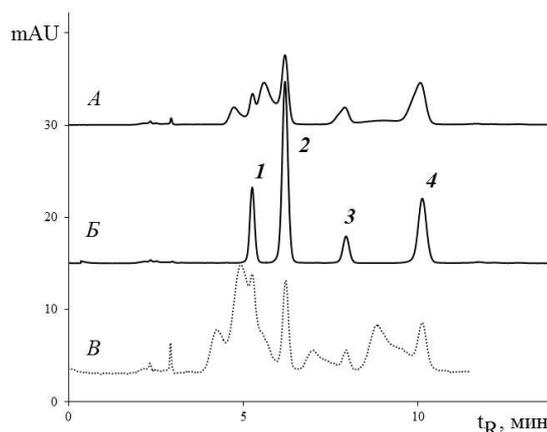


Рис. 3. Влияние состава растворителя пробы на разделение антоцианов плодов черной смородины  
Условия 2. Образцы одинаковой концентрации по антоцианам растворены в растворах содержащих 10 об. % HCOOH но различное содержание CH<sub>3</sub>CN в воде: А – 15 об. %, объем вводимой пробы 20 мкл; Б – 15 об. %, объем вводимой пробы 10 мкл; В – 50 об. %, объем вводимой пробы 4 мкл. Вещества: 1 – дельфинидин-3-глюкозид; 2 – дельфинидин-3-рутинозид; 3 – цианидин-3-глюкозид; 4 – цианидин-3-рутинозид

Таблица. Параметры пиков производных цианидина плодов черной смородины на хроматограммах для образцов, растворенных в различных составах растворителя, содержащего постоянную концентрацию HCOOH и различную - ацетонитрила

% CH <sub>3</sub> CN	Цианидин-3-глюкозид			Цианидин-3-рутинозид		
	t <sub>R</sub> , мин	S(отн.), %	N, т.т.	t <sub>R</sub> , мин	S(отн.), %	N, т.т.
Объем вводимой пробы 20 мкл						
0	7.92	100	8309	10.09	100	7853
3.5	7.94	100	8450	10.11	100	8114
7.0	7.93	100	8496	10.10	100	8198
10.0	7.92	100	8400	10.09	100	7809
12.5	7.93	100	8372	10.12	100	7579
15.0	Пик сложный и составной			10.06	100	3730
Объем вводимой пробы 10 мкл						
15	7.91	50	8070	10.09	50	6852

t<sub>R</sub>, мин – время удерживания; S(отн.) - относительная площадь в %; N, т.т. – число теоретических тарелок. Хроматограммы записаны в условиях 2.

## Заключение

Таким образом, при разработке методов определения аналитов с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии необходимо уделять внимание пробоподготовке образцов для исключения возможности появления артефактов на хроматограммах[8]. Лучший выбор – растворитель пробы того же состава, что и подвижная фаза, обеспечивающий не только отсутствие

ложных пиков, но и наивысшую эффективность (по числу теоретических тарелок) хроматографической системы.

### Список литературы

1. Tsimidou M., Macrae R. // *J. Chromatogr.* 1984. Vol. 285. pp. 178-181.
2. Tsimidou M., Macrae R. // *J. Chromatogr. Sci.* 1985. Vol. 23. pp. 155-160.
3. Khachik F., Beecher G.R., Vanderslice J.T., Furrow G. // *Anal. Chem.* 1988. Vol. 60. pp. 807-811.
4. Zapatal M., Garrido L. // *Chromatographia.* 1991. Vol. 31. pp. 589-594.
5. David V., Galaon T., Aboul-Enein H.Y. // *J. Chromatogr. A.* 2014. Vol. 1323 pp. 115-122.
6. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R. // *J. Chromatogr.* 1979. Vol. 165, pp. 3-30.
7. Schoenmakers P.J., Billet H.A.H., Galan L.D. // *J. Chromatogr.* 1983. Vol. 282, pp. 107-121.
8. Селеменев В.Ф., Рудаков О.Б., Славинская Г.В., Дроздова Н.В. Пигменты пищевых производств (меланоидины). М.: ДеЛи принт. 2008. 246 с.

### References

1. Tsimidou M., Macrae R., *J. Chromatogr.*, 1984, Vol. 285, pp. 178-181.
2. Tsimidou M., Macrae R., *J. Chromatogr. Sci.*, 1985, Vol. 23, pp. 155-160.
3. Khachik F., Beecher G.R., Vanderslice J.T., Furrow G., *Anal. Chem.*, 1988, Vol. 60, pp. 807-811.
4. Zapatal M., Garrido L., *Chromatographia*, 1991, Vol. 31, pp. 589-594.
5. David V., Galaon T., Aboul-Enein H.Y., *J. Chromatogr. A*, 2014, Vol. 1323, pp. 115– 122.
6. Snyder L.R., Dolan J.W., Gant J.R., *J. Chromatogr.*, 1979, Vol. 165, pp. 3–30.
7. Schoenmakers P.J., Billet H.A.H., Galan L.D., *J. Chromatogr.*, 1983, Vol. 282, pp. 107-121.
8. Selemenev V.F, Rudakov O.B., Slavinskaja G.V., Drozdova N.V., *Pigmenty pishhevyyh proizvodstv (melanoidiny)*, M., DeLi print., 2008, 246 p.

**Дейнека Виктор Иванович** - д.х.н., профессор, профессор кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

**Дейнека Людмила Александровна** - к.х.н., доцент, доцент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

**Сидоров Артем Николаевич** - аспирант кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного , Белгород

**Тыняная Ирина Ивановна** - ассистент кафедры общей химии Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

**Deineka Victor I.**- Dr. Sci.(Chemistry) Prof., Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod, e-mail:[deineka@bsu.edu.ru](mailto:deineka@bsu.edu.ru)

**Deineka Ludmila A.** - Ph.D., Professor assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

**Sidorov Artem N.** - post graduate of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod

**Tynyanaya Irina I.** - Assistant of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod