

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ» (НИУ «БелГУ»)

На правах рукописи



ОЛЕЙНИЦ ЕЛЕНА ЮРЬЕВНА

УПРАВЛЕНИЕ РАЗДЕЛЕНИЕМ НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ

1.4.2. Аналитическая химия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук, профессор

Дейнека В.И.

Белгород – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Обращенно-фазовая хроматография.....	10
1.1.1 Типы обращенно-фазовых сорбентов.....	10
1.1.2 Специфика структуры обращенно-фазовых сорбентов.....	11
1.1.3 Методы характеристики обращенных стационарных фаз.....	12
1.1.4 Механизмы удерживания в обращенно-фазовой хроматографии.....	14
1.1.5 QSRR в ОФ ВЭЖХ.....	16
1.1.6 Зависимость удерживания от состава подвижной фазы.....	18
1.1.7 Элюенты в ОФ ВЭЖХ и «зеленая» хроматография.....	20
1.2 Фенольные соединения. Классификация и биологическая роль.....	21
1.2.1 Антоцианы. Хроматографические методы определения.....	23
1.2.2 Фенольные кислоты: производные кофейной кислоты.....	28
1.3 Пробоподготовка.....	34
1.3.1 Антоцианы.....	35
1.3.2 Фенольные кислоты.....	37
1.4 Комплексы «включения» фенольных соединений с циклодекстринами.....	42
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1.....	48
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	49
2.1 Объекты исследования.....	49
2.2 Инструментальные методы.....	49
2.2.1 Хроматографический метод.....	50
2.2.2 Спектрофотометрический метод.....	50
2.2.3 Масс-спектрометрические методы.....	51
2.3 Пробоподготовка фенольных соединений из растительного сырья.....	51

2.3.1 Пробоподготовка антоцианов	51
2.3.2 Пробоподготовка хлорогеновых кислот	52
2.4 Определение содержания фенольных соединений в растительных объектах	53
2.4.1 Определение концентрации антоцианов в экстрактах упрощенным спектрофотометрическим методом	53
2.4.2 Определение соотношения между индивидуальными антоцианами в сложных смесях	54
2.4.3 Определение концентрации ХК хроматографическим методом	54
2.5 Хроматографические условия определения	55
2.5.1 Определение антоцианов в изократическом режиме	55
2.5.2 Определение антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме	57
2.5.3 Определение циклодекстринов обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме	57
2.5.4 Определение энтальпии переноса сорбатов с подвижной фазы на стационарную фазу	57
2.5.5 Определение хлорогеновых кислот методом ОФ ВЭЖХ	58
2.5.6 Построение и анализ карт разделения первого типа	60
2.5.7 Построение и анализ карт разделения второго типа	61
2.6 Обработка результатов зависимости удерживания хлорогеновых кислот от рН подвижной фазы	62
2.7 Расчет констант комплексообразования «гость-хозяин»	63
2.8 Расчетные методы	64
2.9 Валидация способов определения (статистическая обработка)	65
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	78
3.1 Сопоставление двух вариантов карт разделения в хроматографии	78
3.2. Замена органического модификатора	86
3.2.1 Замена органического модификатора при определении антоцианов с муравьиной кислотой в качестве подкислителя	86

3.2.2 Влияние замены муравьиной кислоты на фосфорную на разделения антоцианов...	98
3.2.3 Замена органического модификатора при определении монокофеоилхинных кислот и кофеина.....	112
3.2.4 Замена органического модификатора при определении дикофеоилхинных кислот	125
3.3 Замена стационарной фазы	133
3.3.1 Влияние остаточной силанольной активности на разделения монокофеоилхинных кислот и кофеина.....	133
3.3.2 Замена стационарных фаз при разделении дикофеоилхинных кислот	137
3.4 Изменение pH	143
3.4.1 Влияние изменения pH на удерживание монокофеоилхинных кислот.....	143
3.4.2 Влияние изменения pH на удерживание дикофеоилхинных кислот	146
3.5 Зависимость удерживания и разделения сорбатов от изменения температуры.....	147
3.5.1 Разделение антоцианов плодов черники и голубики	147
3.5.2 Разделение хлорогеновых кислот и кофеина	151
3.6 Контроль разделения дикофеоилхинных кислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ с β -циклодекстрином в подвижной фазе	153
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	162
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	163
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	189

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

- ОФ ВЭЖХ – обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография;
СФ – стационарная фаза;
ПФ – подвижная фаза;
ФС – фенольные соединения;
ФК – фенольные кислоты;
ХК – хлорогеновые кислоты;
ГЖХ – газо-жидкостная хроматография;
СФХ – сверхкритическая флюидная хроматография;
КЭФ – капиллярный электрофорез;
УЗЭ – ультразвуковая экстракция;
ТФЭ – твердофазная экстракция;
ЦД – циклодекстрин.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. ОФ ВЭЖХ в настоящее время – основной метод анализа в лабораториях различной направленности. Наличие множества марок ОФ сорбентов различных производителей с неодинаковыми хроматографическими свойствами создают серьезную проблему при сопоставлении разделения веществ в различных хроматографических условиях. Известные точечные методы характеристики стационарных фаз бесспорно хороши, но не способны решать основные задачи – возможности переноса результатов разделения аналитов с одних стационарных фаз и одних подвижных фаз на другие, что желательно вследствие различия сорбционных свойств стационарных фаз множества коммерческих торговых марок и различий свойств стационарных фаз различных партий заданной марки. Сопоставление удерживания аналитов в каких-то произвольно выбранных хроматографических условиях, часто используемое в научной литературе, является некорректным подходом, поскольку при переходе к другому составу подвижной фазы или к другой марке обращенной стационарной фазы возможны даже инверсии времен удерживания веществ. По этой причине необходимы надежные методы сопоставления свойств стационарных и подвижных фаз в широком диапазоне составов.

Среди биологически активных веществ природного происхождения особое внимание в последнее время уделяется антиоксидантам, помогающим справиться с оксидативным стрессом в современном урбанизированном обществе. Среди таких соединений – антоцианы и фенольные кислоты, особенно содержащие *орто*-гидроксильные группы в ароматическом кольце, такие как производные кофейной кислоты – хлорогеновые кислоты. Эти вещества в растительных источниках обычно встречаются в виде многокомпонентных смесей. Поэтому для определения содержания этих соединений в растительных источниках и в получаемых из них экстрактах необходимы хроматографические методы именно с условиями гарантированного разделения целевых компонентов. Для улучшения разделения могут быть использованы следующие приемы: изменения состава подвижной фазы (концентрации и типа модификатора), изменение типа стационарной фазы, изменение температуры и pH разделения, введение супрамолекулярных добавок в подвижную фазу.

Новой приоритетной задачей мировой науки и в частности аналитической химии в настоящее время стала забота о здоровье человека и защита окружающей среды, что повлекло за собой появление такого термина, как «зеленая химия» и «зеленая хроматография», задачей которой является поиск и создание инновационных технологий,

которые были бы экологически более благоприятны для человека и окружающей среды. В обращенно-фазовой ВЭЖХ поставлена задача отказа от наиболее часто используемого в качестве органического модификатора подвижной фазы ацетонитрила, растворителя с высокой стоимостью и токсичностью для человека и окружающей среды.

Цель работы – Разработка нового подхода для оценки и управления удерживанием и разделением антоцианов и хлорогеновых кислот в сложных смесях в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Для достижения поставленных целей решались следующие **задачи**:

1. Разработать универсальный подход к оценке влияния стационарной и подвижных фаз на удерживание аналитов сложных смесей на примере антоцианов и хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии.
2. Создать новые экологически более благоприятные и экономически более приемлемые подвижные фазы для разделения антоцианов и хлорогеновых кислот с целью замены ацетонитрила.
3. Определить влияние на разделение антоцианов и хлорогеновых кислот: а) изменения состава подвижной фазы, б) изменения свойств стационарной фазы, в) изменения температуры разделения, г) изменения рН подвижной фазы, д) комплексообразования «гость-хозяин» с β -циклодекстрином в подвижной фазе.

Методы исследования: твердофазная экстракция на концентрирующих патронах, традиционная экстракция неорганическими кислотами, обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография.

Научная новизна. Создан унифицированный подход для оценки влияния состава подвижной фазы и свойств стационарной фазы на разделение сорбатов, основанный на совместном анализе двух типов карт разделения.

Определены зависимости удерживания антоцианов и хлорогеновых кислот от состава подвижных фаз и свойств стационарных фаз.

Определены условия необходимые для эффективного использования подвижных фаз для разделения антоцианов и хлорогеновых кислот, включая более экологически благоприятные органические модификаторы подвижной фазы (в рамках «зеленой» хроматографии).

Показаны аддитивность сорбционных свойств монокофеoil- и дикофеoilхинных кислот:

- при изменении рН подвижных фаз и

- при изменении концентрации β -циклодекстрина (за счет образования комплексов включения «гость-хозяин») в подвижной фазе, позволяющие дифференцировать изомерные дикофеoilхинные кислоты только с использованием анализа хроматографического поведения.

Практическая значимость. Предложенные способы позволяют снизить стоимость хроматографических анализов благодаря отказу от ацетонитрила и снизить нагрузку на окружающую среду за счет замены ацетонитрила на экологически более благоприятные растворители.

Положения, выносимые на защиту

1. Для анализа хроматографического поведения аналитов предлагается использование карт разделения двух типов. Первый тип карт строится по квадратичной зависимости логарифма фактора удерживания аналита от объемной доли органического модификатора в подвижной фазе; второй тип – по логарифмам фактора удерживания аналита и вещества сравнения нескольких составов подвижных фаз выбранной элюентной системы.
2. Сорбционные свойства стационарных фаз определяются по удерживанию аналитов в подвижных фазах с нулевым содержанием органического модификатора на картах разделения первого типа. Сольватация подвижными фазами аналитов по отношению к веществу сравнения определяется наклоном соответствующих линий трендов на картах разделения второго типа.
3. Составы, температуры и рН подвижных фаз для разделения антоцианов, хлорогеновых кислот, отделение кофеина от хлорогеновых кислот.
4. Условия разделения моно- и дикофеoilхинных кислот за счет образования комплексов включения «гость-хозяин» с β -циклодекстрином в подвижной фазе.
5. Особенности взаимодействия β -циклодекстрина со стационарными фазами с различной длиной привитых алкильных радикалов.

Диссертационная работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 20-33-90031, конкурс «Аспиранты».

Апробация результатов работы. Основные результаты исследований были доложены на следующих конференциях: Innovations in life sciences: сборник материалов II международного симпозиума (г. Белгород, 12-13 ноября 2020); VI Всероссийского симпозиума с международным участием (г. Краснодар, 26 сентября – 2 октября 2021); (ФАГРАН-2021) IX Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения Я.А. Угая (г. Воронеж, 4–7 октября 2021 г.); Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: Проблемы и

достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений: V Всероссийская молодежная конференции (г. Уфа, 18 – 19 ноября 2021 г.); I Международная научно-практической конференция, посвященной памяти профессора П.В. Кузнецова (Кемерово, 26 ноября 2021 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием (г. Пермь, 6–8 декабря 2021 г.), Innovations in life science. IV международный симпозиум (г. Белгород, 25-27 мая 2022); IV Съезд аналитиков России (г. Москва, 26 – 30 сентября 2022 г.).

Публикации. по теме работы опубликовано 19 печатных работ, в том числе 11 статей в журналах, рекомендованных ВАК РФ, 8 тезисов и материалов конференций.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, 3 глав, заключения, списка литературы из 288 источников. Материал работы изложен на 200 страницах, содержит 96 рисунков, 46 таблиц.

Личный вклад автора. Все научные результаты, представленные в диссертации, получены соискателем лично, либо совместно с научным руководителем. Личное участие автора заключается в проведении экспериментальных исследований (подготовка образцов, постановка и выполнение экспериментов), обработке и анализе результатов исследований, подготовке материалов для научных статей и докладов.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Обращенно-фазовая хроматография

Обращенно-фазовая высокоэффективная хроматография в настоящее время является наиболее часто используемым методом хроматографического анализа в аналитических лабораториях различного профиля всего мира [1, 2]. Это обусловлено способностью метода разделять соединения широкого спектра липофильности (от хорошо растворимых в воде до нерастворимых в ней) с использованием одной и той же хроматографической колонки только за счет изменения состава подвижной фазы.

Сам термин «обращенно-фазовая» указывает на изменение химических свойств сорбента за счет превращения традиционных нормально-фазовых (т.е. полярных) сорбентов (типа силикагеля) в сорбент, способный удерживать неполярные вещества [3].

1.1.1 Типы обращенно-фазовых сорбентов

Известно предложение трех принципиально различающихся вариантов ковалентного модифицирования поверхности силикагеля [4, 5]:

- 1) реакцией силанольных групп со спиртами с образованием эфирной связи (Si-O-C); модифицированные по такому механизму стационарные фазы прекрасно проявили себя в газовой хроматографии, но мало пригодны для жидкостной хроматографии из-за низкой устойчивости таких связей к гидролизу;
- 2) реакцией силанольных групп (лучше после хлорирования) с первичными или вторичными аминами с образованием группировки (Si-N-C) достаточно стабильной даже в водных средах;
- 3) реакцией силанольных групп с хлорсиланами с достаточно устойчивой к гидролизу группировкой (Si-O-Si), уравнение (1.1). В этом случае для смещения равновесия вправо хлороводород связывают добавлением в реакционную смесь основания (например, пиридина):



По типу силилирующего агента обращенно-фазовые (ОФ) сорбенты разделяются, прежде всего, на:

- «мономерные», при синтезе которых используется силан с одной гидролизуемой группой;
- «полимерные» при синтезе которых применяют силан с тремя гидролизуемыми группами [6].

«Полимерные» обращенно-фазовые сорбенты имеют особые свойства, удобные для разделения геометрических изомеров, например, при разделении каротиноидов. При синтезе этих фаз число силанольных групп на поверхности сорбента не уменьшается, как в случае «мономерных» фаз, а существенно увеличивается. Поэтому в настоящей работе все исследования хроматографического поведения фенольных соединений были выполнены только на «мономерных» обращенных фазах.

Сорбционные свойства «мономерных» обращенных фаз зависят не только от состава подвижной фазы, но и от свойств силикагеля (удельной поверхности, объема и размера пор), от степени силилирования поверхностных силанольных групп [7], от длины алкильного радикала привитого слоя [4], а также от некоторых особенностей синтеза и вторичной обработки сорбента [8].

1.1.2 Специфика структуры обращенно-фазовых сорбентов

На поверхности полностью гидроксированного силикагеля может находиться 8 мкмоль/м² (или 4.8 групп на нм²) силанольных групп, из которых из-за стерических причин только половина (4-4.5 мкмоль/м²) могут быть дериватизированы по реакции (1.1) [8]. При этом плотность укладки алкильных групп в алканах в твердом состоянии в два раза выше, поэтому между привитыми радикалами существует значительное пространство, достаточное для проникновения в привитую фазу алкильных групп из потенциальных сорбатов [9]. Следовательно, находящиеся между привитыми группами силанольные группы могут быть доступными для молекул сорбатов. Это одна из причин возможного проявления активности остаточных силанольных групп, которые не могут быть закрыты за счет эндкеппинга по тем же стерическим причинам.

Для подавления активности остаточных силанольных групп разработан прием под названием эндкеппинг [5]. Одним из практически реализованных приемов подавления активности остаточных силанольных групп стало создание обращенных фаз с эмбедингом [10]. Из таких стационарных фаз одними из первых коммерчески доступных продуктов были фазы Supelco ABZ++ и Symmetry Shield, в которых в качестве полярных функциональных групп использовались внутренняя амидная или карбаматная группы. В последующих исследованиях сравнивая фазы с внедренной карбаматной группой с мономерными сорбентами, было обнаружено, что удерживание полярных и основных соединений резко снизилось. Такое явление объяснялось ослаблением взаимодействия между несвязанными силанольными группами и анализируемыми веществами в результате внедрения карбаматных групп. Однако было также отмечено, что нейтральные

анализируемые вещества также в меньшей степени удерживаются на этих фазах, что было связано с различиями между содержанием углерода в экранированной фазе и ОФ С18, используемой для сравнения. Полярные и кислотные анализируемые вещества, например, фенол и бутилпарабен, несколько больше удерживались на карбаматной фазе.

1.1.3 Методы характеристики обращенных стационарных фаз

Для характеристики свойств стационарных обращенных фаз принят ряд точечных хроматографических процедур, которые должны быть выполнены при некотором определенном составе подвижной фазы.

Единственным измеряемым параметром удерживания сорбата i в хроматографии является время удерживания, $t_R(i)$, которое может быть пересчитано на удерживаемый объем, $V_R(i)$. Сравнение времен удерживания некоторых сорбатов на различных стационарных фазах при одном и том же составе подвижной фазы и при постоянной температуре использовать не следует, поскольку данный параметр зависит от размеров колонки и скорости подачи подвижной фазы. В этом случае используется фактор удерживания, $k(i)$, который уже не измеряется, а рассчитывается с использованием «мертвого» времени колонки, t_0 или t_M , [2, 11] по формуле (1.2).

$$k(i) = \frac{t_R(i) - t_0}{t_0}. \quad (1.2)$$

Однако и сопоставление факторов удерживания колонок различных марок дает неоднозначную характеристику, поскольку фактор удерживания является произведением константы распределения сорбата, $K(i)$, на фазовое соотношение колонки, ϕ :

$$k(i) = K(i) \cdot \phi. \quad (1.3)$$

Но фазовое соотношение колонки может существенно различаться при переходе между марками сорбентов. Однозначным оказывается только соотношение между факторами удерживания двух сорбатов (селективность разделения сорбатов i и j , $\alpha(i/j)$), удерживание которых измерено в одинаковых хроматографических условиях, поскольку в этом случае фазовое соотношение сокращается:

$$\alpha(i/j) = k(i)/k(j) = K(i)/K(j). \quad (1.4)$$

Однако и данный вариант точечной (т.е. рассчитанный для одного состава подвижной фазы) характеристики трудно признать идеальным, поскольку при смене состава подвижной фазы он может существенно изменяться вплоть до обращения порядка

элюирования. Тем не менее, данный метод используется широко. Некоторые из известных тестов на гидрофобность суммированы в работе [12].

Гидрофобность колонок

а) согласно тесту Энгельгардта, рассчитывается по формуле:

$$\text{гидрофобность} = k_{\text{этилбензол}}/k_{\text{толуол}}, \quad (1.5)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 49:51 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

б) согласно тесту, Walters:

$$\text{гидрофобность} = k_{\text{антрацен}}/k_{\text{бензол}}, \quad (1.6)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы ацетонитрил/вода 65:35 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

в) согласно тесту Танака:

$$\text{гидрофобность} = k_{\text{амилбензол}}/k_{\text{бутилбензол}}, \quad (1.7)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 80:20 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

г) согласно тесту Галушко:

$$\text{гидрофобность} = (k_{\text{толуол}} + k_{\text{бензол}})/2, \quad (1.8)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 60:40 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

Активность остаточных силанольных групп

а) согласно тесту Энгельгардта, рассчитывается как фактор асимметрии пика *пара*-этиланилина при составе подвижной фазы метанол/вода 55:45 об. %, температура 40°C.

б) согласно тесту Walters:

$$\text{силанольная активность} = k_{N,N\text{-диэтил-мета-толуамид}}/k_{\text{антрацен}}, \quad (1.9)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы ацетонитрил 100 %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

в) согласно тесту Танака:

$$\text{активность по образованию водородных связей} = k_{\text{кофеин}}/k_{\text{фенол}}, \quad (1.10)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 80:20 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

г) согласно тесту Галушко:

$$\text{активность силанольных групп} = 1 + 3 \cdot [(k_{\text{анидин}} + k_{\text{фенол}}) - 1], \quad (1.11)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 60:40 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

Стерическая селективность.

Согласно тесту Танака:

$$\text{стерическая селективность} = k_{\text{трифенилне}}/k_{\alpha\text{-терфенил}} \quad (1.10)$$

где факторы удерживания определяют при составе подвижной фазы метанол/вода 80:20 об. %, температура 40°C, метчик мертвого объема – урацил.

1.1.4 Механизмы удерживания в обращенно-фазовой хроматографии

Для ОФ ВЭЖХ рассматривают два принципиально различающихся механизма сорбции: распределительный (абсорбционный) и адсорбционный. Под распределительным механизмом понимается примерно полное погружение сорбата в стационарную фазу, тогда как под адсорбционным механизмом подразумевается только контакт сорбата с поверхностью сорбента [13, 14].

Распределительный механизм удерживания обеспечивается указанной ранее невысокой плотностью привитых алкильных радикалов на поверхности сорбента, допускающий проникновение в этот слой молекул сорбатов, удовлетворяющих ряду условий, среди которых – высокая липофильность молекул сорбатов. Принципиально, пустоты между алкильными радикалами могут быть заполнены их конформационными превращениями, рис. 1.1.

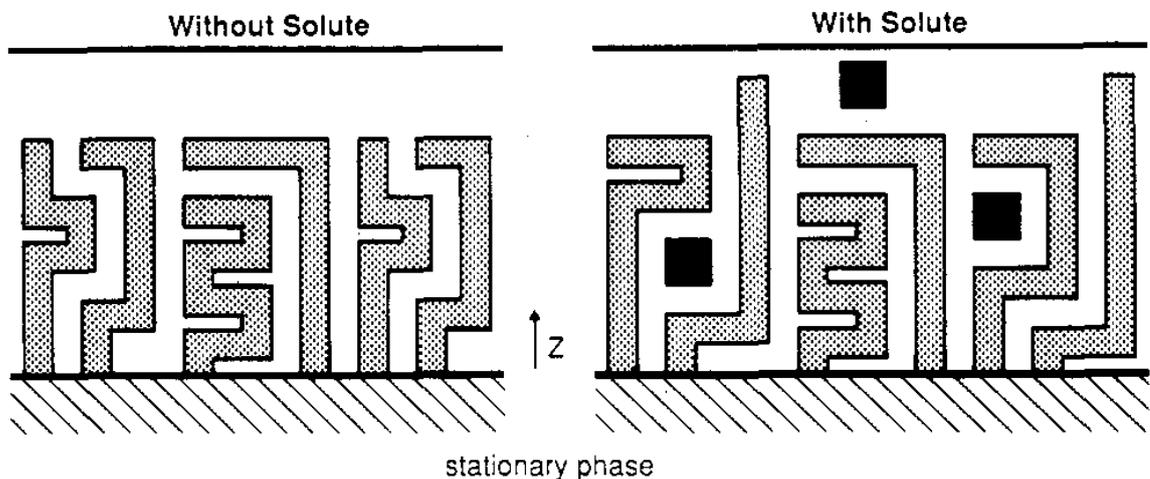


Рисунок 1.1 – Модель изменений при сорбции веществ на стационарных фазах высокой плотности алкильных радикалов [14]

В таком случае проникновение молекул сорбата сопровождается новыми конформационными превращениями в стационарной фазе. А в целом известны три модели организации алкильных цепей стационарной обращенной фазы, рис. 1.2.

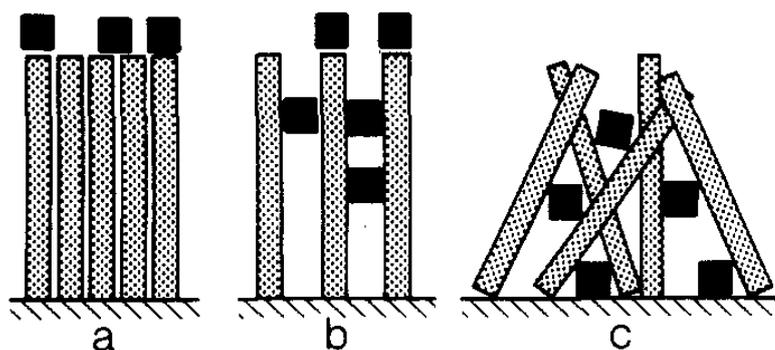


Рисунок 1.2 – Традиционные модели молекулярной организации алкильных цепей в обращенной стационарной фазе: а) «частокол» (picket fence); б) «мех» (fur); в) «стек» (stack).

Что касается варианта (а) – он мог бы быть организован при специальном варианте образования привитой фазы на всех силанольных группах (обращенных в сторону подвижной фазы), если исключены стерические затруднения, связанные с двумя метильными группами у атома кремния в обычном варианте силилирования. Вариант (б) представляется наиболее вероятным, однако следует учитывать, что кроме сорбата между алкильными радикалами должны находиться и молекулы органического модификатора подвижной фазы. Также при росте размеров сорбата возможны конформационные изменения в алкильных группах, увеличивающие размер полости, в которую внедряется сорбат. Это же можно предположить и для варианта (в).

Адсорбционный механизм удерживания на обращенных фазах заметно отличается от распределительного, и имеется существенное отличие этого процесса от удерживания в условиях нормально-фазовой хроматографии, состоящее в нелокализации адсорбции.

Одной из популярных моделей удерживания была “сольвофобная теория” Меландера и Хорвата [15], которая связывала удерживание с поверхностным натяжением подвижной фазы растворителя. Но, по мнению авторов работы [14], сольвофобная теория не полностью корректна, поскольку не учитывает взаимодействия растворенного вещества с неподвижной фазой, и поэтому предсказание сольвофобной теории о том, что удерживание не зависит от природы стационарной фазы, не соответствует экспериментальным данным.

Механизм разделения в обращенно-фазовой хроматографии зависит от взаимодействия гидрофобного связывания между молекулой растворенного вещества в подвижной фазе и иммобилизованным гидрофобным лигандом, т.е. неподвижной фазой. Фактическая природа самого гидрофобного связывающего взаимодействия является

предметом споров [16], но общепринятая точка зрения предполагает, что связующее взаимодействие является результатом благоприятного энтропийного эффекта [1].

В работе [17], опираясь на полученные термодинамические параметры, был сделан вывод о том, что невозможно четко выявить различия между распределительным (объемным распределением) и адсорбционным (поверхностной сорбцией неполярных сорбатов) механизмами удерживания в ОФ ВЭЖХ.

Для дифференциации распределительного и адсорбционного (гидрофобного выталкивания на поверхность) механизмов в условиях ОФ ВЭЖХ в работе [18] предлагалось сопоставлять удерживания сорбатов на силикагелях (желательно одной марки) с различной длиной привитого углеводородного радикала при нескольких составах подвижных фаз. Для веществ, удерживающихся предпочтительно по механизму распределения, удерживание сильно зависит от объема привитой фазы, резко уменьшаясь в ряду фаз $t_R(C18) \gg t_R(C8) \gg t_R(C4)$. Для веществ с полярными фрагментами реализуется механизм гидрофобного выталкивания на поверхность. В этом случае удерживание не зависит от длины привитого радикала.

Стоит отметить, что на практике не все так однозначно. В ходе исследования хроматографического поведения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ были обнаружены закономерности, характерные как для распределительного, так и для адсорбционного механизмов, в результате чего был предложен новый гибридный механизм, названный авторами работы [19] «поплавочным». По предложенному подходу в стационарную фазу проникает только агликон, а гликозидный радикал в качестве условного «поплавка» остается на поверхности. В таком случае для десорбции антоцианов необходимо не только вытеснение флавилиевой части из слоя сорбента, но и снятие гликозидного радикала с его поверхности [4].

1.1.5 QSRR в ОФ ВЭЖХ

QSRR (quantitative structure–retention relationships) обозначает статистически установленную взаимосвязь между строением и удерживанием сорбатов. Обычно этот подход основывается на общепринятой линейной взаимосвязи свободной энергии (LFER) при сопоставлении различных свойств соединений.

В последние два десятилетия QSRR часто применялись к [20]:

- предсказанию удерживания сорбатов;
- определению наиболее информативных структурных дескрипторов анализируемого вещества;

- пониманию молекулярного механизма, действующего в исследуемой хроматографической системе;
- оценке сложных физико-химических свойств аналитов, отличающихся от хроматографических;
- прогнозированию относительной биологической активности в ряду лекарственных соединений.

В первом варианте применения QSRR определяли корреляцию между логарифмом фактора удерживания ($\lg k$) и логарифмом коэффициента распределения вещества в системе «октанол-1 – вода», $\log P$ [21].

Второй вариант использования метода был основан на сольватохромном сравнении и на линейной взаимосвязи энергии сольватации, предложенный Абрахамом и др.

Третий вариант использует сопоставление удерживания с квантово-химическими и иными расчетными дескрипторами.

В линейном уравнении свободной энергии используют пять молекулярных дескрипторов для характеристики взаимодействий сорбата [22]:

$$SP = c + rR_2 + s\pi_2^H + a\Sigma\alpha_2^H + b\Sigma\beta_2^0 + vV_x \quad (1.11)$$

где SP – свойство сорбата, такое, как, например, параметр удерживания t_R , $\lg k$, $\lg k_w$; R_2 – избыточная молярная рефракция, π_2^H – диполярность-поляризуемость сорбата; $\Sigma\alpha_2^H$ и $\Sigma\beta_2^0$ – суммарная или эффективная кислотность и основность (при образовании водородных связей), V_x – характеристический (McGowan) объем. Остальные коэффициенты уравнения (1.11) (c , r , s , a , b и v) определяют с помощью множественного линейного регрессионного анализа и описывает меру различий в свойствах между двумя фазами (стационарной и подвижной) системы. Константа r дает меру склонности растворителя взаимодействовать π - и n -электронными парами сорбата; константа s является мерой диполярности-поляризуемости; константа a измеряет основность использованной хроматографической системы, а константа b – аналогично для кислотных свойств; а константа v является мерой гидрофобности.

Очевидно, что метод является точечным, т.е. соответствующий конкретной хроматографической системе, если не используется логарифм фактора удерживания в чисто водных подвижных фазах, и применим только к веществам, для которых имеются литературные данные по значениям их дескрипторов. Кроме того, метод весьма затратный. Достоинством метода считают возможность оценки вклада различных типов взаимодействий в суммарное удерживание, как характеристику механизма удерживания сорбата.

1.1.6 Зависимость удерживания от состава подвижной фазы

Правильно подобранный состав подвижной фазы (ПФ) также важен, как и выбор хроматографической колонки. ПФ представляет собой смесь одного или нескольких органических растворителей с водой или буферным раствором. Основными характеристиками ПФ является ее элюирующая способность и селективность. С увеличением содержания органического растворителя в составе ПФ повышается элюирующая способность ПФ, которая выражается в первую очередь эмпирическим уравнением Снайдера [23]:

$$\lg k(i) = a_0(i) - a_2(i) \cdot \varphi(OM), \quad (1.12)$$

где логарифм фактора удерживания сорбата i линейно зависит от φ – объемной доли органического модификатора (OM), а $a_0(i)$ – асимптотическая характеристика – логарифм фактора удерживания сорбата в подвижных фазах с $\varphi = 0$. Однако в широком диапазоне составов подвижных фаз экспериментальные данные лучше описываются квадратичным уравнением [24]:

$$\lg k(i) = a_0 - a_1 \cdot \varphi(OM) + a_2 \cdot \varphi^2(OM) \quad (1.13)$$

Другой вариант по вытеснительной модели – уравнение Мураками [25], в котором в некотором диапазоне составов подвижных фаз удерживание вещества зависит от концентрации ацетонитрила по уравнению (1.14), где коэффициент перед логарифмом молярной концентрации (n) рассматривается как количество молей ацетонитрила, вытесняемого при сорбции этого вещества:

$$\lg k(i) = a_i - n(i) \cdot \lg c(OM) \quad (1.14)$$

Помимо элюирующей способности подвижная фаза должна обладать селективностью по отношению к компонентам разделяемой смеси. Селективность подвижных фаз связана с их способностью к специфическим взаимодействиям с сорбатами и определяется в первую очередь природой более сильного компонента смеси [26].

Классификация селективности органических растворителей для хроматографии была предложена Снайдером на основе экспериментально найденных Роршнайдером методом ГХ коэффициентов распределения трех эталонных образцов (этанол, 1,4-диоксан, нитрометан) для большого количества неподвижных фаз [27].

Как известно, растворители способны вступать в различные типы межмолекулярных взаимодействий. За основу Снайдером было взято три из них: протонодонорные (X_e), протоноакцепторные (X_d) и диполь-дипольные (X_n), которые послужили гранями так называемого треугольника селективности (Снайдера), в котором

сгруппированы все распространенные растворители. Окружности внутри треугольника отражают 8 групп, содержащих 82 исследованных Снайдером растворителя [28], рис. 1.3.

Идея, лежащая в основе треугольника, заключается в том, что растворители в одних и тех же группах обеспечивают сопоставимую селективность разделения. Следовательно, переход от одного растворителя к другому в пределах одной и той же группы не приведет к столь резкому изменению селективности, как замена одного растворителя на другой из групп с очень разными характеристиками (например, переключение с группы I на группу VII или VIII).

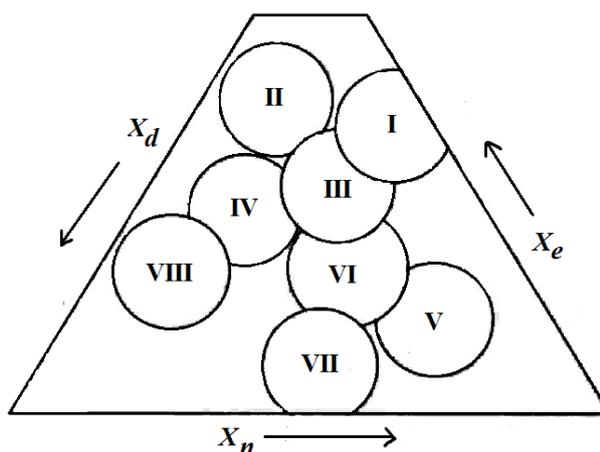


Рисунок 1.3 – Треугольник селективности Снайдера

Важно отметить, что Снайдер изменил традиционное определение хроматографической селективности, приведя различие между силой растворителя и его селективностью, заявляя, что сила растворителя зависит от его «полярности» или способности предпочтительно растворять более полярные соединения, такие как нитрилы и спирты. Селективность растворителя относится к способности данного растворителя избирательно растворять одно соединение в отличие от другого, где «полярности» двух соединений явно не различаются [28].

В таблице 1.1 представлены наиболее распространенные растворители по группам селективности. Органический модификатор добавляют для снижения полярности водной подвижной фазы. Чем ниже полярность подвижной фазы, тем выше ее элюирующая способность. В ОФ ВЭЖХ возможно использование большого разнообразия органических растворителей, на практике предпочтение отдают в основном ацетонитрилу и метанолу. Несмотря на то, что изопропанол обладает весьма хорошей элюирующей способностью, его применение в качестве органического модификатора ограничено из-за высокой вязкости данного вещества, что может повлечь за собой снижение эффективности колонки и повышению давления на входе в колонку.

Таблица 1.1 – Классификация растворителей по Снайдеру

Группа	Растворители
I	Изопропиловый эфир
II	Этанол, метанол, <i>n</i> -пропанол, изопропанол, <i>n</i> -бутанол, <i>трет</i> -бутанол, изопентанол, <i>n</i> -октанол
III	Тетрагидрофуран
IV	Гликоли, формамид
V	Дихлорметан
VI	Диоксан, ацетонитрил, ацетон
VII	Нитрометан, бензол, толуол, хлорбензол
VIII	Фторированные спирты, вода, хлороформ

Органический модификатор добавляют для снижения полярности водной подвижной фазы. Чем ниже полярность подвижной фазы, тем выше ее элюирующая способность. В ОФ ВЭЖХ возможно использование большого разнообразия органических растворителей, на практике предпочтение отдают в основном ацетонитрилу и метанолу. Несмотря на то, что изопропанол обладает весьма хорошей элюирующей способностью, его применение в качестве органического модификатора ограничено из-за высокой вязкости данного вещества, что может повлечь за собой снижение эффективности колонки и повышению давления на входе в колонку.

Классификация растворителей по Снайдеру является обобщенным (а не точечным) вариантом оценки свойств потенциальных компонентов подвижных фаз. Но анализ литературы по использованию ОФ ВЭЖХ при разделении сорбатов, как правило, не содержит информацию о том, почему были выбраны (и в каком количестве) компоненты подвижных фаз, поэтому нет информации о том, как может измениться удерживание сорбатов при изменении условий хроматографирования. В этом отношении также обобщенным методом оценки хроматографических систем в широком диапазоне составов является метод относительного анализа удерживания [29, 30], который может быть дополнен выяснением физического смысла параметров относительного развития.

1.1.7 Элюенты в ОФ ВЭЖХ и «зеленая» хроматография

Ацетонитрил обладает рядом физико-химических свойств, благоприятных для хроматографирования: относительная невысокая вязкость, отсутствие хромофоров в УФ и видимой областях, доступность высокоочищенного растворителя, пригодного для градиентного элюирования со спектрофотометрическим детектированием, низкая

летучесть. Несмотря на перечисленные преимущества, выделяют два основных недостатка ацетонитрила – высокую стоимость и токсичность для человека и окружающей среды [31]. Это стало причиной возникновения нового направления в хроматографии в рамках «зеленой химии», целью которой является уменьшение или исключение использования органических вредных для окружающей среды растворителей [32].

В ОФ ВЭЖХ для элюирования аналитов необходимо использовать водно-органические смеси с регулирующими рН добавками, которые должны удовлетворять ряду требований по физическим свойствам, включая ограничения по вязкости, по летучести, по возможности применения спектрофотометрического детектирования в необходимом диапазоне длин волн. Для определения антоцианов в варианте ОФ ВЭЖХ элюирующую силу подвижной фазы наиболее часто регулируют изменением концентрации ацетонитрила. С недавних пор наблюдается тенденция отказа от этого растворителя – токсичного для человека и окружающей среды, стоимость которого существенно выросла в последние годы [33]. В этом отношении метанол, являясь токсичным для человека, менее опасен для окружающей среды [34], и относится к дешевым растворителям. Ацетонитрил достаточно химически инертен, чтобы беспрепятственно применяться в смеси с водой и разнообразными кислотами, включая муравьиную, добавка которой (до 10 об. %) необходима для перевода антоцианов во флавилиевую форму [35]. В отличие от ацетонитрила, метанол способен этерифицироваться карбоновыми кислотами с образованием существенно более гидрофобных сложных эфиров, поэтому времена удерживания аналитов могут уменьшаться в процессе использования смесей метанола с муравьиной кислотой. Впрочем, присутствие большого количества воды в приемлемых для определения антоцианов подвижных фазах смещает равновесие реакции этерификации в сторону исходных кислоты и спирта. Следует отметить, что в литературе описано использование для разделения антоцианов смесей метанола, муравьиной кислоты и воды в одном компоненте подвижной фазы, при этом отсутствуют указания на проблемы со стабильностью времен удерживания аналитов в изократическом режиме [36, 37], или градиентных режимах элюирования [38–42] в условиях ОФ ВЭЖХ.

1.2 Фенольные соединения. Классификация и биологическая роль

Фенольные соединения (ФС) – наиболее распространенные вторичные метаболиты, повсеместно присутствующие во многих видах и царствах растений. Вторичные метаболиты играют важную роль в адаптации растений к окружающей среде и в процессе их восстановления в стрессовых условиях. Помимо защиты растений, вторичные

метаболиты, такие как фенольные соединения, играют большую роль в жизнедеятельности человека, действуя как заживляющее, антимикробное, противовоспалительное и противоопухолевое средство [43]. Термин «фенольные соединения» охватывает широкий спектр растительных веществ, которые, обычно, имеют ароматическое кольцо с одним или несколькими гидроксильными заместителями. Фенольные вещества, как правило, водорастворимы, так как они чаще всего встречаются в сочетании с сахаром в виде гликозидов и обычно располагаются в клеточной вакуоли. Среди природных фенольных соединений, из которых известно несколько тысяч структур, флавоноиды образуют самую большую группу, однако простые моноциклические фенолы, фенилпропаноиды и фенольные хиноны также существуют в значительном количестве [44].

Все фенольные соединения являются ароматическими, поэтому все они демонстрируют интенсивное поглощение в УФ-области спектра.

Некоторые растворимые ФС широко распространены, например, хлорогеновая кислота, но распространение большинства других ФС ограничено определенными родами или семействами, что делает их удобными биомаркерами для таксономических исследований [45], хемосистематических в частности [46].

Классификация ФС в основном проводится по строению их углеводородного скелета: С₆ (простой фенол, бензохиноны), С₆-С₁ (фенольные кислоты), С₆-С₂ (ацетофенон, фенилуксусные кислоты), С₆-С₃ (оксикоричные кислоты, кумарин, фенилпропаны, хромоны), С₆-С₄ (нафтохиноны), С₆-С₁-С₆ (ксантоны), С₆-С₂-С₆ (стильбены, антрахиноны), С₆-С₃-С₆ (флавоноиды, изофлавоноиды, неофлавоноиды), полимерные ФС [45].

Интерес к исследованию ФС обусловлен обширным набором полезных свойств для здоровья человека, одним из которых является высокая антиоксидантная активность (АОА). Благодаря наличию гидроксильных групп, особенно в *орто*-положении, ФС способны «захватывать» свободные радикалы, активные формы кислорода и хелатные ионы металлов [47]. ФС синтезируются в природе в ответ на вредные раздражители окружающей среды, такие как: УФ-излучение, атаки патогенов, насекомые или иные повреждения [48]. В работе [49] рассматривается определение содержания ФС, во фруктах, основные методы экстракции, количественного определения и антиоксидантный анализ. Содержание ФС и антиоксидантная активность 32 лекарственных растений были исследованы в работе [50], авторы которой указывают на прямую зависимость увеличения антиоксидантной активности от содержания ФС в растительных объектах. В работе [51]

исследованы основные биоактивные ФС морских водорослей и механизмы их действия на здоровье человека.

1.2.1 Антоцианы. Хроматографические методы определения

Антоцианы – водорастворимые растительные пигменты, придающие окраску различным вегетативным частям растений от голубой до темно-красной и выступающие в роли защитного барьера для растений от УФ-излучения [54]. Антоцианы обладают рядом полезных для здоровья человека свойств: антиоксидантная активность, гепатопротекторная функция, антибактериальная и т.д. [55].

Антоцианы представляют собой гликозилированные полигидрокси- и метокси- производные 2-фенилбензопирилиевого катиона (флавилиевого катиона), рис. 1.4 [56].

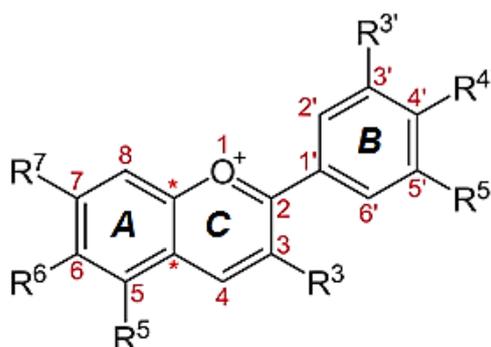


Рисунок 1.4 – Строение катиона флавилия

Флавилиевый катион является основой – агликоном. Агликоны в свою очередь называются антоцианидинами, из которых можно выделить шесть наиболее значимых и распространенных в различных растительных объектах, таблица 1.2.

В работе [57] обнаружили, что агликоны наиболее распространенных в пище антоцианов, цианидина (Cy) и дельфинидина (Dp), обладают способностью ингибировать рост опухолевых клеток человека *in vitro*.

В настоящее время известно более 600 (в работе за 2022 год [57] говорится о более 700) антоцианов, выделенных из растительных и природных объектов [59]. Такое разнообразие обусловлено различной степенью гидроксирования и/или метоксилирования основных агликонов [60]. Добавление гидроксильных или метоксильных групп к кольцу способствуют bathochromному сдвигу полосы поглощения [61].

Таблица 1.2 – Основные агликоны (антоцианидины)

Агликоны	Заместители в положении						
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
Пеларгонидин (Pg)	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Цианидин (Cy)	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Пеонидин (Pn)	-OCH ₃	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Дельфинидин (Dp)	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Петунидин (Pt)	-OH	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH
Мальвидин (Mv)	-OCH ₃	-OH	-OCH ₃	-OH	-OH	-H	-OH

Фрагменты сахаров чаще всего могут присоединяться через гликозидную связь в положениях 3-, 5- и 7-. Это могут быть моносахариды: глюкоза (Glu), галактоза (Gala), арабиноза (Ara), ксилоза (Xyl) и рамноза (Rha); дисахариды и трисахариды: рутиноза (Rut), софороза (Sopho), самбубиоза (Sam) и т.д. [62]. Возможно ацилирование антоцианов ароматическими и/или алифатическими кислотами такими как: уксусная, малоновая, яблочная, янтарная, щавелевая, производные коричных и бензойных кислот. Известно также, что ацилирование антоцианов замещенными коричными кислотами приводит к более интенсивному окрашиванию и к широкому спектру оттенков, особенно при диацилировании [63].

На различные вариации цветовой палитры антоцианов также влияет и pH. Несмотря на то, что антоцианы более стабильны при низких значениях pH, чем в растворах с высоким значением pH, диапазон цветов и оттенков антоцианов разнообразен при pH от 1 до 14 [56, 64], что связано с существованием нескольких форм антоцианов.

В водных растворах антоцианы существуют в виде четырех основных равновесных форм, представленных на рисунке 1.4, где I – хиноидное основание А, II – катион флавилия АН⁺, III – карбинол или псевдооснование В и IV – халкон С.

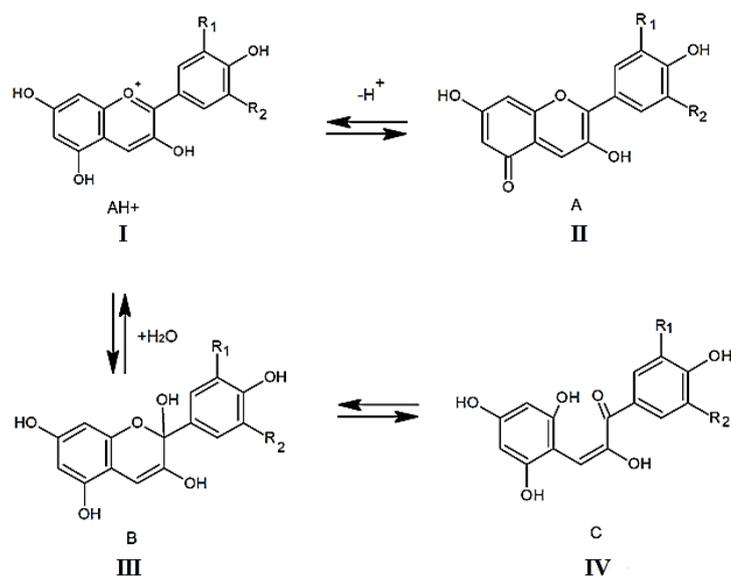


Рисунок 1.5 – Основные равновесные формы антоцианов

Из представленных четырех форм антоцианов наиболее окрашенным и стабильным является флавилиевый катион (флавилиевая форма – красного цвета). Поэтому при исследовании антоцианов хроматографическими и/или спектрофотометрическими методами необходима кислая среда для перевода всех форм антоцианов в окрашенную флавилиевую форму, которая позволяет детектировать только антоцианы в присутствии большого количества других экстрактивных веществ, не имеющих окраски. В случае повышения pH доля флавилиевой формы снижается практически до нуля уже при pH 4.5

Хроматографические методы определения

Хроматографическим методам определения антоцианов посвящено большое количество статей в мировой литературе. Превалирующим в настоящее время является метод ВЭЖХ. Для выделения индивидуальных антоцианов используют наиболее универсальный метод разделения и очистки – препаративную жидкостную хроматографию (в частности ее современную и упрощенную версию – флэш-хроматографию) [65-67].

Одним из простых и дешевых методов выделения антоцианов также может служить ТСХ. Наиболее часто используемой системой для разделения антоцианов в условиях ТСХ является система БУВ (бутанол-уксусная кислота-вода) [68, 69], также в качестве органического модификатора могут быть использованы этанол [70], этилацетат [71], ацетон [72].

Однако наиболее распространенным и эффективным методом остается ОФ ВЭЖХ с водно-органическими подвижными фазами, подкисленными органическими или неорганическими кислотами [73]. Наиболее распространенной стационарной фазой для

анализа в условиях ОФ ВЭЖХ является C18. Наиболее распространённым органическим модификатором является ацетонитрил, реже используется метанол.

Выбор между изократическим или градиентным режимом элюирования всегда зависит от объектов исследования. Например, в случае исследования антоцианового состава плодов голубики, в котором находятся 15 мономерных антоцианов, построенных на пяти антоцианидинах с существенно различающимся удерживанием, градиентный режим предпочтительнее изократического [74], а проводимые ранее исследования в нашей лаборатории [75] показали, что возможно сочетание этих двух режимов в условиях ОФ ВЭЖХ. Изократический режим на начальном моменте анализа был дополнен градиентным для анализа объектов, содержащих неацелированные и ацелированные антоцианы одновременно. Это позволяет разделить не только 3-глюкозиды и 3,5-диглюкозиды основных антоцианидинов винограда, но и более сильно удерживаемые ацелированные компоненты.

В таблице 1.3 представлены лишь некоторые растительные объекты, содержащие антоцианы и условиях их ВЭЖХ анализа.

Таблица 1.3 – Определение антоцианов методом ОФ ВЭЖХ

Источник антоцианов	Условия хроматографирования	Ссылка
Ягоды малины	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Symmetry C18	[76]
Плоды ирги		[77]
Плоды черной смородины		[78]
Плоды красной смородины		[79]
Ягоды виноград		[80]
Листья церциса	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH / H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 150×4.6 мм Symmetry C18	[81]
Пурпурная кукуруза	ПФ: CH ₃ CN — HCOOH – H ₂ O СФ: 150 × 2.1 мм Kromasil-100 5C18	[82]
Листья пурпурного базилика		[83]
Цветки иван-чая		[84]
Лепестки тюльпанов		[85]
Плоды вишни	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Reprosil-Pur C18 AQ	[86]
Плоды боярышника		[87]
Плоды черники, брусники, клюквы	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Luna 5u C18(2)	[88]

Таблица 1.3 – Определение антоцианов методом ОФ ВЭЖХ

Плоды кизила	ПФ: CH ₃ CN – – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 150×4.6 мм Eclipse XTВ-C18	[89]
Плоды голубики	ПФ: CH ₃ OH – HCOOH – H ₂ O; CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O; CH ₃ CN – CH ₃ COOH- H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Zorbax SB-C18	[74]
Плоды сливы	ПФ: CH ₃ OH – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 150×4.6 мм Eclipse XDB-C18	[90]
Плоды черноплодной рябины, черной моркови	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Luna C18.	[91]
Краснокочанная капуста	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 150×4.6 мм Cortecs C18	[92]

С увеличением числа гидроксильных групп в ядре флавилия, время удерживания антоцианидинов уменьшается, а при добавлении приводит к усилению удерживания. В итоге для антоцианидинов удерживание растет в ряду:

дельфинидин → цианидин → петунидин → пеларгонидин → пеонидин → мальвидин.

Удерживание неацилированных гликозидов по сравнению с агликонами уменьшается.

В качестве альтернативы ОФ ВЭЖХ может выступать гидрофильная жидкостная хроматография (ГФХ), особенностью которой является высокое содержание органического модификатора в подвижной фазе. Требованием к такому модификатору – способность растворять полярные аналиты без сильного полярного взаимодействия не только с аналитом, но и со стационарной фазой [93].

Несмотря на то, что метод ГФХ распространен и широко применяется, публикаций, посвященных его использованию при определении антоцианов немного. В работе [94] было показано, что в условиях ГФХ эффективно отделяются диглюкозиды, что позволяет использовать этот подход для предварительной количественной оценки содержания мальвидин-3,5-диглюкозида в винах и виноматериалах. В работе [95] с использованием диольной стационарной фазы были выявлены некоторые общие закономерности хроматографического поведения антоцианов в условиях ГФХ: удерживание возрастает при переходе от 3-моноголикозидов цианидина к 3-дигликозидам и далее к 3-тригликозидам, что указывает на возможность отнесения пиков по типам

гликозилирования антоцианидинов; в случае однотипных соединений с разными радикалами удерживание увеличивается в ряду от рамнозильного к пентозильному и затем к гексозильному; удерживание антоцианов почти не зависит от изомерных различий в строении углеводного радикала. В работе [96] с использованием колонки с силикагелем Силасорб 300, в отличие от разделения антоцианов на диольной фазе [95], было показано, что степень гидроксирования или метоксилирования антоцианидина мало сказывается на удерживании.

1.2.2 Фенольные кислоты: производные кофейной кислоты

Термин «фенольные кислоты» в основном описывает фенольные соединения, содержащие карбоксильную группу. Фенольные или фенолкарбоновые кислоты – это вторичные метаболиты, которые являются одним из основных классов растительных фенольных соединений.

Фенольные кислоты – кристаллические соединения, малорастворимые в воде, но хорошо – в спирте, а также в других органических растворителях [97]. Фенольные кислоты являются промежуточными соединениями в цепи биосинтеза фенольных соединений, которые накапливаются во фруктах и овощах (антоцианы, лигнин, танины) [98, 99].

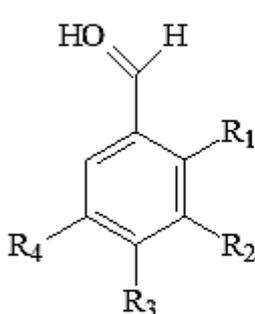
Большинство продуктов питания (фрукты, овощи, кофе, вино, соки, чай и т.д.) в своем составе содержат фенольные кислоты как в индивидуальном состоянии, так и в виде эфиров с некоторыми карбоновыми водорастворимыми кислотами, сахарами и липидами [100-102]. Наибольшее накопление фенольных кислот приходится на семена, кожуру и листья фруктов и овощей.

Выделяют два класса фенольных кислот: гидроксibenзойные кислоты и гидроксикоричные кислоты, которые образуются благодаря бензойной кислоте и коричной кислоте, соответственно. Структуры и тривиальные названия некоторых фенольных кислот представлены на рисунках 1.6, 1.7.

Гидроксикоричные кислоты обладают большей биодоступностью по сравнению с гидроксibenзойными кислотами [103]. Гидроксibenзойные кислоты в основном содержатся в красных фруктах, луке, черной редьке [104].

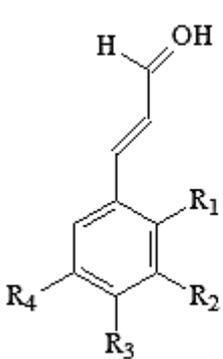
Известно, что производные гидроксикоричных кислот, в частности хлорогеновые кислоты, оказывают положительное влияние на здоровье человека при борьбе с ожирением, сердечно-сосудистыми заболеваниями, сахарном диабете 2 типа [105], а также обладают антиоксидантными, нейропротекторными [109-112], противовоспалительными

[113, 114] антимикробными свойствами [115].



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	H	H	H	бензойная
H	H	ОН	H	<i>пара</i> -гидроксибензойная
H	ОН	ОН	H	протокатеховая
H	ОН	ОН	ОН	галловая
H	H	H	ОСН ₃	анисовая
H	ОСН ₃	ОН	H	ванилиновая
H	ОСН ₃	ОН	ОСН ₃	сиреневая
ОН	H	H	H	салициловая
ОН	H	H	ОН	гентиизиновая

Рисунок 1.6 – Производные бензойной кислоты



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
H	H	H	H	коричная
H	H	ОН	H	<i>пара</i> -кумаровая
H	ОН	ОН	H	кофейная
H	ОН	ОН	ОН	3-гидроксикофейная
H	ОСН ₃	ОН	H	феруловая
H	ОСН ₃	ОН	ОСН ₃	синаповая

Рисунок 1.7 – Производные коричной кислоты

Особый интерес представляют собой кофейная кислота и ее производные – хлорогеновые кислоты. Наличие в структуре *орто*-гидроксильных групп обуславливает высокую антиоксидантную активность хлорогеновых кислот, что и определяет интерес к данным соединениям и к их источникам [116, 117]. Хлорогеновые кислоты представляют собой сложные эфиры кофейной (3,4-дигидроксокоричной) кислоты, другими словами – это продукты этерификации хинной кислоты замещенными коричными кислотами, рисунок 1.8.

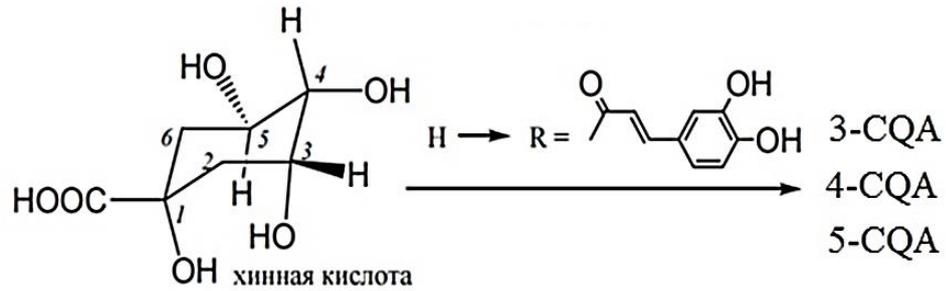


Рисунок 1.8 – Схема этерификации хинной кислоты кофейной

Нумерацию атомов углерода в хинной кислоте следует проводить согласно правилам ИЮПАК, как представлено на рисунке 1.9 [118], поскольку в некоторых публикациях нумерация атомов углерода осуществляется в обратном порядке [115, 119].

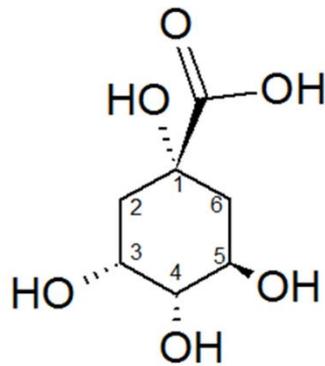


Рисунок 1.9 – Нумерация атомов углерода в хлорогеновой кислоте согласно рекомендациям ИЮПАК

Каждый из изомеров получил свое индивидуальное название: 1-кофеоилхинная кислота – псевдохлорогеновая (1CQA), 3-кофеоилхинная кислота – неохлорогеновая (3CQA), 4-кофеоилхинная кислота – криптохлорогеновая (4CQA), 5-кофеоилхинная кислота – хлорогеновая (5CQA). Однако стоит заметить, что лишь последние три изомера – наиболее часто встречающиеся в природе. Структуры указанных монокофеоилхинных кислоты представлены на рисунке 1.10.

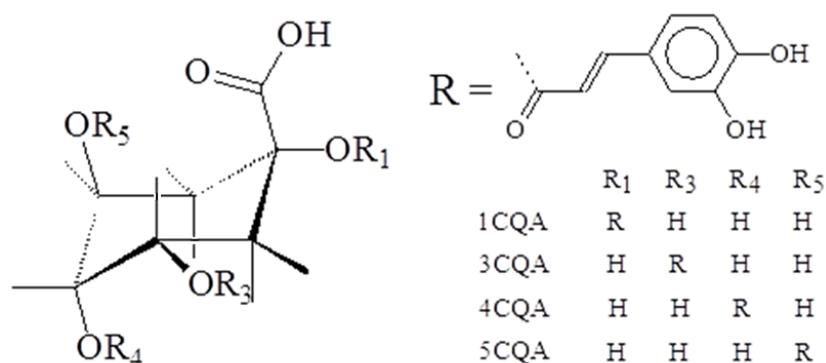


Рисунок 1.10 – Строение монокофеоилхинных кислот

В кофе, напитке матэ и др. обнаруживаются три изомерные дикофеоилхинные кислоты, рис.1.11: 3,4diCQA, 3,5diCQA и 4,5diCQA. Если в образце осуществляются пути биосинтеза, включающие этерификацию гидроксильной группы в положении 1, то возможны еще три изомера дикофеоилхинных кислот: 1,3diCQA, 1,4diCQA и 1,5diCQA.

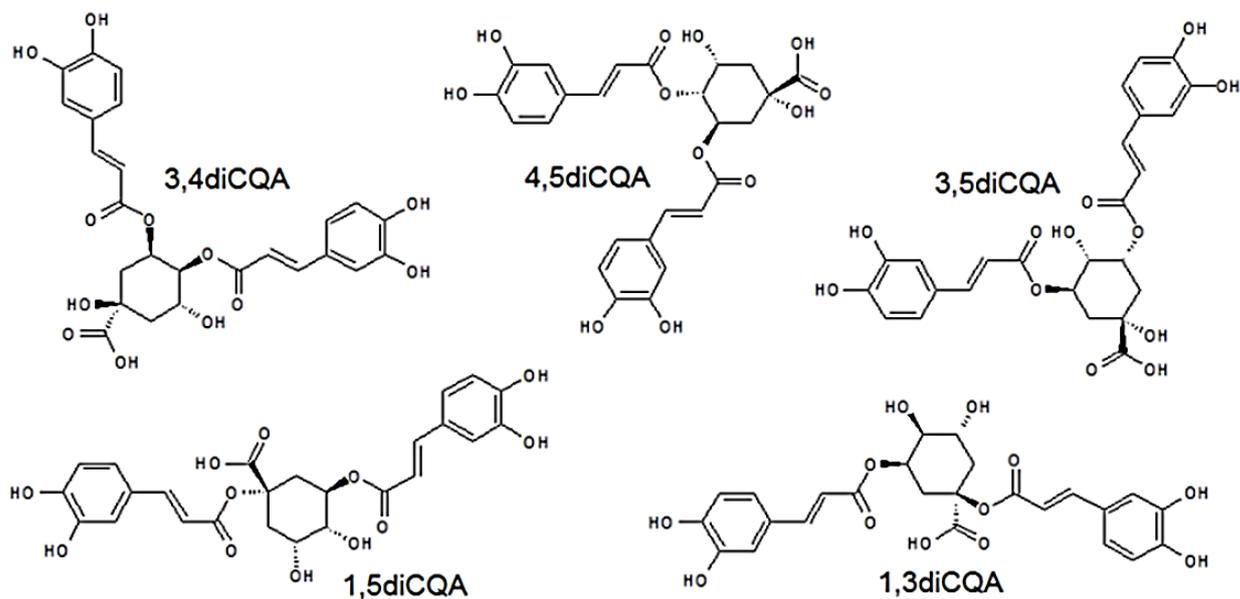


Рисунок 1.11 – Изомеры дикофеоилхинных кислот

Хлорогеновые кислоты содержатся в разных соотношениях в яблоках, [120-121], артишоке [123], апельсинах [124, 125], киви [126], аронии черноплодной [46], винограде [127], сливах [128, 129], грушах [130], жимолости [131], иван-чае [84], помидорах [132], баклажанах [133], оливковом масле [134] листьях табака [135], кофейных зернах [118, 136-138], мате [139] и т.д.

В работе [140] представлены данные о содержании моно- и дикофеоилхинных кислот и кофейной кислоты в 53 растительных объектах, таких как овощи, фрукты и травы. Анализ осуществлялся с использованием ОФ ВЭЖХ. Самый высокий уровень накопления монокофеоилхинных кислот (3CQA, 4CQA, 5CQA) достигался в листовой капусте и в цикории. Было показано, что во всех анализируемых объектах превалирующей оказалась 5CQA. Наиболее высокие концентрации дикофеоилхинных кислот (3,4diCQA, 3,5 diCQA и 4,5 diCQA) были найдены в лавровом листе и листьях горчицы. Кофейная кислота была обнаружена в 22 из исследованных образцов, причем самые высокие уровни были обнаружены в орегано, розмарине, шалфее, базилике и кинзе. По общей сумме содержащихся кислот авторы выделяют лавровый лист, листья горчицы, сельдерей, розмарин, листовую капусту и цикорий.

Хроматографические методы определения

ТСХ используется как достаточно быстрый и распространенный метод определения фенольных кислот в различных растительных объектах, а также лекарственных экстрактах [141-143]. В качестве подвижной фазы чаще всего используются элюенты, содержащие толуол, диоксан или бензол и полярные органические модификаторы такие, как: ацетон, бутанол, этанол или уксусная кислота. Детектирование фенольных кислот осуществляют в УФ свете при 350–365 нм или 250–260 нм.

Известны работы по определению фенольных кислот методом газо-жидкостной хроматография (ГЖХ) [121, 144, 145] Однако стоит заметить, что данный метод не пользуется большой популярностью как, например, ВЭЖХ, так как для хроматографирования в условиях ГЖХ требуется наличие термически устойчивых производных. Для анализа фенольных кислот в растительных материалах газовую хроматографию используют в сочетании с масс-спектрометрией (ГХ-МС). Это обеспечивает лучшую селективность и точность, особенно, когда необходимо проанализировать небольшие количества соединений в растительном материале [146, 147].

Для определения хлорогеновых кислот может быть использован метод капиллярного электрофореза (КЭФ) [148, 149]. Для увеличения степени ионизации применяют щелочные, фосфатный или боратный буферы, капилляры с внутренним диаметром 50 – 100 мкм при напряжении 10-30 кВ и спектрофотометрические или масс-спектрометрические детекторы [150].

Методом сверхкритической флюидной хроматографией (СФХ) в работе [134] удалось разделить 12 фенольных кислот на колонке Platisil CN 250 мм × 4,6 мм, 5 мкм с использованием ПФ «метанол-муравьиная кислота-вода» за 20 мин, что, как утверждают авторы, по сравнению с ВЭЖХ в три раза быстрее и эффективнее (показана лучшая селективность). СФХ успешно использовалась при анализе виноградных косточек, в которых были определены феруловая, протокатехиновая, кофейная и галловая кислоты на диольных колонках с ПФ «метанол-лимонная кислота-вода» [151].

Несмотря на большую эффективность СФХ метод не так широко используется, как традиционные варианты ВЭЖХ

Авторами работы [152] в рамках ОФ ВЭЖХ было осуществлено количественное определение и разделение 16 фенольных кислот на шести C18 фазах различных производителей: Alltech Absorbosphere C18, Phenomenex Luna C18, Phenomenex Luna

Phenyl-Hexyl, Phenomenex Luna C8, Phenomenex Aqua C18, Rainin Microsorb-MV C18. Предпочтение отдано колонке марки Phenomenex Luna, что подтверждается и в других исследованиях с использованием колонок данной марки [123, 153]. Подобные исследования проводились авторами работы [154] с использованием колонок: 4.6 мм × 150 мм Agela XBP-C18, 4.6 мм × 250 мм Agela XBP-C18, 4.6 мм × 150 мм Zorbax Extend-C18, 4.6 мм × 150 мм Waters Puresil C18, 4.0 мм × 250 мм Zorbax Hypersil-ODS, 4.6 мм × 150 мм Zorbax Eclipse XDB-C8, из которых наибольшую эффективность с точки зрения селективности и времени разделения показала колонка 4.6 мм × 150 мм Agela XBP-C18.

Чаще всего используемые органические растворители для ПФ – ацетонитрил и метанол. Исследования [153, 155] указывают на преимущества использования ацетонитрила, при этом его оптимальная концентрация составляет 10-12 об.%. Подкислителями ПФ для подавления диссоциации фенольных кислот могут служить такие кислоты, как: муравьиная, уксусная, трифторуксусная, ортофосфорная или серная, которые создают необходимый рН элюентной системы 2 ÷ 4 (т.к. рK_a фенольных кислот порядка 4 – 5 [156]). Подкисление подвижной фазы проводят для ослабления взаимодействия гидроксильных групп фенольных кислот с остаточными силанольными группами обращенно-фазового сорбента и «фиксации» степени диссоциации разделяемых компонентов [157].

Использование ОФ ВЭЖХ для определения ФК в некоторых растительных объектах представлено в таблице 1.4.

Таблица 1.4 – Определение ФК методом ОФ ВЭЖХ

Источник ФК	Условия хроматографирования	Ссылка
Цветки иван-чая	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 150 × 2.1 мм Kromasil-100 5C18	[84]
Артишок	ПФ: CH ₃ CN – CH ₃ COOH – H ₂ O СФ: 3.0 × 150 мм Hydro-Synergi C18	[123]
Зеленый кофе	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 250 × 4.6 мм Venusil MP C18	[136]
Красное вино, вишневый сок, шиповник, зеленый чай, помидоры	ПФ: CH ₃ OH – HCOOH – H ₂ O СФ: 4.6 × 100 мм Ultrasphere C18	[158]
Мате, вишневый и яблочный соки	ПФ: CH ₃ CN – HCOOH – H ₂ O СФ: 4.6 × 250 мм Kromasil 100-5C18	[159]
Арония черноплодная	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 4.6 × 150 мм Symmetry C18	[46]

Таблица 1.4 – Определение ФК методом ОФ ВЭЖХ

Фасоль (желтая и зеленая)	ПФ: CH ₃ CN – CH ₃ COOH – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Luna C18	[160]
Персики	ПФ: CH ₃ OH – CH ₃ COOH – H ₂ O СФ: 150 × 4.6 мм Kinetex® XB-C18	[161]
ЛРС: травы зверобоя, травы тысячелистника обыкновенного, цветки календулы аптечной, листья подорожника большого, коры дуба черешчатого	ПФ: CH ₃ CN – фосфатный буфер- H ₂ O СФ: 150×2.1мм Zorbax SB-C18	[162]
Листья бамбука	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм HC-C18	[163]
Эхинацея	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 50×3 мм Poroshell 120 EC-18	[164]
Ананас	ПФ: CH ₃ CN – H ₃ PO ₄ – H ₂ O СФ: 250×4.6 мм Gemini C18	[165]

1.3 Пробоподготовка

Анализ ФС может осуществляться разными методами, успех которых будет зависеть от наиболее эффективных методов пробоподготовки и экстракции. Эффективность экстракции в значительной степени зависит от выбора и состава растворителя (органического или неорганического) и играет решающую роль в извлечении ФС из растительных объектов. Как правило, для экстракции ФС используются вода, ацетон, этилацетат, спирты (метанол, этанол и пропанол) в различных процентных соотношениях в смесях [166, 167].

Жидкие образцы сначала фильтруют или центрифугируют, после чего они либо непосредственно вводятся в систему разделения, либо анализируемые вещества выделяют с помощью дополнительных этапов для соответствующих методов. Образцы вин, спиртных напитков и прозрачных соков требуют минимальных манипуляций. Спирт чаще всего удаляется из образца с помощью ротационного испарения, а остаток поглощается небольшим объемом растворителя или элюента, который впоследствии используется при хроматографическом разделении.

Наиболее широко используемый вариант экстракции – жидкостно-жидкостная экстракция, которая является недорогим методом, поскольку предполагает использование органических растворителей, но требует длительного времени экстракции, приводящее к возможной деградации экстрагируемых веществ. Для очистки и концентрирования жидких экстрактов часто используется твердофазная экстракция (ТФЭ). Современные методы, которые пришли на смену традиционным, включают: экстракцию

сверхкритической жидкостью (СФЭ), экстракцию жидкостью под давлением, экстракцию с помощью микроволн и экстракцию с помощью ультразвука (УЗЭ). Эти альтернативные методы значительно сокращают и ускоряют процесс экстракции.

1.3.1 Антоцианы

Подготовка образцов для анализа антоцианов варьируется в зависимости от материала образца. Например, ВЭЖХ-анализ объектов в жидком виде, таких соки, сиропы и вина, требуют очень небольшой и простой подготовки перед анализом, которая в основном заключается в разбавлении исходных образцов элюентом с последующим при необходимости фильтрованием непосредственно перед хроматографированием.

Твердые материалы должны быть фракционированы и/или гомогенизированы перед отбором репрезентативного образца из растительной ткани. Например, образцы ягод обычно требуют гомогенизации [89, 167] или растирания [78].

Антоцианы часто содержатся во внутриклеточных органеллах, поэтому их доступность зависит от способности растворителей проникать в эти структуры. Следовательно, предварительная обработка тканей с целью облегчения экстракции может быть интересным подходом к повышению эффективности экстракции, поскольку любая процедура должна выполняться с учетом ограничений, налагаемых химической природой самих антоцианов.

Распространенным подходом в прободготовке растительных объектов, содержащих фенольные соединения, в том числе и антоцианы, является растирание под слоем растворителя. Измельчение анализируемого объекта приводит к увеличению площади контакта и способствует лучшему проникновению растворителя, а значит и повышению выхода экстракции. Однако при разрушении органелл растительных объектов подобным образом антоцианы значительно больше подвержены воздействию окислителей и, следовательно, более склонны к деградации [168]. В связи с чем возможно замораживание в жидком азоте с последующим измельчением [169, 170], а также экстракция в анаэробных условиях [171]. Стоит отметить, что анализ замороженных материалов со сроком хранения больше нескольких месяцев нежелателен.

Классическим подходом в извлечении антоцианов из растительных тканей является настаивание в подходящем растворителе. В качестве экстрагентов для антоцианов в большинстве случаев выступают подкисленные водные смеси этанола, метанола или ацетона. Несмотря на то, что метанол в качестве экстрагента эффективнее этанола и, тем более, воды [172], его использование в случае анализа пищевых объектов нежелательно с

экологической точки зрения. Возможен также вариант экстракции антоцианов без использования органических растворителей, например, соляной [76-80] или уксусной кислотами [171], последняя из которых скорее понижает выход экстракции в сравнении с соляной кислотой [174]. При экстракциях с подкисленными растворителями следует соблюдать особую осторожность, так как ацилированные антоцианы в сильно кислой среде могут подвергаться гидролизу и разрушаться [175]. Помимо кислот для экстракции антоцианов также может быть использована водная двухфазная система, состоящая из гидрофильного экстрагента и неорганической соли – этанол и сульфат аммония. Такая смесь, по сообщению авторов работы [176], увеличивает степень извлечения при меньшем времени по сравнению с традиционным подкисленным растворителем.

Как уже упоминалось ранее, к выбору растворителей стоит подходить с учетом экологических аспектов. Все чаще встает вопрос об ответственности человека за природу и окружающую среду, поэтому поиск новых экологически безопасных растворителей – это насущная необходимость. Например, глубокие эвтектические растворители стали превосходной альтернативой традиционным органическим растворителям благодаря их способности быть акцепторами или донорами водородных связей. С использованием подобных растворителей была проведена экстракция антоцианов винограда [177], черных ягод годжи [178], черной смородины [179], каркаде [180].

Еще одним экологически благоприятным методом извлечения является сверхкритическая CO_2 экстракция (СФЭ). Сверхкритический CO_2 – неполярный растворитель. Это ограничивает его использование при экстракции антоцианов, который является полярными соединениями, однако добавление соразтворителей может улучшить экстракционную способность [181]. СФЭ с добавлением этанола в качестве соразтворителя эффективно использовалась для извлечения антоцианов из черники [182, 183], бузины [181], а также клюквы и малины [183], а с добавлением метанола – из ежевики [184] и облепихи [185] в широких диапазонах давлений.

Метод ультразвуковой экстракции (УЗЭ) был широко изучен и предложен для лучшего извлечения биологически активных соединений из растительных тканей [186]. В работе [187] сообщалось, что ультразвук подходит для извлечения пигментов из различных растительных источников путем механического воздействия, приводящего к разрушению клеточных стенок. УЗЭ стала эффективным и действенным методом с высоким извлечением соединений, особенно из твердых образцов. Благодаря низкой стоимости и низкотехнологичному принципу работы УЗЭ в настоящее время набирает популярность [188]. С помощью УЗЭ антоцианы были экстрагированы из различных фруктов и овощей, таких как малина [189], ежевика [190] и лук [191]. В работе [192] было

показано, что использование ультразвука при экстракции антоцианов из сырого сублимированного, высушенного в микроволновой печи фиолетового картофеля снижает расход растворителя и время экстракции. А обработка виноградного сока ультразвуком с различной амплитудой и временем воздействия значительно влияет на концентрацию цианидин-3-О-гликозидов, мальвидин-3-О-глюкозида и дельфинидин-3-оглюкозидов в экстракте [193].

Экстракция различными растворителями приводит к извлечению не только фенольных соединений, но и других сопутствующих экстрактивных веществ (сахара, белки, алкалоиды и т.д.), что влечет за собой необходимость в последующей очистке полученных экстрактов, осуществляемой чаще всего твердофазной экстракцией (ТФЭ).

ТФЭ – наиболее распространенный метод прободготовки многих фенольных соединений, в том числе и антоцианов. ТФЭ обладает рядом преимуществ по сравнению с другими традиционными методами, например, жидкость-жидкостной экстракцией: использование небольшого количества растворителя, сокращение временных затрат, низкая стоимость [194, 195]. Кроме того, при необходимости метод ТФЭ может быть применен в сочетании с другими аналитическими методами и методами прободготовки [76-78].

Процесс очистки экстрактов методом ТФЭ включает в себя четыре последовательных этапа: кондиционирование, сорбция аналита, промывка и десорбция подходящим элюентом. Ключевым фактором, играющим решающую роль в достижении оптимальных условий твердофазной экстракции, является выбор сорбента, поскольку от этого зависит селективность, аффинность и емкость [196]. ТФЭ антоцианов чаще всего проводят с использованием C18 картриджей (патронов), с помощью которых из экстрактов удаляются сахара, водорастворимые органические кислоты, полимерные и олигомерные водорастворимые соединения. Активацию картриджей предварительно проводят метанолом, а затем водой [197], или 0.1М водным раствором HCl [80-83], или 3% муравьиной кислотой [198].

Десорбцию антоцианов с патрона осуществляют подкисленными водно-органическими смесями: ацетонитрил–муравьиная кислота–вода [76-78, 82-85], метанол–муравьиная кислота–вода [197, 198], метанол–соляная кислота–вода [199] и т.п.

1.3.2 Фенольные кислоты

Как отмечалось ранее, первыми этапами процедуры подготовки являются измельчение, размалывание и гомогенизация с последующей экстракцией.

Дополнительные шаги могут потребоваться при необходимости удаления нежелательных фенольных и не фенольных веществ, таких как воски, жиры, терпены и хлорофиллы [101].

ФК могут быть извлечены из свежей, замороженной или высушенной растительной биомассы. Однако обычно растительную биомассу сушат на воздухе или сублимируют (лиофилизируют), а затем измельчают в однородный порошок перед экстракцией ФК. Экстракция из сухой биомассы предпочтительнее экстракции из свежей, поскольку ферменты в клетках свежих образцов потенциально могут разлагать фенольные кислоты [200]. При этом лиофильная сушка сохраняет более высокий уровень содержания ФС в растительной биомассе по сравнению с сушкой на воздухе [201].

Методы экстракции должны учитывать расположение фенольных кислот в растении. Большинство производных фенольной кислоты, присутствующих в растительной матрице, хранятся в вакуолях и обычно экстрагируются спиртовыми или органическими растворителями. Исключением являются те, которые связаны с нерастворимыми углеводами и белками в растительной матрице.

ФК, являясь промежуточными соединениями в цепи биосинтеза фенольных соединений, накапливаются во многих растительных объектах [98, 99] как в индивидуальном состоянии, так и в виде эфиров с некоторыми карбоновыми водорастворимыми кислотами, сахарами, и липидами [100-102]. Поэтому для высвобождения ФК, когда они находятся в образце в связанном виде, используют ферментативные реакции. Ферменты, такие как пектиназы, целлюлазы и амилазы, используются для разрушения углеводных связей. Механизм действия, при котором высвобождаются эти кислоты, описан в работе [202], авторы которой сравнили несколько различных ферментных препаратов для высвобождения фенольных кислот из клеточной стенки зерен ржи. А использование α -амилазы и целлюлозы может быть применимо для выделения фенольных кислот из ячменя [203].

Для определения связанных кислот перед экстракцией проводят кислотный или щелочной гидролиз. При кислотном гидролизе производят обработку растительного экстракта или самого пищевого образца неорганической кислотой (например, HCl) при температуре кипения или выше температуры кипения в водных или спиртовых растворителях (наиболее распространенным является метанол). Допустимая концентрация кислоты колеблется от 1 до 2 М HCl, а время реакции – от 30 мин до 1 ч. При этом в работе [204] сообщается, что водный раствор HCl разрушает гидроксикоричные кислоты, потери в кислой среде варьируются от 15 до 95% для кумаровой и синаповой кислот, соответственно.

Щелочной гидролиз используется для расщепления сложноэфирной связи со

стенками клеток растительных объектов [205] и подразумевает обработку образца раствором NaOH в концентрациях от 1 до 4 М. Большинство реакций оставляют протекать при комнатной температуре от 15 минут до 24 ч. В некоторых исследованиях сообщается, что реакции проводятся в темноте, а также в инертной атмосфере, такой как аргон или газообразный азот [206].

Жидкостно-жидкостная и твердожидкостная экстракция являются наиболее часто используемыми процедурами при анализе ФК. Данные методы по-прежнему являются наиболее широко используемыми главным образом из-за их простоты, эффективности и широкого применения. Обычно используемыми экстракционными растворителями являются спирты (метанол, этанол), ацетон, диэтиловый эфир и этилацетат. Однако очень полярные фенольные кислоты (бензойная, коричная кислоты) не могут быть полностью экстрагированы чистыми органическими растворителями, а также смесями типа «спирт-вода» или «ацетон–вода». Менее полярные растворители (дихлорметан, хлороформ, гексан, бензол) подходят для извлечения неполярных посторонних соединений (восков, масел, стеролов, хлорофилла) из растительной матрицы.

Другие факторы, такие как pH, температура, объемное отношение образца к растворителю, а также количество и временные интервалы отдельных стадий экстракции, также играют важную роль в процедуре экстракции. Рекомендуется выполнять экстракцию 2-3 раза с последующим усреднением полученных экстрактов [101].

Твердожидкостная экстракция с использованием различных растворителей или смесей растворителей с последующим использованием ВЭЖХ с УФ, DAD или MS детекторами являются наиболее часто используемыми методами для определения фенольных соединений [113, 137]. Однако твердожидкостная экстракция требует больших объемов образца и большого объема растворителя. В свою очередь ТФЭ может быть альтернативным методом для извлечения фенольных соединений благодаря не только меньшему расходу как самого образца, так и растворителя, но и позволяет избавляться от большинства сопутствующих экстрактивных веществ.

Чаще всего в качестве сорбента используется С18 связанный диоксид кремния, а раствор пробы и растворители обычно слегка подкисляют, чтобы предотвратить ионизацию фенольных кислот, которая может значительно снизить их удерживание.

В работе [207] извлечение ФК и флавоноидов из таких растений, как: люцерна, золотарник, фацелия, гречиха, солодка и лаванда проводили следующим образом. Растительный материал предварительно измельчали и гомогенизировали, затем навески образцов экстрагировали метанолом в течение 5 ч при 900 об/мин с использованием автоматического шейкера. Полученные экстракт фильтровали и выпаривали досуха, затем

остатки растворяли в метаноле и доводили до pH 3,5 HCl. Далее проводили очистку методом ТФЭ с использованием твердофазной экстракционной вакуумной станции и обратно-фазовой октадециловой C18 колонкой. Колонку C18 кондиционировали подкисленным метанолом (pH 3.5). Затем пробу экстракта пропускали через сорбент со скоростью потока приблизительно 1 мл/мин и твердую фазу высушивали на воздухе в течение 2 мин. Анализируемые вещества элюировали также метанолом, а элюаты выпаривали досуха, с последующим растворением в метаноле. Перед хроматографированием полученные анализы фильтровали через мембранный фильтр.

Экстракция хлорогеновых кислот проблем не вызывает, поскольку они легко растворимы в воде, поэтому основная проблема – очистка ХК от сопутствующих экстрактивных веществ. В работе [208] были сопоставлены пять способов очистки и концентрирования ХК из кофе, включавшие, в том числе, и твердофазную экстракцию (ТФЭ) на C18 Sep-Pak картриджах 51910 (Millipore Waters). При этом было установлено, что лучший результат достигается при экстракции ХК метанолом (метод М+) с последующим отделением от коллоидных частиц добавлением специального реагента (Carrez reagent), содержащего ацетат цинка, ледяную уксусную кислоту и раствор гексацианоферрата (II) калия. Согласно представленным данным по методу М+ массовая доля хлорогеновых кислот в исходном материале оказалась более чем в три раза выше, чем по методу ТФЭ. К сожалению, в работе не исследовали все необходимые параметры для определения причин неэффективности метода ТФЭ. В работе [209] сообщали о хорошей сорбируемости ХК на полиамидном сорбенте с последующей реэкстракцией методом флэш-хроматографии. Известно использование C18 картриджей [209] для удаления сопутствующих липофильных веществ из экстракта ХК в 80%-ном метаноле. В работе [211] для выделения фенольных соединений из яблочного сока использовали два C18 картриджа: первый из них, кондиционированный при pH = 7.0, затем сорбировали фенольные вещества не кислотного типа, а из элюата после подкисления сорбировали ХК на втором картридже, кондиционированном при pH = 1. В работе [212] сопоставлена эффективность нескольких различных сорбентов в ТФЭ:

- а) OASIS HLB - гидрофильно-гидрофобно сбалансированного сополимера N-винилпирролидона и дивинилбензола;
- б) «обычного» обращенно-фазового химически модифицированного силикагеля, Sep-Pak C18;
- в) сильного катионообменника, AccBond SAX;
- г) аминофазы, AccBond Amino.

В результате авторы пришли к выводу о том, что картриджи C18 и OASIS не только ускоряют, но и упрощают очистку экстрактов с полифенольными соединениями. Активированный уголь был успешно использован для сорбции ХК при pH = 3 при 60°C с последующей экстракцией ХК 98%-ным этанолом [213]. В работе [162] для твердофазной экстракции использовали насадочные картриджи (концентрирующие патроны) ДИАПАК С 18 и ДИАПАК С (заполненный сверхсшитым полистиролом) и при этом было показано, что проскок галловой и кофейной кислот наблюдается довольно быстро.

Помимо традиционных C18 использовались картриджи, наполненные сорбентом с гидрофильно-липофильным балансом (HLB). Твердая фаза HLB состоит из гидрофильных модифицированных полимеров. Гидрофильная модификация обеспечивает преимущественное удерживание более полярных соединений [137]. В работе [214] фенольные кислоты и флавоноиды в рисе были извлечены методом ТФЭ с использованием картриджей C18 и HLB. Картриджи C18 оказались более эффективны для экстракции флавоноидов и менее полярных фенольных кислот, в то время как фенольные кислоты с высокой полярностью (галловая кислота, протокатеховая и 4-гидроксibenзойная кислоты) были извлечены с помощью картриджей HLB. Эффективность сорбции фенольных соединений твердой фазой HLB может быть результатом селективности полимерных адсорбентов к анализируемым веществам с ароматическим кольцом за счет π - π взаимодействий, в то время как сорбция адсорбентами C18 зависит только от неселективных взаимодействий, таких как силы Ван-дер-Ваальса, водородные связи и диполь-дипольных взаимодействия [214].

Авторами работы [137] впервые разработан и апробирован метод ТФЭ с последующим разделением в условиях ОФ ВЭЖХ с УФ детектированием трех хлорогеновых кислот (3CQA, 4CQA, 5CQA) и шести фенольных кислот (кофейной, феруловой, синаповой, протокатехиновой, *para*-гидроксibenзойной и ванилиновой) в образцах кофейных зерен. Зеленые и обжаренные кофейные зерна измельчали и заваривали дистиллированной водой, в дальнейшем отфильтровывали и подкисляли фильтраты ортофосфорной кислотой. Экстракцию проводили с использованием гидрофильно-липофильных балансовых картриджей.

С использованием полимерных картриджей степень извлечения некоторых изомеров хлорогеновых кислот (3CQA, 5CQA и 3,5diCQA) кофе по полученным результатам работы [215] составила порядка 88-97%.

В таблице 1.5 представлены некоторые методы, используемые при экстракции ФК.

Таблица 1.5 – Методы экстракции ФК

Метод	Растительный материал	Экстрагент	Ссылка
УЗЭ	Артишок	Этанол	[216]
	Фасоль обыкновенная	Метанол	[217]
	Паслен	Метанол	[218]
	Зверобой	Этанол	[219]
Микроволновая экстракция	Листья черники	Этанол/лимонная кислота	[220]
	Физалис	Этанол	[221]
	Тысячелистник обыкновенный	Этанол	[222]
	Розмарин лекарственный	Ацетон	[223]
Ускоренная экстракция растворителем	Майоран	Метанол	[224]
	Барбарис	Этанол	[225]
	Апельсин (кожура)	Ацетон	[226]
СФЭ	Брокколи	СО ₂ /Этанол	[227]
	Апельсин (кожура)		[228]
	Эвкалипт		[229]

1.4 Комплексы «включения» фенольных соединений с циклодекстринами

Циклодекстрины (ЦД) – природные циклические олигосахариды, построены из определённого числа D-глюкопиранозных звеньев, связанных в макроциклы между собой α -D-1,4-глюкозидными связями. Циклодекстрины получают путем расщепления крахмала ферментом амилазой либо криолизом водных растворов крахмала [230].

Циклодекстрины являются чрезвычайно важными представителями класса соединений-хозяев. Они широко используются в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности благодаря их способности в качестве агентов медленно высвобождать и доставлять вещества, а также из-за их абсолютной нетоксичности в широком диапазоне концентраций [231]. Помимо выше перечисленных свойств циклодекстрины могут выступать в роли имитаторов ферментов [232].

Данные вещества представляют собой кристаллические порошки, которые легко перекристаллизовываются из горячих насыщенных растворов при охлаждении, нетоксичны, практически без вкуса.

По количеству остатков глюкозы, находящихся в одной молекуле, циклодекстрины делятся на: α -циклодекстрин (α -ЦД), состоящий из шести глюкопиранозных звеньев; β -

циклодекстрин (β -ЦД) содержит семь, а γ -циклодекстрин (γ -ЦД) – восемь звеньев, рис. 1.12.

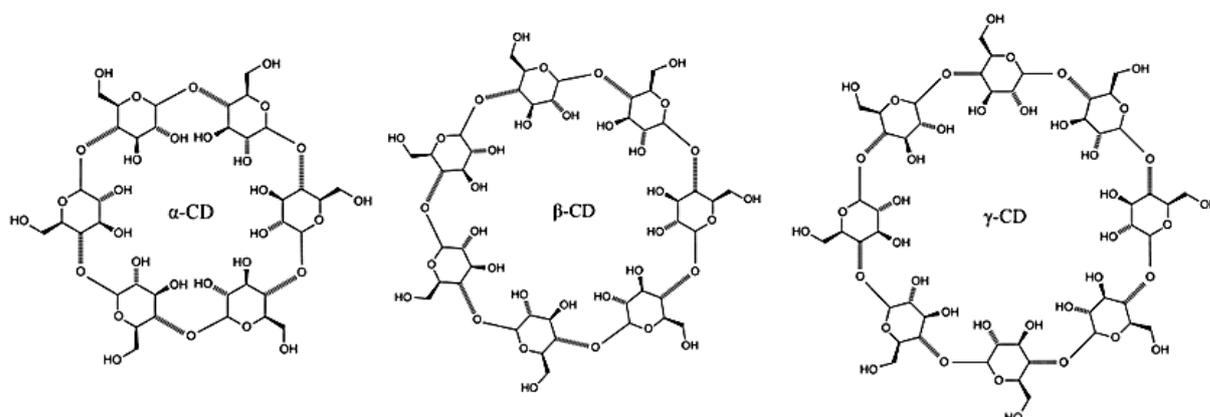


Рисунок 1.12 – Строение циклодекстринов

В настоящее время исследованы только эти три представителя циклодекстринов, так как циклодекстрин с пятью гликопиранозными звеньями до сих пор не получен ферментативными путем, однако он был синтезирован химическими методами.

Форма молекулы циклодекстринов в грубом приближении представляет собой тор или усеченный конус, рис. 1.13.

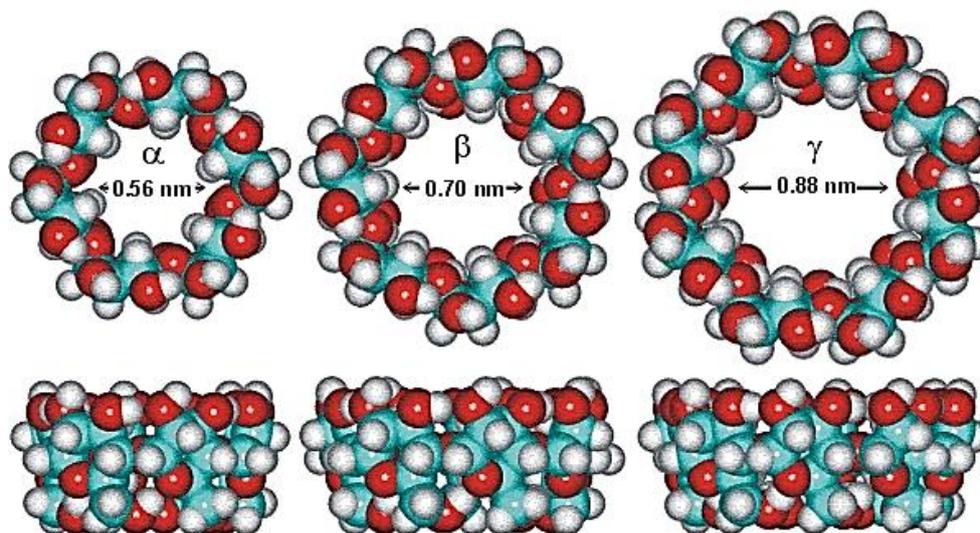


Рисунок 1.13 – Формы молекул циклодекстринов

Все OH-группы находятся на внешней поверхности молекул циклодекстринов, в то время как внутренняя поверхность становится гидрофобной. Это объясняет растворимость циклодекстринов в воде, а также их способность капсулировать (размещать) внутри полости гидрофобные молекулы для дальнейшего их переноса в водные растворы.

Циклодекстрины плохо растворимы в органических растворителях, устойчивы в щелочных растворах, но гидролизуются в кислых средах [52]. Циклодекстрины могут подвергаться модификации как полной, так и частичной (региоселективно), приобретая новые немаловажные свойства. Это позволяет существенно увеличить растворимость

даже при введении гидрофобных заместителей. Однако введение заместителей в строго определенное положение весьма трудная задача, требующая тщательных (хроматографических) методов очистки [230]. Однако стоит отметить, что полностью метилированные и ацилированные продукты вполне доступны на рынке. β -ЦД плохо растворим в воде, однако его производные растворяются гораздо лучше, а незамещенные циклодекстрины, как уже говорилось ранее, нерастворимы в органических растворителях. И напротив, полностью метилированные производные легко растворяются как в органических растворителях, так и в воде. Некоторые основные свойства главных представителей циклодекстринов представлены в таблице 1.6.

Таблица 1.6 – Основные физико-химические свойства циклодекстринов [52].

Свойство	α -ЦД	β -ЦД	γ -ЦД
Число остатков глюкозы в макроцикле, A°	6	7	8
Молекулярный вес, Да	972.85	1134.99	1297.14
Внешний диаметр тора, A°	13,7	15.3	16.9
Внутренний диаметр полости тора, A°	5.2	6.6	8.4
Высота тора, A°	7,8	7,8	7,8
Объем внутренней полости, A^{o3}	174	262	472
Физический объем полости в навеске 1г ЦД, мл	0.1	0.14	0.2
Частичный молярный объем в растворах, мл/моль	611.4	703.8	801.2
Растворимость в воде при 25 $^\circ$ C, г/100 мл	14.5	1.85	23.2
ΔH^0 раствора, кДж/моль	32.1	34.7	32.3
ΔS^0 раствора, кДж/(моль*К)	57.7	48.9	61.4
Температура разложения, $^\circ$ C	278	299	267
Кристаллизационная вода, масс.%	10.2	13.2-14.5	8.13-17.7

Интерес к циклодекстринам связан с тем, что данные вещества способны образовывать прочные комплексные соединения с неорганическими и органическими веществами за счет гидрофобной внутренней полости. Данное свойство играет важную роль при экстракции, катализе и применении.

Обычно комплексы включения циклодекстрина с молекулой-гостем образуются в соотношении 1:1. В результате образуется молекулярное соединение включения, в котором «гость» встроен в полость ЦД (пример комплекса включения – рис. 1.14).

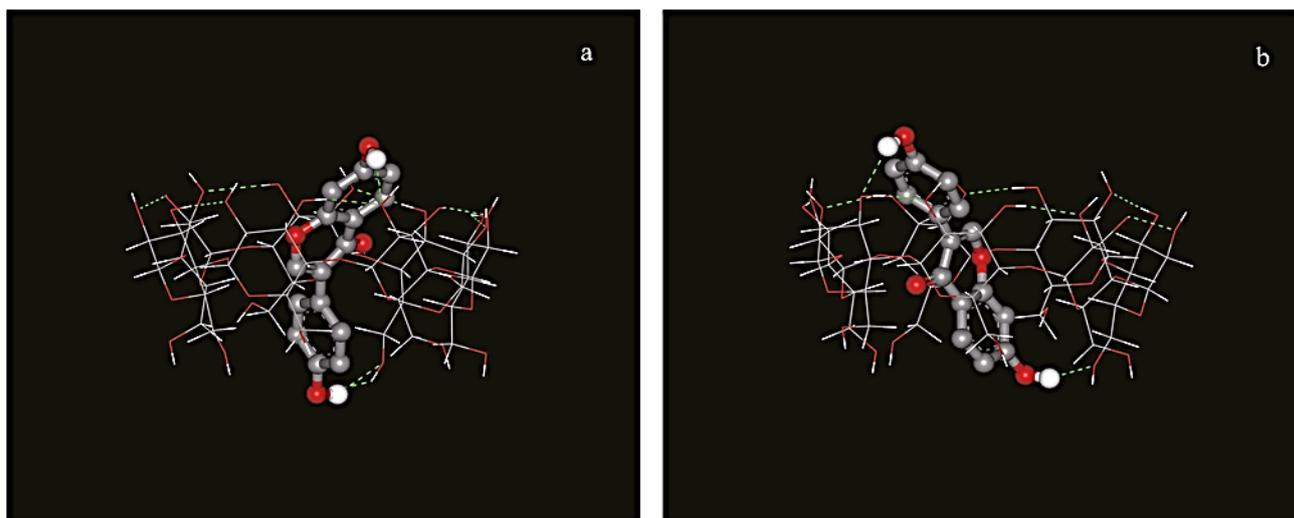
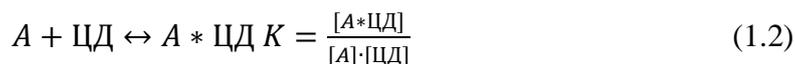


Рисунок 1.14 – Возможные структуры комплексов включения изофлавона (дайдзеина) и β -ЦД [233].

Включение – это термодинамический равновесный процесс, константу равновесия которого можно рассчитать по всем известному уравнению (1.2) для комплексообразования.



Существуют также равновесные процессы более высокого порядка, включающие в себя образование комплексов состава 1:2 или с участием более одного циклодекстрина, которые часто существуют одновременно с комплексами более простых составов.

Следует учитывать и тот факт, что введение молекулы-гостя в полость «хозяина» может приводить к изменению реакционных способностей молекул, так как некоторые их функциональные группы могут быть закрыты «хозяином». Кроме того, молекулы циклодекстрина содержат оптически активные глюкопирозные циклы, которые обуславливают оптическую активность самих циклодекстринов. Благодаря этому последние могут быть использованы в качестве химических модификаторов стационарных фаз, а также как хиральные добавки к подвижным фазам [231].

В случае разделения фенольных кислот добавка β -ЦД в подвижную фазу может приводить к изменению в удерживании за счет образования комплексов включения [234, 235].

Для определения константы комплексообразования хроматографическим методом исследуют хроматографическое поведение аналита при различных концентрациях циклодекстрина в подвижной фазе. При введении циклодекстрина удерживание уменьшается вследствие увеличения содержания анализируемого вещества в подвижной фазе за счет комплексообразования с циклодекстрином. Предполагается, что:

- 1) циклодекстрин не сорбируется на поверхности обращенной фазы, либо сорбция оказывает незначительное влияние на удерживание аналита и ею можно пренебречь;
- 2) образовавшийся комплекс аналита с циклодекстрином не сорбируется на поверхности.

Тогда для комплексов состава 1:1 можно получить уравнение (1.3) для расчета константы комплексообразования, используя фактор удерживания, который вычисляется, как соотношение концентраций аналита в стационарной и подвижной фазах (1.2):

$$k_i = \frac{[A]_{sp}}{[A]_{mp}} = \frac{k_0 \cdot [A]_{i\ mp}}{[A]_{i\ mp} + [A * \text{ЦД}]} = \frac{k_0}{1 + K \cdot [\text{ЦД}]} \quad (1.3),$$

где: k_i – фактор удерживания аналита при данной концентрации ЦД;

k_0 – фактор удерживания аналита при отсутствии ЦД в подвижной фазе.

$$K = \frac{k_0 - k_i}{k_i \cdot [\text{ЦД}]} \quad (1.4)$$

Спектрофотометрический метод основан на изменении оптической плотности раствора аналита при введении в него циклодекстринов. Тогда константу комплексообразования можно рассчитать, исходя из соотношения оптических плотностей после и до добавки циклодекстрина (1.4). Однако стоит заметить, что в данном случае учитывается остаточная концентрация циклодекстрина, которая определяется как разность исходной концентрации циклодекстрина и концентрации образующегося комплекса (1.5).

$$\frac{D_i}{D_0} = \frac{[A]_0 + [A * \text{ЦД}]}{[A]_0} = \frac{[A]_0 \cdot [1 + K[\text{ЦД}]_i]}{[A]_0} = 1 + K \frac{[\text{ЦД}]_0}{1 + K \cdot [A]_0} \quad (1.5),$$

где: D_i – оптической плотность раствора с добавкой CD;

D_0 – оптическая плотность раствора без добавки ЦД.

$$[\text{ЦД}]_i = [\text{ЦД}]_0 + [A * \text{ЦД}] \quad (1.6),$$

где: $[\text{ЦД}]_i$ – остаточная концентрация циклодекстрина в растворе, моль/л;

$[\text{ЦД}]_0$ – исходная концентрация циклодекстрина в растворе, моль/л;

$[A * \text{ЦД}]$ – концентрация образовавшегося комплекса, моль/л.

Существует также иной подход к расчету константы комплексообразования спектрофотометрическим методом, который учитывает молярный коэффициент погашения соответствующих веществ.

$$\begin{aligned} A_i &= \varepsilon_A \cdot [A]_i + \varepsilon_{A*\text{ЦД}} \cdot [A * \text{ЦД}] = \\ &= \varepsilon_A \cdot [A]_i + \varepsilon_{A*\text{ЦД}} \cdot K \cdot [A]_i \cdot [\text{ЦД}] = \\ &= [A]_i (\varepsilon_A + \varepsilon_{A*\text{ЦД}} \cdot K \cdot [\text{ЦД}]) \end{aligned} \quad (1.7)$$

С учетом уравнения (1.7) и (1.8), уравнение (1.6), преобразуется в уравнение (9), благодаря которому можно вывести уравнения (1.10) – (1.13):

$$[A]_i + [A * \text{ЦД}] = [A]_i + K[A]_i \cdot [\text{ЦД}] = [A]_i(1 + K \cdot [\text{ЦД}]) = \text{const} \quad (1.8)$$

$$[A]_i = \frac{\text{const}}{(1+K \cdot [\text{ЦД}])} \quad (1.9)$$

$$\begin{aligned} A_i &= \frac{\text{const}(\varepsilon_A + \varepsilon_{A * \text{ЦД}} \cdot K \cdot [\text{ЦД}])}{(1+K \cdot [\text{ЦД}])} = \frac{A_0 + \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}} \cdot K \cdot [\text{ЦД}]}{(1+K \cdot [\text{ЦД}])} = \\ &= \frac{A_0 + A_0 \cdot K \cdot [\text{ЦД}] + \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}} \cdot K \cdot [\text{ЦД}] - A_0 \cdot K \cdot [\text{ЦД}]}{(1 + K \cdot [\text{ЦД}])} = \\ &= A_0 + \frac{(\text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}} - A_0)K[\text{ЦД}]}{(1+K \cdot [\text{ЦД}])} \end{aligned} \quad (1.10)$$

$$A_0 - A_i = \frac{(A_0 - \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}})K[\text{ЦД}]}{(1+K \cdot [\text{ЦД}])} \quad (1.11)$$

$$\frac{1}{A_0 - A_i} = \frac{1}{K[\text{ЦД}]} \cdot \frac{1}{A_0 - \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}}} + \frac{1}{A_0 - \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}}} \quad (1.12)$$

$$\frac{1}{K[\text{ЦД}]} = \frac{A_i - \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}}}{A_0 - A_i} \quad (1.13)$$

$$K = \frac{A_0 - A_i}{(A_i - \text{const} \cdot \varepsilon_{A * \text{ЦД}}) \cdot [\text{ЦД}]} \quad (1.14)$$

При исследовании комплексообразования производных цианидина с β - ЦД на стационарной фазе С4 на хроматограммах при увеличении концентрации β -ЦД в подвижной фазе заметно уменьшается удерживание цианидин-5-глюкозида и цианидина, в то время как удерживание остальных соединений (кроме пеонидин-5-глюкозида) практически не изменяется. Это подтверждает предположение [237] о том, что основная причина слабого комплексообразования 3-гликозидов антоцианов состоит в стерическом затруднении включения кольца В в полость циклодекстрина из-за глюкозидного радикала в положении 3, и его перемещение в направлении от кольца В (в положение 5) приводит к быстрому росту склонности антоцианов к комплексообразованию, а удаление – еще более эффективно сказывается на процессе.

В случае разделения изомеров ХК условиях ОФ ВЭЖХ могут возникать проблемы [159], которые можно решить добавлением в подвижную фазу циклодекстринов, которые способны образовывать комплексы включения «гость-хозяин» с различными константами комплексообразования разделяемых соединений [238, 239]. Между тем зависимость удерживания анализируемых веществ от концентрации циклодекстрина в подвижной фазе позволяет рассчитать значения константы комплексообразования [238-241].

Несмотря на большую ценность изомеров ХК, как вторичных растительных метаболитов и как сильнодействующих антиоксидантов, их способность к образованию комплексов включения «гость-хозяин» с циклодекстринами кроме работы [238] интенсивно изучались только для 5CQA [238, 242-246]. Была также найдена только одна публикация, связанная с 3CQA [247]. Более того, публикаций, посвященных

комплексообразованию дикофеоилхинных кислот с циклодекстринами, не было найдено вовсе.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Анализ опубликованной литературы показывает, что для оценки свойств хроматографических систем используются в основном точечные методы - т.е. методы, характеризующие свойства хроматографических систем только в некоторых едва ли не случайно выбранных условиях, поскольку изменение состава подвижной фазы и температуры может существенно изменить даже порядок элюирования сорбатов. Единственным, на сегодня, эмпирическим методом, позволяющим контролировать порядок элюирования в широком диапазоне подвижных фаз, является метод относительного анализа удерживания, развитие которого может определить физический смысл экспериментально определяемых параметров относительного удерживания. При этом разработка универсальных методов сопоставления свойств стационарных фаз и подвижных фаз имеет по-прежнему большое значение для учета результатов высокобюджетных исследований в работе обычных хроматографических лабораторий.

«Зеленая» хроматография при определении антоцианов и фенольных кислот пока находится только в начальной стадии, и требует разработки новых экологически более благоприятных вариантов определения этих важнейших соединений.

При исследовании монокофеоилхинных кислот авторами многих публикаций допускаются ошибки в нумерации атомов С в хинной кислоте, что приводит путанице и разночтениям. Работ, посвящённых комплексообразованию хлорогеновых кислот, немного, а исследований комплексов включения «гость-хозяин» дикофеоилхинных кислот с циклодекстринами не найдено вовсе. Влияние изменения рН на удерживание ионизируемых соединений хорошо известно, но нет работ по определению возможности предсказания хроматографических свойств сложных соединений (дикофеоилхинных кислот) по удерживанию аналогов с более простым строением (монокофеоилхинных кислот).

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Объекты исследования

Источники антоцианов: ягоды черники и голубики быстрозамороженной «4 сезона» (Россия), ягоды черники быстрозамороженной «Вологодская ягода» (Россия), листья багрянника канадского (*Cercis canadensis* L.), плоды красной смородины, черной смородины, вишни обыкновенной, клюквы, барбариса, бузины черной.

Источники хлорогеновых кислот (ХК): зерна зеленого кофе Арабика Бразилия Bourbon Selection, кофе молотый (марка «Петр Великий»), кофе растворимый (марка «Ambassador»), кофе зеленый (арабика, Бразилия), чай мате (Pajarito, Парагвай), чай мате (Pipore, Аргентина), чай из артишока (Lado Actiso, Вьетнам) и чай мате («Чайная коллекция», ООО «РЧК-Трејдинг»), консервированные соплодия артишока, препарата «Артишока экстракт» (ЗАО «Эвалар»).

Стандартные вещества: 5-кофеилхинная кислота (Chlorogenic acid hemihydrate, Aldrich), стандартный раствор кофеина (Китай), β-циклодекстрин (Китай).

Таблица 2.1 – Используемых органических растворителей и подкислители подвижных фаз, использованных в настоящей работе

Органический модификатор	ПДК, мг/м ³ (максимально разовая/среднесуточная)	Класс опасности	Используемый диапазон концентраций в данной работе, об. %	Цена*, руб/л
Ацетонитрил	10	3	6 – 85	1551.40
Ацетон	800/200	4	4 – 8	360.00
Метанол	15/5	3	10 – 30	925.00
Пропано-2	50/10	3	3 – 6	540.00
Этанол	2000/1000	4	20 - 26	250.00
Этилацетат	200/50	4	1 - 8	745.40
Муравьиная кислота	1/0.05	2	1 – 10	652.80
орто-Фосфорная кислота	1(туман)	2	0.3 – 1.0	839.00

* цена по прейскуранту ООО «Реактив», Белгород (записано 28.10.2022 г.).

2.2 Инструментальные методы

В работе использовали хроматографические, спектрофотометрические и масс-спектрометрические исследования.

2.2.1 Хроматографический метод

Разделение компонентов смесей осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами в условиях обращенно-фазовой хроматографии с термостатированием хроматографических колонок.

Мертвое время, t_0 , определяли по удерживанию урацила или щавелевой кислоты. Факторы удерживания рассчитывали по формуле:

$$k(i) = \frac{t_R(i) - t_0}{t_0} \quad (2.1)$$

Эффективность (число теоретических тарелок – N) хроматографических систем рассчитывали по уравнению:

$$N = 5.54 \cdot \frac{k}{k+1} \cdot \left(\frac{t_R}{\Delta l/2} \right)^2 \quad (2.2)$$

где t_R – время удерживания компонента; $\Delta l/2$ – ширина пика на половине высоты (полуширина) пика, рассчитываемая программой ChemStation.

Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали в программном продукте ChemStation 32. Дополнительно программы и весь набор данных обрабатывали в MSExcel.

В работе для построения карт селективности использовали изократические режимы, а для анализа некоторых объектов использовали и градиентные режимы.

2.2.2 Спектрофотометрический метод

Электронные спектры поглощения записывали двумя способами.

Первый способ применялся для обобщенного определения уровня концентрации антоцианов в экстрактах в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид.

Спектры записывали после подходящего разбавления в кварцевых кюветах при условии, что оптическая плотность не выше 1.1 при использовании кварцевых кювет с длиной оптического пути 1 см. Для контроля копигментации использовали кварцевые кюветы с длинами оптического пути 0.1 и 0.5 см при условии, что оптическая плотность не выше 1.1.

Второй способ применялся для записи электронных спектров поглощения индивидуальных соединений в кювете детектора с использованием диодно-матричного детектора. При этом соблюдали условие - оптическая плотность веществ в измеряемой точке пика не превышала 1. Экспериментально установлено, что при большом превышении оптической плотности ($A > 1.3$) и при малой интенсивности сигнала ($A < 0.1$) спектры могут сильно исказиться. Для обзора записывали 3D-хроматограммы.

Для обработки спектры сохраняли в цифровом виде и переносили в MS Excel для обработки – для записи рисунков, для наложения, для масштабирования, нормировки и т.д.

2.2.3 Масс-спектрометрические методы

Для детектирования антоцианов использовали квадрупольный масс-спектрометр Agilent 1200 со сканированием положительно-заряженных ионов. Для уточнения состава ионов использовали технику частичной фрагментации, позволяющую определять M/Z агликонов при заданном напряжении на фрагменторе, зависящем от массы гликозидных радикалов в антоциане по [248]: 150 В – использовали для записи исходных флавилиевых ионов, и 250 В – для определения агликонов при фрагментации исходных ионов.

Для регистрации масс-спектров хлорогеновых кислот использовали жидкостной тандемный хроматомасс-спектрометр Shimadzu LCMS-8060 при сканировании отрицательно заряженных ионов в диапазоне масс 150–750.

2.3 Пробоподготовка фенольных соединений из растительного сырья

2.3.1 Пробоподготовка антоцианов

Экстракцию антоцианов из ягод (например, черники или голубики) проводили двумя способами: настаиванием и растиранием.

В первом случае навески ягод экстрагировали 0.1 М раствором соляной кислоты и оставляли на сутки для перевода всех форм антоцианов во флавилиевую.

Во втором случае навески ягод растирали под слоем экстрагента.

Затем полученные экстракты отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр.

Частичную очистку (о гидрофильных полимерных и олигомерных экстрактивных веществ) проводили твердофазной экстракцией на концентрирующих патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Москва).

Пробоподготовка к определению видового состава антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ.

Вариант 1. Для этого патроны активировали, пропуская 5 мл ацетона, и кондиционировали пропуская 10-15 мл 0.1 М водного раствора HCl. Затем экстракт антоцианов пропускали через кондиционированный патрон до проскока окрашенных фракций. Для реэкстракции антоцианов использовали смесь, содержащую 30 об.% ацетонитрила, 30 об. % муравьиной кислоты и 40 об. % воды до обесцвечивания слоя

сорбента в патронах. Полученный реэкстракт разбавляли водой 1:2 по объему и хранили в холодильнике (4°C) в течение не более 2-3 суток до анализа. Такая очистка экстракта обеспечивает длительное использование хроматографической колонки (в течение нескольких лет).

Вариант 2.

Полученные экстракты сорбировали на активированном пропусканием 5 мл ацетона и кондиционированном пропусканием 10–15 мл 0.1 М водного раствора HCl концентрирующем патроне ДИАПАК С 18. Антоцианы реэкстрагировали с патрона 3 мл метанола, содержащего 10 об. % муравьиной кислоты. Реэкстракт разбавляли раствором муравьиной кислоты (10 об. %) в воде в соотношении 1 : 5 для последующего хроматографирования.

Приготовление образцов для хроматографирования в условиях гидрофильной хроматографии. Антоцианы из первичного экстракта сорбируют на патроне ДИАПАК С18 (см. выше). Экстракцию антоцианов с патрона осуществляют раствором, содержащим 75 об.% ацетонитрила, 0.5 об.% ортофосфорной кислоты и 24.5 об.% воды. Перед хранением и хроматографированием экстракт разбавляют 1 : 1 раствором 0.5 об.% ортофосфорной кислоты в ацетонитриле.

2.3.2 Пробоподготовка хлорогеновых кислот

Смесь трех изомерных кислот (3CQA, 4CQA и 5CQA) получали путем экстракции зерен зеленого кофе. Для этого экстракт, полученный настаиванием размолотых зерен в 0.1 М водном растворе HCl, очищали на насадочных картриджах Диапак С18 (БиоХимМак СТ, Москва), пропуская 20 мл экстракта через два последовательно соединенных картриджа (для контроля проскока 3CQA). Сумму кислот реэкстрагировали, пропуская через картриджи 4 мл экстрагента (10 об.% ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в воде).

Все три изомерные кислоты имели малоразличимые УФ-спектры (λ_{\max} 325 – 326 нм) и идентичные масс-спектры ($m/z = 353.0$ для отрицательно заряженных ионов). Подтверждение правильности отнесения пика 3CQA было получено сопоставлением времен удерживания кислоты из смеси и основной фенольной кислоты сока вишни [249]. Отнесение пика 4CQA было выполнено сопоставлением времен удерживания с литературными данными [250].

Для приготовления водных настоев из образцов кофе и чаев сухие навески материала массой 0.50 ± 0.10 г заливали кипятком (50 мл) и выдерживали в течение 10

мин. Настой отделяли от твердого остатка фильтрованием через бумажный фильтр. Аликвотную порцию 10 мл (20 мл для напитка из артишока) очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С18 (БиоХимМак СТ, Россия) после подкисления 1 М водным раствором HCl (10 об. %). Кислоты реэкстрагировали с патрона 2 мл смеси 30 об. % ацетонитрила и 30 об. % муравьиной кислоты в воде. Полученный раствор разбавляли водой в соотношении 1 : 2.

Для экстракции кислот из артишока консервированный растительный материал обезжиривали н-гексаном, измельчали и навеску 1.00 ± 0.10 г переносили в 50 мл 0.1 М HCl и настаивали сутки. После фильтрования экстракт очищали твердофазной экстракцией, как указано выше.

2.4 Определение содержания фенольных соединений в растительных объектах

Настоящая работа посвящена разработкам хроматографических аспектов определения фенольных соединений в экстрактах растительных материалов. Поэтому определению подлежали только те показатели, которые получают при использовании хроматографии.

2.4.1 Определение концентрации антоцианов в экстрактах упрощенным спектрофотометрическим методом

Аликвотный объем экстракта (V_a) переносили в мерную колбу емкостью V_k и доводили до метки 0.1 М водным раствором HCl. Электронные спектры поглощения полученных растворов записывали на спектрофотометре Shimadzu UV 2550 при длине волны 515 нм в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

Концентрацию антоцианов в пересчете на Cy3G в исходном экстракте рассчитывали с учетом разбавления (2.3):

$$c = \frac{A}{26900 \cdot l} \cdot \frac{V_k}{V_a}, \quad (2.3)$$

где c – концентрация антоцианов в образце в пересчете на Cy3G; l – длина оптического пути, см; 26900 – молярный коэффициент поглощения, л·моль⁻¹·см⁻¹ (для цианидин-3-глюкозида хлорида), V_k и V_a – объемы колбы и аликвоты, соответственно, мл.

2.4.2 Определение соотношения между индивидуальными антоцианами в сложных смесях

Определяли площади пиков антоцианов на полученных хроматограмах, $S(i)$, и анализировали электронные спектры поглощения всех веществ, записанные в кювете детектора. Долю антоциана рассчитывали по уравнению для внутренней нормировки с поправочными коэффициентами:

$$\alpha(i) = \frac{k(i) \cdot S(i)}{\sum_j k(j) \cdot S(j)} \quad (2.4)$$

где $S(i)$ – площадь пика i -го компонента при записи хроматограммы на длине волны $\lambda(det)$; поправочный коэффициент $k(i)$ определяли, как соотношение интенсивностей поглощения при длине волны, соответствующей максимуму поглощения, $\lambda(max)$, к интенсивности поглощения при длине волны, использованной при записи хроматограммы для каждого из пиков.

2.4.3 Определение концентрации ХК хроматографическим методом

Для определения концентрации всех хлорогеновых кислот по площадям пиков на хроматограммах определяли градуировочную зависимость площади пика от концентрации кислот в растворе, используя единственное стандартное вещество – 5-кофеоилхинную кислоту полугидрат.

Для этого вначале готовили раствор стандартного образца 5CQA (5-кофеоилхинной кислоты полугидрата) с концентрацией 5 – 10 мг/мл. Затем соответствующим разбавлением готовили серии (не менее пяти) растворов с различными концентрациями 5CQA, $c(XK)$. При расчете концентрации кислоты учитывали присутствие в стандартном образце 0.5 моль H_2O на один моль 5CQA, умножая фактически использованную навеску на коэффициент 0.975.

Затем после хроматографирования определяли площади пиков, $S(XK)$ и рассчитывали градуировочную зависимость:

$$S(XK) = a \cdot c(XK) + b, \text{ мг/мл} \quad (2.4)$$

Используя пакет Анализ данных MSExcel, определяли значимость интерсепта b , который при правильной пробоподготовке и надежной работе хроматографа и программного обеспечения должен быть статистически незначимым. При выполнении такого условия пересчитывали базис данных по уравнению:

$$S(\text{ХК}) = a_1 \cdot c(\text{ХК}) \text{ мг/мл}, \quad (2.5)$$

и преобразовывали полученную зависимость для прямого расчета концентрации монокофеоилхинных кислот по уравнению, в котором $k = 1/a_1$:

$$c(\text{ХК}) = k \cdot S(\text{ХК}) \text{ мг/мл} \quad (2.6)$$

Для расчета концентрации дикофеоилхинных кислот (ДКХ) использовали формулу, учитывающую присутствие двух хромофоров в молекуле:

$$c(\text{ДКХ}) = k \cdot 0.729 \cdot S(\text{ДКХ}) \text{ мг/мл}, \quad (2.7)$$

где 0.729 равен $M(\text{ДКХ})/(2 \cdot M(\text{ХК})) = 516.4/(2 \cdot 354.3)$, где $M(\text{ДКХ})$ – молярная масса дикофеоилхинной кислоты (516.4 г/моль), а $M(\text{ХК})$ – молярная масса монокофеоилхинной кислоты (354.3 г/моль).

Расчет содержания монокофеоилхинных кислот в напитке, приготовленном из кофе, осуществляли по формуле:

$$c_i(\text{ХК}) = k \cdot \sum S_i(\text{ХК}) \cdot \frac{100}{V}, \text{ мг на 100 мл напитка}, \quad (2.8)$$

где k – градуировочный коэффициент;

$\sum S_i(\text{ХК})$ – сумма площадей пиков монокофеоилхинных на хроматограмме;

V – объем приготовленного напитка, мл,

100 – множитель для перевода объема на 100 мл.

При расчете суммы моно- и дикофеоилхинных кислот в формулу включают и площади пиков дикофеоилхинных кислот:

$$c_i(\text{ХК}) = (k \cdot \sum S_i(\text{ХК}) + k \cdot 0.729 \cdot \sum S_i(\text{ДКХ})) \cdot \frac{100}{V}, \text{ мг на 100 мл напитка}. \quad (2.9)$$

2.5 Хроматографические условия определения

2.5.1 Определение антоцианов в изократическом режиме

В условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ работе использовали хроматографические колонки:

а) 150×4.6 мм Symmetry C18 (3.5 мкм)

б) 150×2.1 мм Kromasil 100-5C18 – при масс-спектрометрическом детектировании.

Органические модификаторы (ОМ) для подвижной фазы: ацетонитрил, ацетон, метанол, этилацетат, этанол, пропанол-2. Во всех случаях скорость подачи подвижной фазы была постоянной – 0.8 мл/мин, а температура (если не оговорено иначе) термостата колонки 40°C.

Вариант 1. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетонитрилом и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 6 об. % ацетонитрила и 10 об. %

муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 10 об. % ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 2. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетонитрилом и орто-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 15 об. % ацетонитрила и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 18 об. % ацетонитрила и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 3. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с метанолом и орто-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 30 об. % метанола и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 31 об. % метанола и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 4. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетоном и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 4 об. % ацетона и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 6.4 об. % ацетона и 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 5. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с этилацетатом и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 1 об. % этилацетата и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 4 об. % этилацетата и 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 6. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с этанолом и орто-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 10 об. % этанола и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 16 об. % этанола и 1 об.% орто-фосфорной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Разделение антоцианов в условиях гидрофильной хроматографии осуществляли на колонке 150 × 2.1 мм Kromasil-DIOL, 5 мкм, используя для создания подвижной фазы ацетонитрил (85 об.%) и дистиллированную (ГОСТ 6709-75) воду (15 об.%), содержащую 3.3 об.% ортофосфорной кислоты. Все разделения осуществляли при 40 °С.

Хроматографическое поведение при комплексообразовании с добавками циклодекстрина в подвижную фазу исследовали с использованием колонки С4 в водных подвижных фазах с органическим модификатором ацетонитрилом (8 или 14 об. % для

антоцианов розы и антоцианов паслена, соответственно) и 0.5 об. % ортофосфорной кислоты.

2.5.2 Определение антоцианов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме

Вариант 1. Для создания градиентного режима элюирования использовали элюент А: 10 об. % HCOOH и 0 об. % CH₃CN в воде и элюент Б: 10 об. % HCOOH и 30 об.% CH₃CN в воде. Из множества испытанных вариантов хорошо зарекомендовал себя режим: 0 мин – 0% Б, 20 мин – 100% Б, 30 мин – 100% Б, 31 мин – 0% Б и возврат к исходной подвижной фазе 41 мин. Скорость подачи подвижной фазы 0.8 см³/мин, температура термостата колонок 40°C.

Вариант 2. Для градиентного элюирования использовали подвижную фазу А (10 об.% муравьиной кислоты и 6 об.% ацетонитрила в воде) и подвижную фазу Б (10 об.% муравьиной кислоты и 20 об.% ацетонитрила в дистиллированной воде). Режим градиента: 0 мин – 0% Б; 20 мин 100% Б; 30 мин 100% Б; 31 мин – 0% Б и 40 мин – 0% Б; скорость подачи элюента 0.8 мл/мин при спектрофотометрическом детектировании и 0.25 мл/мин при записи масс-спектров; объем пробы образцов 10 и 4 мкл соответственно.

Вариант 3. Для разделения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ с этанолом и ортофосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 8 об. % этанола и 1 об.% ортофосфорной кислоты в воде и раствор Б, содержащий 20 об. % этанола и 1 об.% ортофосфорной кислоты в воде. Режим градиента: 0 мин – 0% Б; 30 мин 100% Б; 31 мин – 0% Б и 40 мин – 0% Б; скорость подачи элюента 0.8 мл/мин.

2.5.3 Определение циклодекстринов обращенно-фазовой ВЭЖХ в изократическом режиме

Хроматографическое поведение циклодекстринов исследовали на колонках: 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5C4 (C4), 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5C8 (C8) и 100 × 4.6 мм Kromasil 100-5C18 (C18) в водных подвижных фазах с добавками метанола или ацетонитрила и ортофосфорной или муравьиной кислот.

2.5.4 Определение энтальпии переноса сорбатов с подвижной фазы на стационарную фазу

Для определения энтальпии переноса циклодекстринов и антоцианов с подвижной фазы на стационарную, $\Delta H(i)$, на соответствующей колонке определяли по изменению

удерживания веществ в интервалах температур от 15 до 50°C, и энтальпию рассчитывали по уравнению:

$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H(i)}{R} \cdot \frac{1}{T} + \text{const} \quad (2.7)$$

где $\ln k(i)$ – натуральный логарифм фактора удерживания соединения, R – газовая постоянная, T – абсолютная температура.

2.5.5 Определение хлорогеновых кислот методом ОФ ВЭЖХ

Разделение выполняли на колонке 150×4.6 мм Kromasil 300-5-C4 при температуре термостата колонок 30°C. Все эксперименты выполняли в изократическом варианте элюирования.

В работе использовали хроматографические колонки: 4.6×100 мм Kromasil 100-5C18 (5 мкм); 4.6×100 мм Kromasil 100-5C8 (5 мкм), 4.6×100 мм Kromasil 100-5C4 (5 мкм); 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18 (5 мкм); 4.6×150 мм Symmetry C18 (3.5 мкм); 4.6×150 мм Reprosil-Pur 5C18-AQ; 4.6×250 мм Диасфер-110-5C18; 4.0×100 мм Диасфер-110-5C18; 4.0×250 мм Nucleosil RP-C18; 4.6×250 мм Gemini C6Ph; 4.0×150 Диасфер C10CN (5 мкм); и 4.6 × 150 мм Kromasil 110-5C4 – в случае добавления циклодекстрина в ПФ.

Для колонки 4.6×150 мм Symmetry C18 (3.5 мкм):

Вариант 1. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетонитрилом и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 6 об. % ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 6 об. % ацетонитрила и 3 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 2. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетонитрилом и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 6 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 12 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 3. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетонитрилом и *орто*-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 6 об. % ацетонитрила и 0.3 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 12 об. % ацетонитрила и 0,3 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 4. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с пропанолом-2 (ИПС) и *орто*-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 3 об.

% пропанола-2 и 0.3 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 6 об. % пропанола-2 и 0.3 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 5. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с ацетоном и *орто*-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 2.5 об. % ацетона и 0.3 об.% *орто*-фосфорной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 12 об. % ацетона и 0.3 об.% *орто*-фосфорной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 6. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с этилацетатом и муравьиной кислотой готовили раствор А, содержащий 1 об. % этилацетата и 3 об.% муравьиной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 2 об. % этилацетата и 3 об.% муравьиной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Вариант 7. Для разделения хлорогеновых кислот в условиях ОФ ВЭЖХ с этилацетатом и *орто*-фосфорной кислотой готовили раствор А, содержащий 1 об. % этилацетата и 0.3 об.% *орто*-фосфорной кислоты в воде, и раствор Б, содержащий 4 об. % этилацетата и 0.3 об.% *орто*-фосфорной кислоты в воде. Для элюирования растворы смешивали в градиентном насосе в нужном соотношении.

Определение хлорогеновых кислот в образцах растворимого кофе, напиток (чая) мате, плодов артишока осуществляли *в градиентном режиме* на колонке 4.6×100 мм Kromasil 100-5C18 (5 мкм); защищенной предколонкой (4.6 × 100 мм, Kromasil 100-5C18). Подвижные фазы: А – 10 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде, Б - 40 об. % ацетонитрила и 1 об.% муравьиной кислоты в дистиллированной воде. Режим элюирования: 0 мин – 0 % Б, 10 мин – 0 % Б, 20 мин – 100 % Б, 21 мин – 0 % Б, 30 мин – 0 % Б. Хроматограммы записывали при 325 нм.

Второй вариант предполагал использование колонки Kromasil 100-5-C18 и градиентный режим элюирования с подвижными фазами А (10 об. % ИПС и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде) и Б (20 об. % ИПС и 0.25 об. % фосфорной кислоты в воде), 1 мл/мин. Режим: 0–10 мин – 40% Б; 20 мин – 100% Б; 21–30 мин – 40% Б. Для градуировки отклика детектора использовали растворы 5CQA. Температура термостата колонки 30°C.

Для одновременного определения монокофеилхинных кислот и кофеина в изократическом режиме использовали специальные условия пробоподготовки, включавшие десорбцию пробы с концентрирующего патрона раствором состава этилацетат–НСООН–Н₂O (5:3:92 % по объему), а для разделения использовали

стационарную фазу Symmetry®C18, 3.5 мкм (150×4.6 мм) и подвижную фазу состава этилацетат—H₃PO₄—вода (2.75:0.3:96.95 по объему) при температуре 30°C.

Для одновременного определения хлорогеновых (монокофеоил и дикофеоилхинных) кислот и кофеина в градиентном режиме использовали хроматографическую колонку 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм с защитной предколонкой 10×4 мм Kromasil 100-5C18, при расходе подвижной фазы 0.8 мл/мин с двумя компонентами подвижной фазы: элюента А – 3 об. % муравьиной кислоты–6 об. % ацетонитрила в воде; элюента Б – 3 об. % муравьиной кислоты–20 об. % ацетонитрила в воде. Программа градиентного режима: 0 мин – 0% Б; 20 мин – 100 % Б; 30 мин – 100% Б, 31 мин – 0% Б; 40 мин – 0 % Б, скорость подачи 0.8 мл/мин, температура термостата колонки – 30°C. Хроматограммы записывали при двух длинах волн детектора – 325 нм (для регистрации и определения площадей пиков хлорогеновых кислот) и 273 нм (для регистрации и определения площадей пиков кофеина).

При исследовании изменения селективности разделения изомерных дикофеоилхинных кислот растворенных веществ при повышении концентрации β-циклодекстрина в подвижной фазе использовали колонку 150×4,6 мм Kromasil 300-5C4, подвижные фазы 0,25 об.% ортофосфорной кислоты и 12% ацетонитрила в воде, концентрации β-циклодекстрина указаны на хроматограммах, температура термостата колонки – 30 °С.

2.5.6 Построение и анализ карт разделения первого типа

Для выбранной элюентной системы готовили серию водно-органических подвижных фаз с несколькими различными концентрациями органического модификатора (при постоянной концентрации подкислителя) или с несколькими концентрациями подкислителя (при постоянной концентрации органического модификатора).

Для каждого из составов выводили хроматографическую систему в режим – по совпадению времен удерживания всех компонентов при наложении двух последних записей хроматограммы. Для конечных хроматограмм определяли времена удерживания всех веществ и маркера «мертвого» времени. По полученным временам удерживания рассчитывали логарифмы факторов удерживания разделяемых веществ, составляя таблицу типа представленной на рис. 2.1.

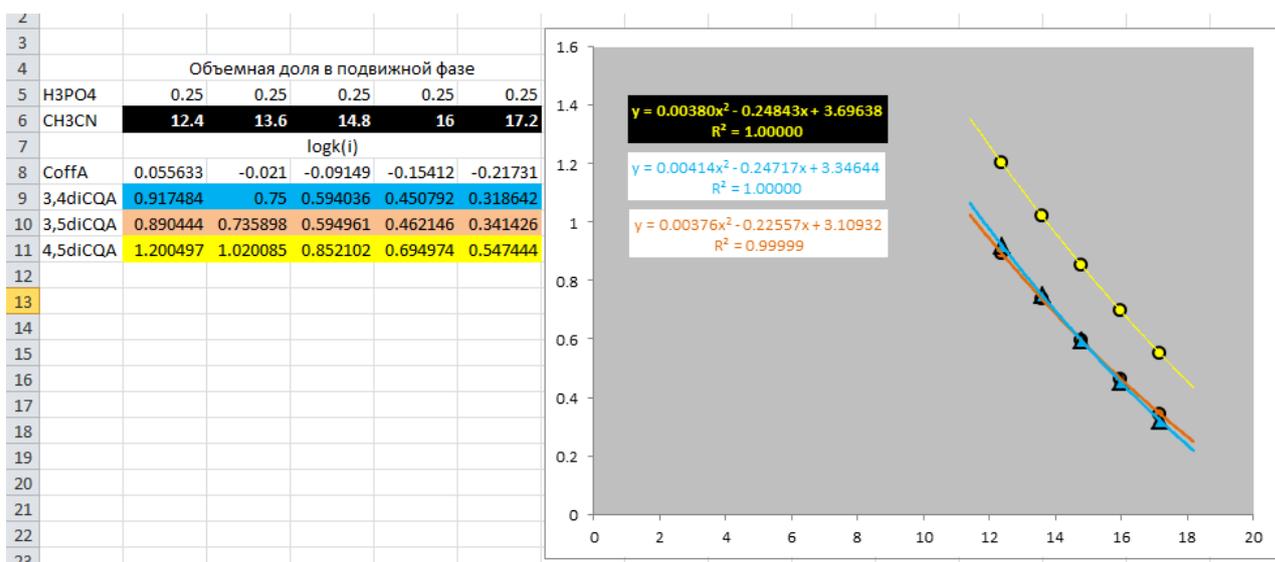


Рисунок 2.1 – Построение карт разделения первого типа

При построении определения аналитической зависимости параметров линий трендов зависимостей логарифмов факторов удерживания относительно изменяющейся объемной доли компонента подвижной фазы выбирали квадратичную зависимость:

$$\lg k(i) = a_0 - a_1 \cdot \phi + a_2 \cdot \phi^2 \quad (2.8)$$

Это позволяло аппроксимировать полученные зависимости на нулевое содержания соответствующего модификатора, $\lg k_{aq}(i)$. Фактор удерживания $k_{aq}(i)$ связан с константой равновесия распределения вещества (i) через фазовое соотношение колонки (ϕ), которое не поддается экспериментальному определению. Поэтому изменение свободной энергии переноса сорбата с подвижной фазы на стационарную определить невозможно. Однако существует возможность рассчитать изменение этой энергии при переходе от одного соединения, i, к другому, взятому в качестве вещества сравнения, гер, при условии, что хроматограммы записаны в идентичных хроматографических условиях:

$$\Delta \Delta G^{\circ} = RT \lg k_{aq}(\text{rep}) - RT \lg k_{aq}(i). \quad (2.9)$$

Это – корректный показатель для сравнения сорбционных свойств двух сопоставляемых хроматографических колонок.

2.5.7 Построение и анализ карт разделения второго типа

Для построения карт разделения второго типа используют тот же набор данных, который использовался при построении карт разделения первого типа. Только иначе используются полученные данные, рис. 2.2.

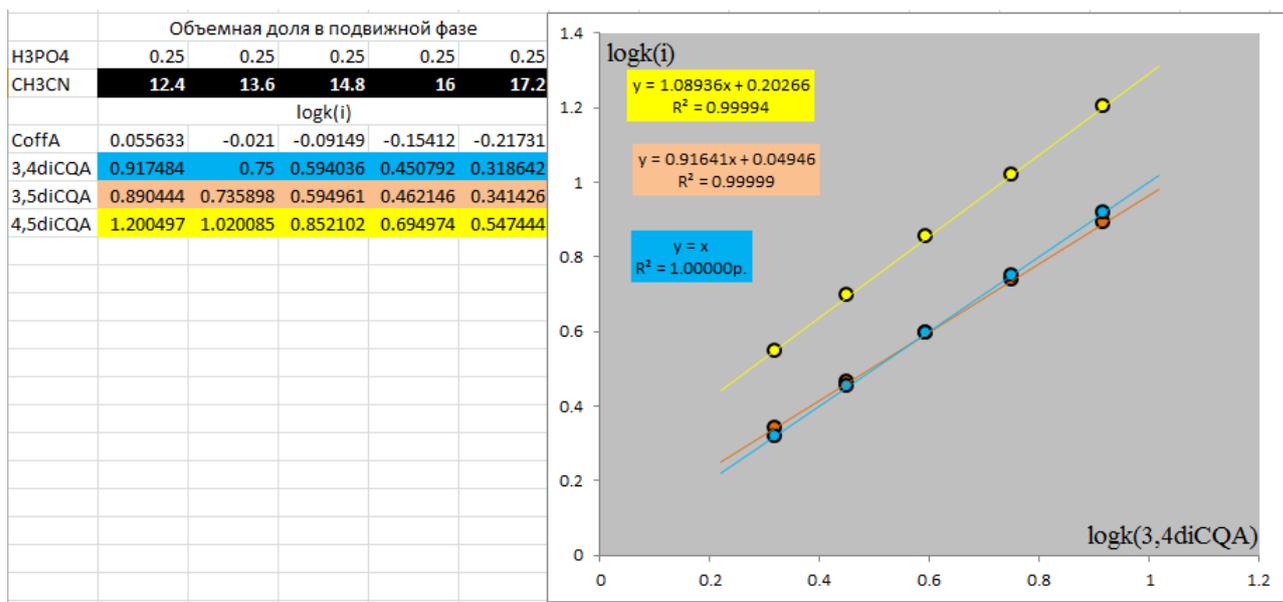


Рисунок 2.2 – Построение карт разделения второго типа

На картах второго типа по оси ОХ откладываются $\log k(3,4diCQA)$, а по оси ОУ – логарифмы факторов удерживания остальных изомеров (включая 3,4diCQA по уравнениям:

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg k(3,4diCQA). \quad (2.10)$$

Параметр a_1 этого уравнения соответствует соотношению числа моль органического модификатора подвижной фазы, высвобождаемых при сорбции относительно такого же показателя для вещества сравнения. Параметр a_1 указывает на различия в сольватации веществ в подвижной фазе или на различие в их расположении в сорбционном слое сорбента.

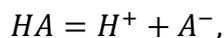
На рис. 2.2 удерживание двух изомеров (3,4diCQA и 3,5diCQA) близкое в использованных хроматографических условиях. Изомер 3,4diCQA сильнее удерживается при нулевом содержании ацетонитрила, но наклон для этого вещества больше, чем для его изомера (3,5diCQA), поэтому с ростом концентрации ацетонитрила его удерживание уменьшается немногим быстрее чем изомера, поэтому наступает момент, когда вещества не разделяются и затем порядок удерживания обращается.

2.6 Обработка результатов зависимости удерживания хлорогеновых кислот от pH подвижной фазы

Удерживание ионизируемых соединений может быть описано по схеме, в которой суммируется удерживание каждой из форм, умноженное на долю этой формы в подвижной фазе с заданным pH. Например, для кислоты НА суммарное удерживание будет складываться в соответствии с формулой:

$$t_R \left(\sum i \right) = t_R(A^-) \cdot \alpha(A^-) + t_R(HA) \cdot \alpha(HA)$$

С учетом диссоциации кислоты НА и константы диссоциации:



$$K = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]},$$

можно рассчитать доли каждой из форм в растворах:

$$[A^-] = K \frac{[HA]}{[H^+]},$$

$$\sum i = [A^-] + [HA] = [HA] \cdot \left(1 + \frac{K}{[H^+]} \right) = \frac{[HA]}{[H^+]} ([H^+] + K),$$

и подставить полученные выражения в конечную формулу:

$$\begin{aligned} t_R \left(\sum i \right) &= t_R(A) \cdot \frac{K \frac{[HA]}{[H^+]}}{\frac{[HA]}{[H^+]} ([H^+] + K)} + t_R(HA) \cdot \frac{[HA]}{\frac{[HA]}{[H^+]} ([H^+] + K)} \\ &= \frac{t_R(A) \cdot K + t_R(HA) \cdot [H^+]}{[H^+] + K} \\ t_R(\sum i) &= \frac{t_R(A) \cdot K + t_R(HA) \cdot [H^+]}{[H^+] + K} \end{aligned} \quad (2.11)$$

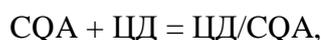
В конечном уравнении содержится три неизвестных, два из которых могут быть определены в крайних случаях – в сильнокислом растворе, $t_R(HA)$, и сильно щелочном растворе, $t_R(A^-)$ с одинаковой концентрацией органического модификатора. Разумеется, в качестве кислоты необходимо использовать слабую неорганическую кислоту, например, H_3PO_4 . Подбор константы диссоциации выполняют до наименьшего расхождения между экспериментальными данными и расчетными значениями, минимизируя сумму квадратов отклонений для всех экспериментальных точек:

$$\sum (t_R(\sum i)_{\text{exp}} - t_R(\sum i)_{\text{calc}})^2. \quad (2.12)$$

2.7 Расчет констант комплексообразования «гость-хозяин»

Рассмотрим комплексообразование бета-циклодекстрина (ЦД) с изомерными монокофеоилхинными кислотами (CQA).

Рассмотрим одну из изомерных CQAs. Если в подвижной фазе появляется β -циклодекстрин, то возможно образование комплекса включения состава 1:1:



При этом детектор при высокой скорости установления равновесий будет реагировать на сумму форм CQA:

$$\Sigma CQA = CQA + ЦД/CQA. \quad (2.13)$$

При этом удерживание каждой CQA будет равно сумме удерживания составных форм, рассчитываемое как произведение доли этих форм в растворе, α , умноженное на их факторы удерживания:

$$k[\Sigma CQA] = k_0 \cdot \alpha[CQA] + k_i \cdot \alpha[ЦД/CQA]. \quad (2.14)$$

При установлении равновесия комплексообразования:

$$K = \frac{[ЦД/CQA]}{[CQA][ЦД]}.$$

Из этого уравнения выражаем концентрацию комплекса в ПФ:

$$[ЦД/CQA] = K[CQA][ЦД].$$

Полученное выражение вставим в уравнение (2.11):

$$[\Sigma CQA] = [diCQA] + K[CQA][ЦД].$$

Тогда

$$\begin{aligned} \alpha[ЦД/CQA] &= K[ЦД]/(1 + K[ЦД]), \\ \alpha[CQA] &= 1/(1 + K[ЦД]), \end{aligned}$$

При этом уравнение для удерживания вещества (2.14) при любой концентрации циклодекстрина будет преобразовано:

$$k(\Sigma CQA) = (k_0 + Kk_i [ЦД])/(1 + K[ЦД]).$$

Если удерживание комплексов включения существенно меньше удерживания не включенных в комплекс молекул, то допустимо пренебрежение:

$$k(\Sigma CQA) \approx (k_0)/(1 + K_1[ЦД]).$$

В этом случае справедливо уравнение (2.12):

$$(k_0)/k(\Sigma CQA) \approx 1 + K[ЦД] \quad (2.15)$$

2.8 Расчетные методы

При исследовании взаимодействия циклодекстринов с подвижными фазами использовали моделирование методом молекулярной механики (ММ+) в ПО Hyperchem 8.0.

Моделирование показало, что α -, β - и γ -циклодекстрины могут образовывать комплексы включения не только с октадецилдиметилсилановыми (C18), но и с октилдиметилсилановыми (C8) и с бутилдиметилсилановыми (C4) привитыми фазами. Но характер взаимодействия циклодекстринов с привитыми группами несколько изменяется с ростом размера полости ЦД. Так, α -циклодекстрин вмещает в своей полости только

бутильный радикал, в то время, как γ -циклодекстрин поглощает весь привитой фрагмент, упираясь в силикагелевую подложку, рис. 2.3.

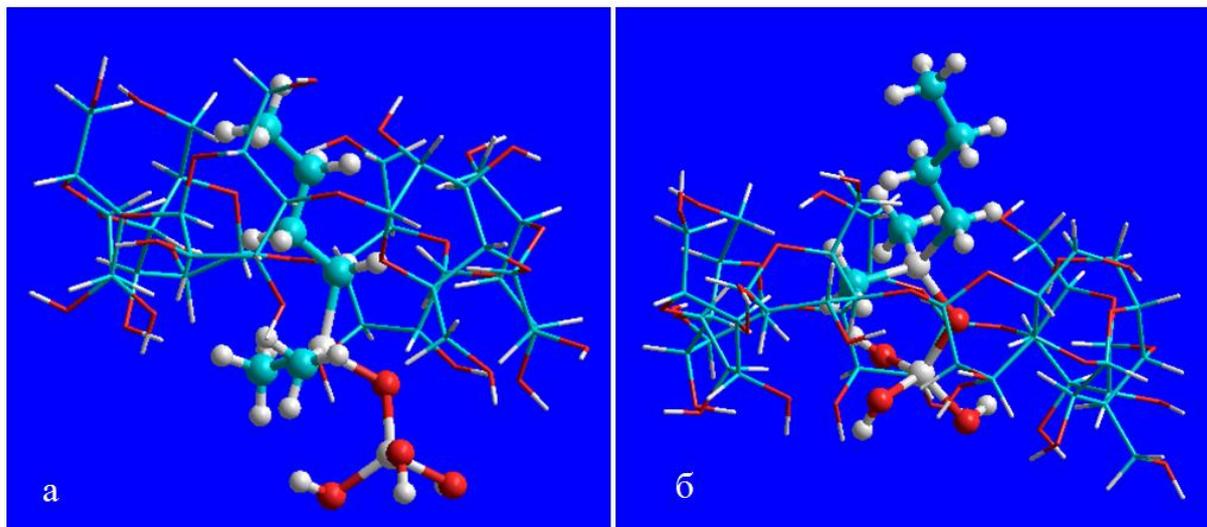


Рисунок 2.3 – Моделированные комплексы включения α - и γ -циклодекстринов с сорбционными центрами стационарной фазы С4

Для дикофеоилхинных кислот минимизацию энергии и определение геометрии конформеров выполняли в программе Chem3D (PerkinElmer) методом MM2.

Параметры липофильности (расчетные значения $\log P$ – логарифма константы распределения веществ между октанолом-1 и водой) рассчитывали в программах Chem3D (ChenOffice) и интерактивно на сайте Molinspiration (miLogP).

2.9 Валидация способов определения (статистическая обработка)

Валидацию способов проводили, основываясь на фармакопейной статье ОФС.1.1.012.15 [251], в которой рекомендовано (хотя и не обязательно для всех вариантов) выполнить оценку следующих характеристик:

- специфичности;
- пределу обнаружения;
- пределу количественного определения;
- аналитической области;
- линейности;
- правильности;
- прецизионности;
- устойчивости.

Валидация спектрофотометрического детектирования

Специфичность

Нарушение 100 %-ной ***специфичности*** спектрофотометрического способа детектирования электронных спектров поглощения определяется, прежде всего, выбором условий разделения сложных смесей, при которых исключается соэлюирование нескольких антоцианов в выбранных хроматографических условиях.

Для установления специфичности детектирования конкретного соединения рекомендуется контролировать постоянство спектральных отношений, при котором рассчитывают соотношение величин абсорбции при двух (или более) длинах волн детектирования для различных областей анализируемого пика. В случае ПО Agilent ChemStation при использовании диодно-матричного детектирования существует возможность простого наложения нормированных спектров пика, записанных в различных частях пика. При 100 %-ной специфичности эти спектры налагаются без видимых отклонений, что наблюдали в настоящей работе во всех случаях при изократическом элюировании при правильном выборе условий разделения.

Строго говоря, при идеальном совпадении времен удерживания двух веществ с одинаковыми временами удерживания контроля спектральных отношений недостаточно – следует сопоставить электронные спектры поглощения одних и тех же компонентов из различных хроматограмм (для экстрактов антоцианов из растительных источников), что также возможно при использовании ПО Agilent ChemStation.

Второй вариант достижения 100 %-ной степени специфичности предполагает использование карт разделения второго типа. Для этого на карте разделения ищут вертикальный срез, при котором все вещества, несмотря на инверсии удерживания компонентов сложной смеси, имеют различные времена удерживания. Иллюстрация способа представлена на рис. 2.4.

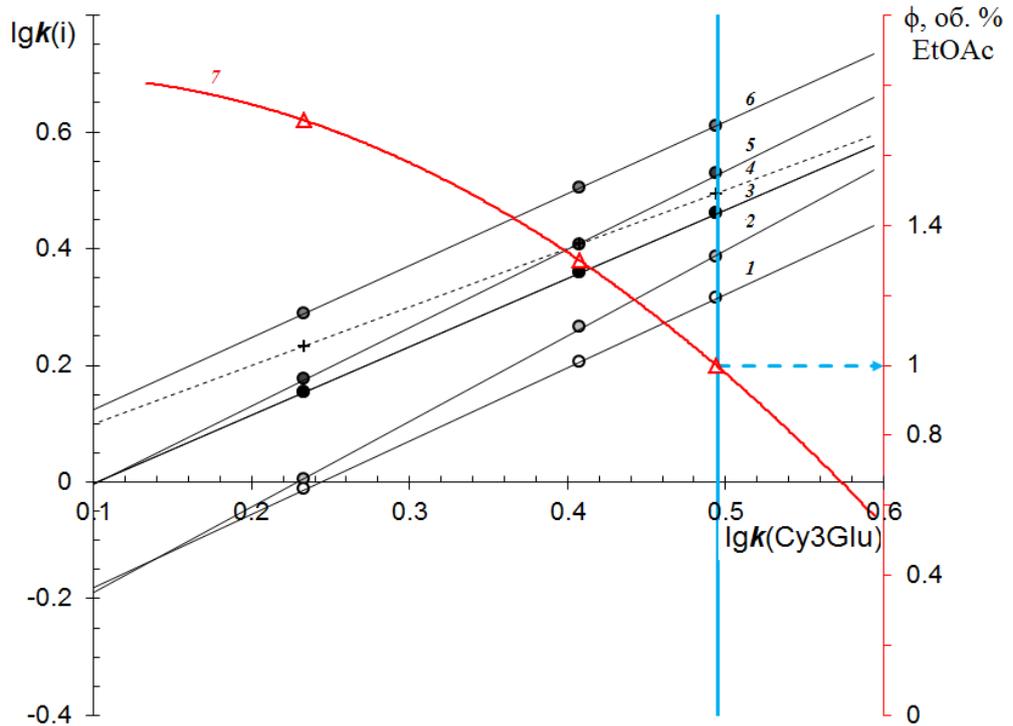


Рисунок 2.4 – Использование карты разделения второго типа для определения оптимального состава подвижной фазы

Элюентная система «этилацетат (EtOAc) – 10 об. % HCOOH в воде.: 1 – Cy3Sopho; 2 – Cy3GRut; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy3Glu; 5 – Cy3XRut; 6 – Cy3Rut, 7 – объемная доля этилацетата

В данном случае к обычной карте разделения второго типа добавляется линия 7 (выделена красным цветом), связывающая логарифм фактора удерживания Cy3Glu с объемной долей этилацетата в подвижной фазе. На карте находим вертикальный срез (голубая вертикальная линия), при котором все компоненты имеют различные времена удерживания. При этом пересечение красной и голубой линий указывает на содержание органического модификатора при требуемом разделении всех компонентов (в данном случае 1 об.%).

Предел обнаружения

Этот параметр нельзя признать правильным при хроматографии со спектрофотометрическим детектированием, поскольку интенсивность шумов детектора зависит от состояния УФ-лампы и не имеет отношения к разработанным условиям разделения и детектирования. Более того, при использовании твердофазной экстракции обычно существует возможность многократно увеличить степень концентрирования.

Предел количественного определения и аналитическая область

Предел количественного определения зависит от оптической плотности не только в максимуме пика (10:1 по отношению к интенсивности шума), поскольку ПО должно автоматически определять начало и окончание пика. В ПО Agilent ChemStation существует возможность контроля автоматической разметки пиков и изменение разметки вручную. Но качество электронных спектров веществ (по нашему опыту) при оптической плотности в максимуме пика менее 0.050, как правило, оказывается не удовлетворительным, поэтому в данной лаборатории при количественном определении площадей пиков использовали условия пробоподготовки, при которых оптическая плотность в максимуме основных пиков не превышала 1.100 и не была меньше 0.100. Экспериментально установлено, что при оптической плотности 1.5 искажаются даже электронные спектры поглощения сорбатов.

Линейность

Линейность определяют по зависимости отклика спектрофотометрического детектора от концентрации определяемых компонентов. При правильной работе хроматографа и программного обеспечения в результате может быть получена прямолинейная зависимость со статистически незначимым интерсептом. Появление статистически значимого интерсепта, чаще всего, указывает на недостаточно корректное определение программой обработки начала и окончания обрабатываемого пика. Исправление ситуации возможно при замене автоматического определения этих параметров ручной разметкой хроматограммы.

При определении антоцианов брусники (или клюквы) градуировочную зависимость определяли, как взаимосвязь площади пиков антоцианов и концентрации антоцианов растворе на примере пяти экстракта плодов брусники с различной концентрацией антоцианов, полученных за счет разбавления, рис. 2.5. Концентрацию антоцианов определяли в экстрактах по дифференциальному спектрофотометрическому методу.

Как следует из представленных данных, получена хорошая линейность ($R^2 = 0.99995$) между концентрацией антоцианов, c , (мкмоль/л в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид) и площадью пиков экстракта, S , mAU·s (произведение тысячной доли оптической плотности на секунду):

$$S = 10890 \cdot c - 57, R^2 = 0.99995. \quad (2.18)$$

Обработка полученных данных в программном пакете Анализ данных (MS Excel) показывает, что интерсепт является статистически незначимым, поэтому в методе отсутствуют систематические погрешности, по крайней мере, в диапазоне площадей пиков (от 2335 до 13950):

$$S = 10890 (\pm 118) \cdot c + -57 (\pm 89).$$

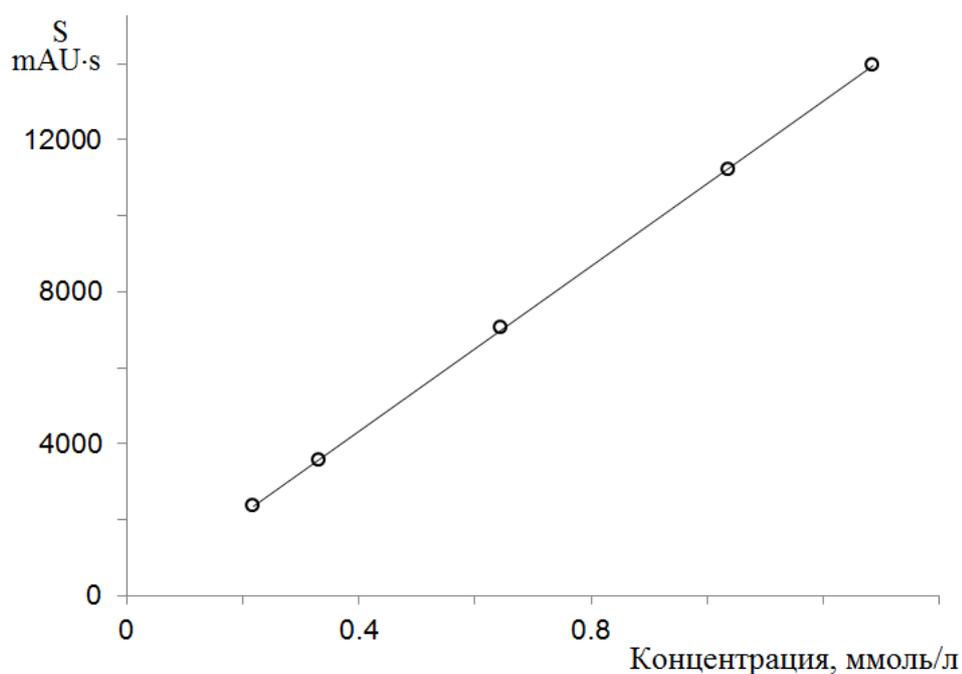


Рисунок 2.5 – Градуировочный график для соотношения между концентрацией и площадями пиков на хроматограмме

Следовательно, оправдано использование градуировочного графика без интерсепта:

$$S = 10830 \cdot c, \quad (2.19)$$

который можно преобразовать в уравнение для расчета концентрации антоцианов в пробе:

$$c = 9.23 \cdot 10^{-5} \cdot S, \text{ ммоль/л} \quad (2.20)$$

Относительное стандартное отклонение, связанное с использованием градуировочного коэффициента, рассчитывали по формуле

$$S_{\text{отн.}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{c_{\text{exp.}} - c_{\text{calc.}}}{c_{\text{exp.}}} \right)^2}{n-1}}, \quad (2.21)$$

где $c_{\text{exp.}}$ – фактическая концентрация антоцианов в пробе, $c_{\text{calc.}}$ – расчетное по формуле (2.20) значение концентрации антоцианов.

Таблица 2.2 – Относительное стандартное отклонение, связанное с использованием градуировочного коэффициента

n	$C_{exp.}$	$C_{calc.}$	$\left(\frac{C_{exp.} - C_{calc.}}{C_{exp.}}\right)^2$
1	1.2870	1.2876	2.09464E-07
2	1.0371	1.0356	2.28764E-06
3	0.6446	0.6490	4.56815E-05
4	0.3312	0.3262	0.000223294
5	0.2178	0.2155	0.000111251
$S_{отн.}$			0.0097 (0,97 %)

При определении кофеина градуировочная зависимость представлена на рис. 2.6.

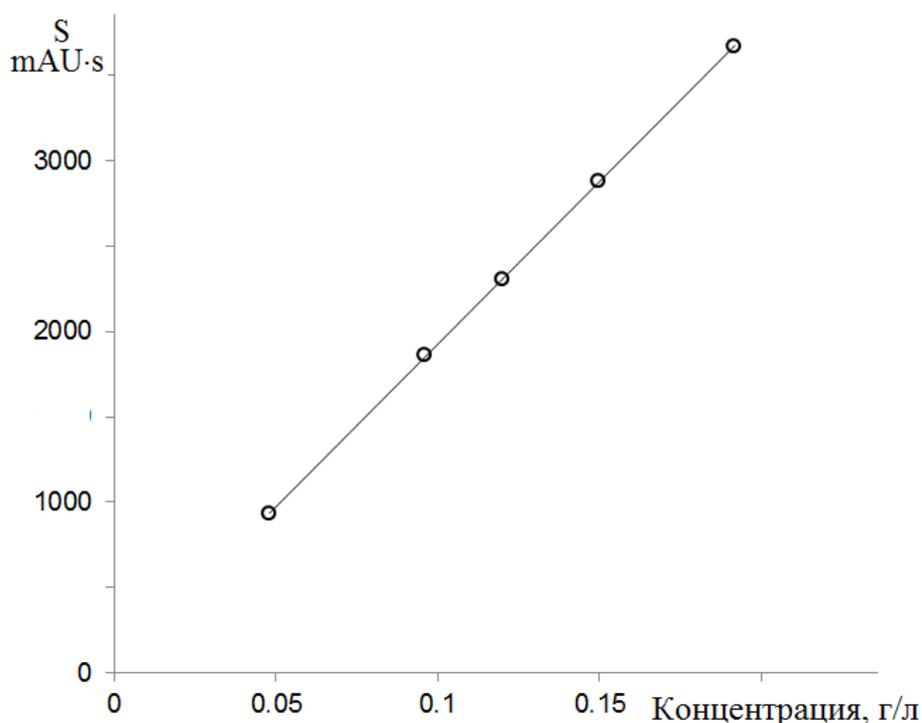


Рисунок 2.6 – Градуировочный график для соотношения между концентрацией кофеина и площадями пика на хроматограмме

Как следует из представленных данных, получена хорошая линейность ($R^2 = 0.99995$) между концентрацией антоцианов, c , (мкмоль/л в пересчете на цианидин-3-глюкозид хлорид) и площадью пиков экстракта, S , mAU·s (произведение тысячной доли оптической плотности на секунду):

$$S = 18986 \cdot c + 23, R^2 = 0.99997. \quad (2.22)$$

Обработка полученных данных в программном пакете Анализ данных (MS Excel) показывает, что интерсепт является статистически незначимым, поэтому в методе отсутствуют систематические погрешности, по крайней мере, в диапазоне площадей пиков (от 2335 до 13950):

$$S = 18986 (\pm 246) \cdot c + 23 (\pm 28).$$

Следовательно, оправдано использование градуировочного графика без интерсепта:

$$S = 19150 \cdot c, \quad (2.23)$$

который можно преобразовать в уравнение для расчета концентрации антоцианов в пробе:

$$c = 5.22 \cdot 10^{-5} \cdot S, \text{ г/л.} \quad (2.24)$$

Относительное стандартное отклонение, связанное с использованием градуировочного коэффициента, рассчитывали по формуле (2.21).

Таблица 2.3 – Относительное стандартное отклонение, связанное с использованием градуировочного коэффициента

n	$C_{exp.}$	$C_{calc.}$	$\left(\frac{C_{exp.} - C_{calc.}}{C_{exp.}}\right)^2$
1	0.1920	0.1913	1.2803E-05
2	0.1500	0.1502	1.4304E-06
3	0.1200	0.1198	2.8056E-06
4	0.9600	0.0969	8.464E-05
5	0.0480	0.0485	0.00012939
$S_{отн.}$			0.0076 (0,76 %)

Таким образом, вклад погрешности градуировочного графика находится на уровне 1 отн. %.

Правильность

Необходимость оценки правильности хроматографического определения аналитов в хроматографии связана с тем, что оператор не знает точное содержание веществ в пробе и какая часть этих веществ доходит до детектора. Это особенно важно после обнаружения в нашей лаборатории галерейных пор [252], вследствие которых не все молекулы аналитов сразу попадают в поток, направленный к детектору. При этом также какие-то из них могут быть разрушены при контакте с материалом колонки. Для решения этой

проблемы нами впервые разработан двухколоночный вариант, по которому вначале используют одну колонку, которая позволяет определить площади пиков всех веществ, выходящих из этой колонки. Если к этой колонке последовательно присоединить и рабочую колонку, то можно сопоставить площади пиков с уже найденными в предыдущем опыте.

Результаты применения разработанного метода к определению площадей пиков экстракта вишни представлены в табл. 1.4.

Таблица 2.4 – Относительное стандартное отклонение, связанное с использованием градуировочного коэффициента

Антоциан	Площади пиков (n = 2)		Относительное различие, %
	После первой колонки	После второй колонки	
Антоцианы вишни			
Cy3Sopho	361 ± 2	363 ± 3	0.6
Cy3GRut	3175 ± 75	3181 ± 50	0.3
Cy3Glu	100 ± 1.5	103 ± 2	3.0
Cy3Rut	715 ± 5	717 ± 3	0.3
Среднее			1.1

Таким образом, площади пиков после второй колонки оказались даже несколько больше площадей этих же пиков после первой колонки. Это может быть следствием увеличения эффективности хроматографической системы за счет использования двух последовательно соединенных колонок, хотя различие между результатами находится на том же уровне, что и различие между площадями пиков при параллельных наблюдениях. Очевидно, что чем меньше площадь пика, тем большие различия как для параллельных наблюдений, так и для сопоставления одноколоночного и двухколоночного вариантов.

Хроматографический метод применяется для определения количественного соотношения между компонентами исследуемого экстракта при спектрофотометрическом методе определения суммы антоцианов. В этом отношении линейность необходимо оценивать по соотношению между хроматографически определяемыми долями компонентов в смеси как функции суммарной концентрации (суммы площадей пиков) антоцианов в образце, рис. 2.7.

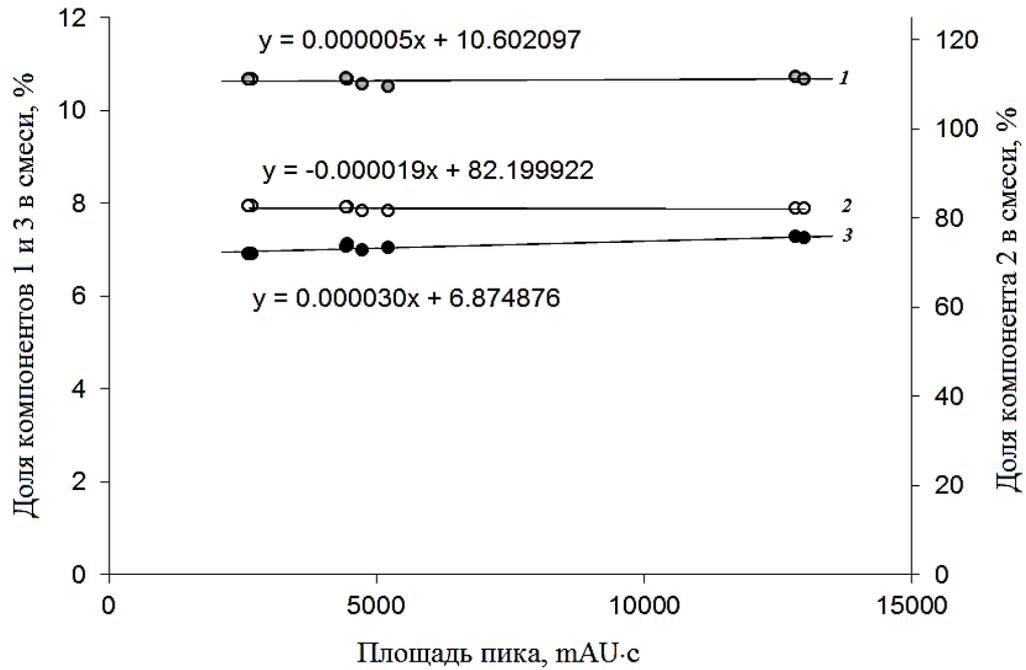


Рисунок 2.7 – Зависимость долей Cy3G (1), Cy3Rut (2) и Pn3Rut (3) от суммы площадей пиков на хроматограммах антоцианов плодов черешни

Из представленных данных следует, что доли цианидин-3-глюкозида и цианидин-3-рутинозида мало зависят от суммы площадей пиков – для Cy3Glu $S_{отн.}$ составило 0.63%, а для Cy3Rut $S_{отн.} = 0.45\%$. Наибольшее значение $S_{отн.}$ для Pn3Rut (1.86%) объясняется уширением пика с ростом времен удерживания и связанными с этим проблемами с автоматическим определением начала и конца пика ПО Agilent ChenStation. Тем не менее, разброс абсолютных значений долей трех компонентов в смеси оказался меньше 0.8 % для всех компонентов выборке из 9 наблюдений.

Правильность спектрофотометрического метода имеет принципиально важное значение в случае определения антоцианов спектрофотометрическим методом или хроматографическим со спектрофотометрическим детектированием по нескольким причинам среди которых основным фактором является представленный ниже.

Дело в том, что спектрофотометрический метод позволяет определить не антоцианы вообще, а только антоцианы во флавилиевой форме. При этом в исходном растительном сырье антоцианы не обязаны находиться именно в этой форме. При экстракции в кислой среде (pH 1) все формы переходят во флавилиевую, но переход в нее из *транс*-халконных форм требует значительного времени (по нашим данным не менее суток при комнатной температуре). Поэтому утверждение о том, что следует определять оптическую плотность экстрактов не позднее 40 мин с момента разбавления исходного

экстракта, указанное во всемирно принятой и дублированной в ГОСТе РФ [253, 254] назвать обоснованным нельзя, см. табл. 2.5.

Таблица 2.5 – Изменение оптической плотности экстрактов при суточной выдержке

Время выдержки, мин	Экстракт плодов черешни		Экстракт плодов вишни обыкновенной		Экстракт плодов вишни антипки	
	A	$\Delta A, \%$	A	$\Delta A, \%$	A	$\Delta A, \%$
0	0.836	0	0.993	0	0.769	0
30	0.847	1.3	1.015	2.2	0.782	1.7
60	0.852	1.9	1.025	3.2	0.789	2.6
120	0.855	2.3	1.037	4.4	0.797	3.6
180	0.857	2.5	1.044	5.1	0.803	4.4

Таким образом, за 3 ч оптическая плотность экстракта может вырасти более, чем на 5 %, хотя рост оптической плотности к исходу 3 ч заметно уменьшается. По нашим данным еще около 1 % добавится при выдержке этих экстрактов в течение ночи. Следовательно, для правильного определения антоцианов необходима выдержка свежего экстракта обычно в течение 15 – 20 ч.

Прецизионность

Прецизионность спектрофотометрического метода определяли анализом результатов последовательного хроматографирования одного и того же образца экстракта.

Для этого стандартное отклонение (S) и относительное стандартное отклонение ($S_{\text{отн.}}$) рассчитывали по формулам:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (2.25)$$

$$S_{\text{отн.}} = \frac{S}{\bar{x}} \quad (2.26)$$

Стандартное отклонение среднего арифметического значения:

$$S_{\bar{x}} = \frac{S}{\sqrt{n}} \cdot 100\% \quad (2.18)$$

где n - количество повторных измерений, \bar{x} – среднее арифметическое n единичных измерений.

Прецизионность определения площадей полностью разделенных пиков при вводе пробы автодозатором была проверена при определении антоцианов черешни, в которой основные компоненты – цианидин-3-глюкозид (Cy3Glu) и цианидин-3-рутинозид (Cy3Rut) с присутствием и заметного количества пеонидин-3-рутинозида (Pn3Rut), табл. 2.6.

Таблица 2.6. – Прецизионность хроматографического метода на примере определения площадей пиков антоцианов экстракта черешни

Антоциан	Площади пиков, mAU·с					S	$S_{отн.}$
Су3G	476	475	474	475	476	0.84	0.18
Су3Rut	3673	3672	3658	3662	3672	6.91	0.19
Pn3Rut	315	317	313	315	317	1.67	0.53

Для трех параллельных наблюдений для настоев (1 г на 100 мл кипятка) четырех различных сортов чая мате определяли содержание монокофеоилхинных кислот, дикофеоилхинных кислот и кофеина в градиентном режиме, табл. 2.7 – 2.10.

Таблица 2.7. – Прецизионность определения концентрации монокофеоилхинных и дикофеоилхинных кислот и кофеина в напитках мате «Чайная коллекция», мг на 100 мл.

Компонент	Номер опыта			$S_{отн.}, \%$
	1	2	3	
кофеин	0.202	0.200	0.197	1.45
3CQA	0.261	0.290	0.268	1.48
4CQA	0.190	0.199	0.195	5.51
5CQA	0.1887	0.169	0.198	2.16
Сумма МКХ кислот	0.639	0.658	0.661	8.05
3.5diCQA	0.082	0.093	0.124	1.83
3.4diCQA	0.144	0.220	0.160	21.9
4.5diCQA	0.085	0.128	0.158	22.8
Сумма ДКХ кислот	0.672	0.599	0.599	29.7

По представленным данным прецизионность определения кофеина оказалась наивысшей, а самые высокие дисперсии характеризуют дикофеоилхинные кислоты, но это не является следствием позднего элюирования этих компонентов, поскольку запись хроматограмм производили в градиентном режиме. Разброс данных обусловлен, с одной стороны, сложностью точного приготовления объема экстракта добавлением, спецификой охлаждения каждой из проб и неомогенностью растительного материала.

Таблица 2.8. – Прецизионность определения концентрации монокофеоилхинных и дикофеоилхинных кислот и кофеина в напитках мате «Spirit», мг на 100 мл.

Компонент	Номер опыта			S _{отн.} , %
	1	2	3	
кофеин	0.061	0.067	0.068	2.8
3CQA	0.105	0.110	0.113	3.8
4CQA	0.083	0.083	0.089	4.2
5CQA	0.083	0.077	0.091	8.6
Сумма МКХ кислот	0.271	0.269	0.293	4.8
3.5diCQA	0.031	0.024	0.052	41
3.4diCQA	0.054	0.067	0.052	11
4.5diCQA	0.024	0.023	0.064	56
Сумма ДКХ кислот	0.109	0.113	0.058	27

Таблица 2.9. – Прецизионность определения концентрации монокофеоилхинных и дикофеоилхинных кислот и кофеина в напитках мате «Aquate», мг на 100 мл.

Компонент	Номер опыта			S _{отн.} , %
	1	2	3	
кофеин	0.107	0.100	0.110	4.8
3CQA	0.144	0.146	0.163	6.9
4CQA	0.111	0.106	0.124	8.2
5CQA	0.112	0.098	0.126	12.5
Сумма МКХ кислот	0.367	0.350	0.413	8.7
3.5diCQA	0.043	0.029	0.074	47
3.4diCQA	0.072	0.078	0.090	11
4.5diCQA	0.040	0.027	0.087	61
Сумма ДКХ кислот	0.154	0.134	0.251	35

В рассмотренных случаях концентрация всех ингредиентов между сортами растительного материала существенно больше, что, скорее всего, отражает более низкое качество растительного материала.

Таблица 2.10. – Прецизионность определения концентрации монокофеоилхинных и дикофеоилхинных кислот и кофеина в напитках мате сорта без названия, мг на 100 мл.

Компонент	Номер опыта			S _{отн.} , %
	1	2	3	
кофеин	0.107	0.141	0.156	19
3CQA	0.143	0.250	0.263	30
4CQA	0.109	0.178	0.201	29
5CQA	0.110	0.160	0.203	30
Сумма МКХ кислот	0.362	0.588	0.667	29
3.5diCQA	0.040	0.070	0.128	56
3.4diCQA	0.067	0.179	0.177	45
4.5diCQA	0.035	0.090	0.180	72
Сумма ДКХ кислот	0.142	0.340	0.485	53

Устойчивость валидируемых способов – в настоящей работе не проверялась.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Сопоставление двух вариантов карт разделения в хроматографии

Обращенно-фазовая ВЭЖХ является наиболее часто используемым хроматографическим методом в настоящее время [255]. При этом использование метода осложнено существованием более 600 марок коммерчески доступных стационарных фаз, свойства которых зависят от технологии приготовления с некоторыми различиями даже между колонками одной марки, но разных партий. Соответственно, возникают проблемы сопоставления этих фаз для определения возможности замены или при оптимизации селективности разделения сложных смесей сорбатов.

Под селективностью разделения пары соединений в хроматографии подразумевается отношение исправленных времен, исправленных объемов или факторов удерживания сорбатов i и j [256]:

$$\alpha = \frac{V'_R(j)}{V'_R(i)} = \frac{t'_R(j)}{t'_R(i)} = \frac{k_R(j)}{k_R(i)}, \text{ если } k_R(j) > k_R(i), \quad (3.1)$$

где α – селективность (или фактор разделения), V'_R и t'_R – исправленные объемы или времена удерживания, а $k_R(i)$ или $k_R(j)$ – факторы удерживания, соответственно, компонентов i и j .

Но селективность трудно признать надежной характеристикой, поскольку этот параметр обычно зависит от состава подвижной фазы даже для данных сорбатов и данной стационарной фазы. При этом нередки случаи, при которых смена соотношения компонентов подвижной фазы приводит к инверсии порядка элюирования некоторых пар сорбатов. Поэтому сопоставление селективности разделения сорбатов в одном или в ограниченном числе составов подвижных фаз даже выбранной системы на различных стационарных фазах в общем случае бесперспективно. В связи с этим, например, неточно утверждение о том, что дигликозиды антоцианидинов удерживаются в условиях ОФ ВЭЖХ слабее, чем моногликозиды [257].

Широко используемый в настоящее время метод, основанный на линейных соотношениях энергий сольватации (LSER, [248]) в широком диапазоне составов подвижных фаз, требует значительных временных затрат. При этом различия между экспериментальными и расчетными значениями существенны даже для сорбатов «тренировочного ряда» [258].

С другой стороны, можно учесть, что изменение удерживания сорбатов с ростом концентрации органического модификатора подвижной фазы в узком диапазоне концентраций модификатора обычно описывается линейным уравнением Снайдера [259]:

$$\lg k(i) = a_0(i) - a_1(i) \cdot \varphi(OM), \quad (3.2)$$

где логарифм фактора удерживания сорбата i линейно зависит от φ - объемной доли органического модификатора (OM), а $a_0(i)$ – асимптотическая характеристика – логарифм фактора удерживания сорбата в подвижных фазах с $\varphi = 0$. Однако в широком диапазоне составов подвижных фаз экспериментальные данные лучше описываются квадратичным уравнением [260]:

$$\lg k(i) = a_0 - a_1 \cdot \varphi(OM) + a_2 \cdot \varphi^2(OM) \quad (3.3)$$

Рассмотрим уравнение Мураками, в котором в некотором диапазоне составов подвижных фаз удерживание вещества зависит от концентрации ацетонитрила по уравнению (3.4), где коэффициент перед логарифмом молярной концентрации (n) рассматривается как количество молей ацетонитрила, вытесняемого при сорбции этого вещества:

$$\lg k(i) = a_i - n(i) \cdot \lg c(OM) \quad (3.4)$$

Такое же уравнение описывает удерживание и вещества, принимаемого в качестве вещества сравнения:

$$\lg k(rep) = a_{rep} - n(rep) \cdot \lg c(OM) \quad (3.5)$$

Исключая концентрацию CH_3CN из уравнений (3.4) и (3.5), получаем уравнение относительного удерживания:

$$\lg k(i) = \frac{n(i)}{n(rep)} \cdot \lg k(rep) + a_i - \frac{n(i)-n(rep)}{n(rep)} \cdot a_{rep}, \quad (3.6)$$

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg k(rep) \quad (3.7)$$

В уравнение (3.7) коэффициент a равен соотношению количества моль органического модификатора, вытесняемого при сорбции веществ. И, хотя величины чисел высвобождения молекул органического модификатора не постоянны во всем диапазоне составов подвижных фаз, их соотношение, a , как показывает эксперимент, остается постоянным в широком диапазоне составов.

Обработка экспериментальных данных по уравнению (3.3) позволяет построить первый тип карт разделения для данной стационарной фазы и выбранной элюентной системы. Так, например, для четырех антоцианов – 3-глюкозидов и 3-рутинозидов (рамнозилглюкозидов) дельфинидина и цианидина (Dp3G, Dp3R, Cy3G и Cy3R) плодов черной смородины такая карта разделения представлена на рис. 3.1 (приложение А, табл. А.1).

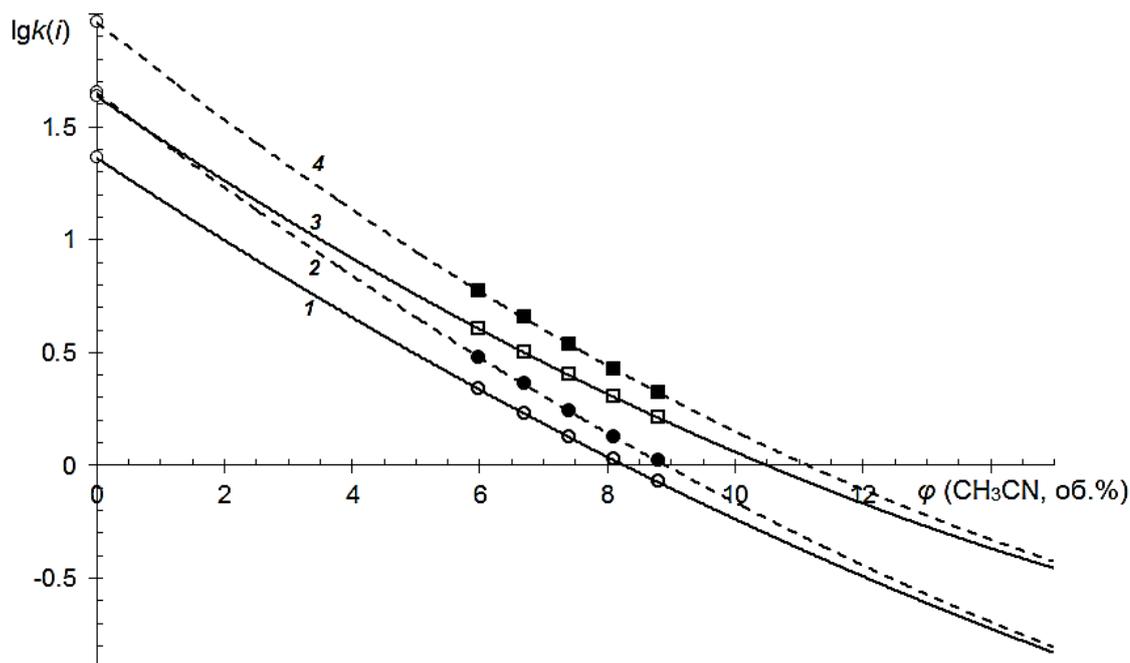


Рисунок 3.1 – Карта разделения первого типа, основанная на уравнении (3)
 Вещества: 1 – Dp3Glu; 2 – Dp3Rut; 3 – Cy3Glu; 4 – Cy3Rut. Элюентная система «CH₃CN–
 10 об.% HCOOH–вода», 40°C.

Важное свойство этого способа анализа удерживания состоит в том, что предполагается возможность экстраполяции удерживания сорбатов на $\varphi = 0$ в подвижной фазе. Впрочем, получаемые при этом параметры весьма условны, и не могут быть проверены экспериментально, поскольку при малых содержаниях органического модификатора многие стационарные C18 фазы подвержены коллапсу фаз [261]. Следовательно, строгая экспериментальная проверка корректности экстраполяционных результатов далеко не всегда возможна. Тем не менее, эти значения уже не зависят от концентрации и типа органического модификатора, т.е. зависят только от свойств самой стационарной фазы. Поэтому информационно важный порядок удерживания группы сорбатов, зависящий только от взаимодействия сорбата со стационарной фазой (из водного раствора кислотного модификатора) необходимо строить по экстраполяционным логарифмам удерживания именно при отсутствии органического модификатора в подвижной фазе. В нашем случае:

$$t_{R(Dp3G)_{aq}} < t_{R(Cy3G)_{aq}} < t_{R(Dp3R)_{aq}} < t_{R(Cy3R)_{aq}}$$

Именно этот порядок следует использовать для сопоставления свойств различных стационарных фаз относительно выбранных сорбатов. При этом тип элюентной системы, т.е. выбор органического модификатора при получении исходных данных, уже не имеет значения.

Изменение указанного порядка в подвижных фазах, содержащих органический модификатор (например, ацетонитрил), зависит от энергии взаимодействия этого растворителя и с сорбатом, и с подвижной фазой, которая также насыщается органическим модификатором подвижной фазы. При добавках ацетонитрила в подвижную фазу падение удерживания обоих 3-рутинозидов происходит быстрее, чем 3-глюкозидов, поэтому порядок элюирования быстро изменяется на другой:

$$t_{R(Dp3G)_i} < t_{R(Dp3R)_i} < t_{R(Cy3G)_i} < t_{R(Cy3R)_i}.$$

Именно такой порядок элюирования данных четырех сорбатов наблюдается в обычных составах подвижных фаз практически во всех опубликованных работах по разделению антоцианов плодов черной смородины в реально используемых составах подвижных фаз [262-267].

В общем случае изменений порядков элюирования некоторых пар веществ из исследуемого набора может быть несколько, но для определения каждого сорбата необходимо и достаточно указать только стартовый порядок и зависимость удерживания каждого компонента от состава подвижной фазы при заданной температуре. Для учета влияния органического модификатора подвижной фазы на удерживание сорбатов квадратичная зависимость по уравнению (3.3) неудобна. Для этого лучше составить карту разделения второго типа – по уравнению (3.7), выбрав некоторое из веществ в качестве реперного (в нашем случае можно выбрать Cy3G), рис. 3.2.

Отметим, что при построении карты разделения второго типа можно не обращать внимания на точность приготовления подвижной фазы (включая смену партии растворителя), и для построения карты достаточно использования двух различных составов подвижных фаз, что существенно сокращает затраты времени. На рис. 3.2 кроме точек, построенных по тем же экспериментальным данным, что и при построении карты разделения первого типа, нанесены точки (ромбы в правой верхней части рисунка) с использованием экстраполяционных величин a_0 , найденных по уравнению (3.3). Близость расположения этих точек к прямым линиям трендов по уравнению (3.3), которую можно оценить и по данным, приведенным в табл. А.2 (приложение А), говорит о согласованности двух типов карт разделения.

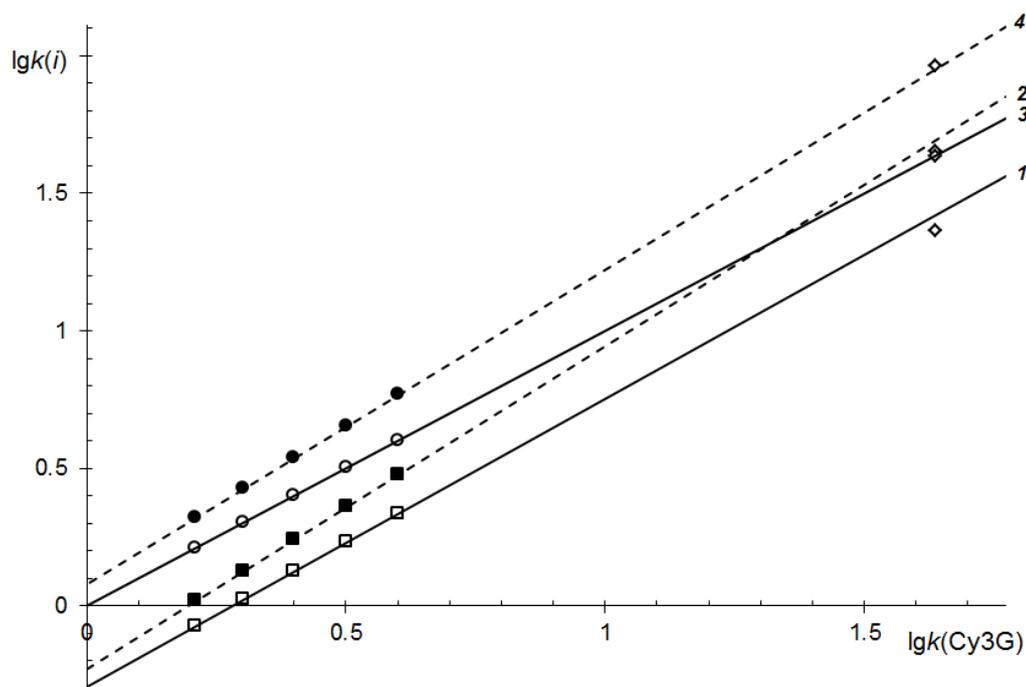


Рисунок 3.2 – Карта разделения второго типа, основанная на уравнении относительного удерживания.

Вещества: 1 – Dp3G; 2 – Dp3R; 3 – Cy3G; 4 – Cy3R. Элюентная система «CH₃CN–10 об.% HCOOH–вода», 40°C.

При этом второй метод позволяет построить еще один вид карты разделения второго типа, применив два различных образца сравнения – Cy3G для Cy3Rut и Dp3G для Dp3Rut, рис. 3.3, в том же диапазоне составов подвижной фазы. Эта карта свидетельствует о том, что изменение удерживания 3-глюкозидов при переходе к 3-рутинозидам (присоединением рамнозильного радикала к существующему глюкозидному) для двух антоцианидинов (дельфинидина и цианидина) описывается близкими зависимостями, что важно при идентификации пиков на хроматограммах при ограниченном наборе стандартных соединений.

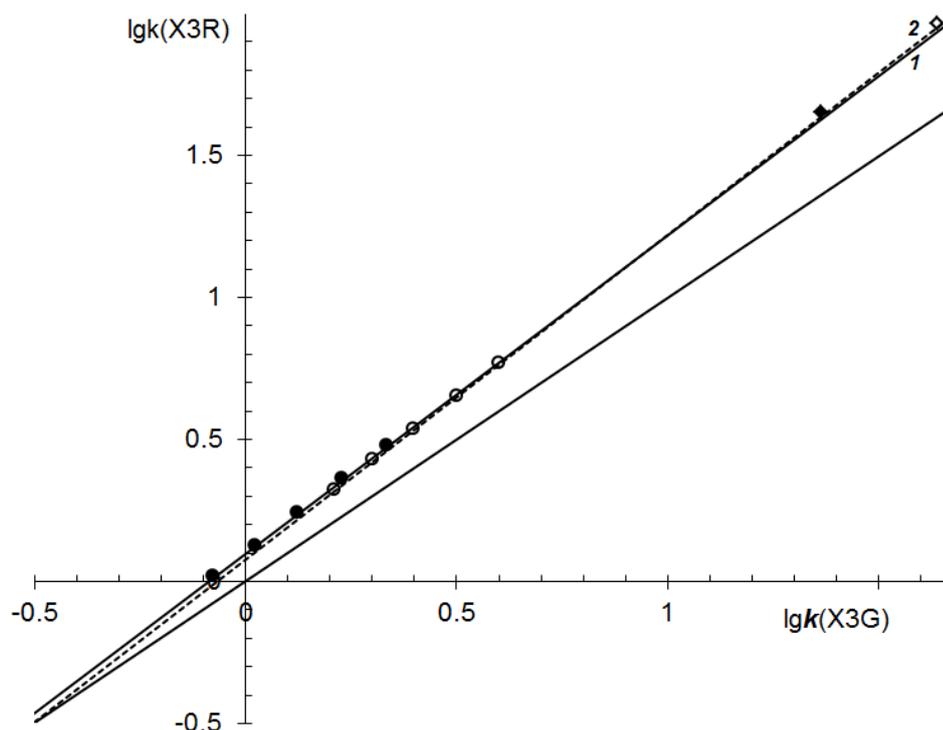


Рисунок 3.3 – Зависимость удерживания 3-рутинозидов от удерживания 3-глюкозидов дельфинидина и цианидина для элюентной системы « CH_3CN –10 об.% HCOOH –вода».

Линии трендов для 1 – Dp3R vs Dp3G , 2 – Cy3R vs Cy3G .

Более того, для одного и того же состава подвижной фазы и одной и той же стационарной фазы зависимость удерживания 3-рутинозидов от удерживания 3-глюкозидов пяти антоцианидинов также описывается прямолинейной зависимостью [267]. Наконец, известен еще один вариант использования сравнительных диаграмм для хроматограмм, записанных при одном и том же составе подвижных фаз, как прямой перенос метода сходственных рядов, предложенного М.Х. Карапетьянцем на удерживание однотипных производных различных основ, например, антоцианидинов [269].

Применим предложенные карты разделения для сопоставления удерживания изомерных 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов (дельфинидина, цианидина, петинидина, пеларгонидина, пеонидина и мальвидина) в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Разделение этих антоцианов на колонке Symmetry™ C18 в двух элюентных системах – на основе традиционного ацетонитрила и при его замене на «зеленый» (т.е. экологически более благоприятный) ацетон при подкислении подвижных фаз муравьиной кислотой (10 об. %), представлено на рис. 3.4.

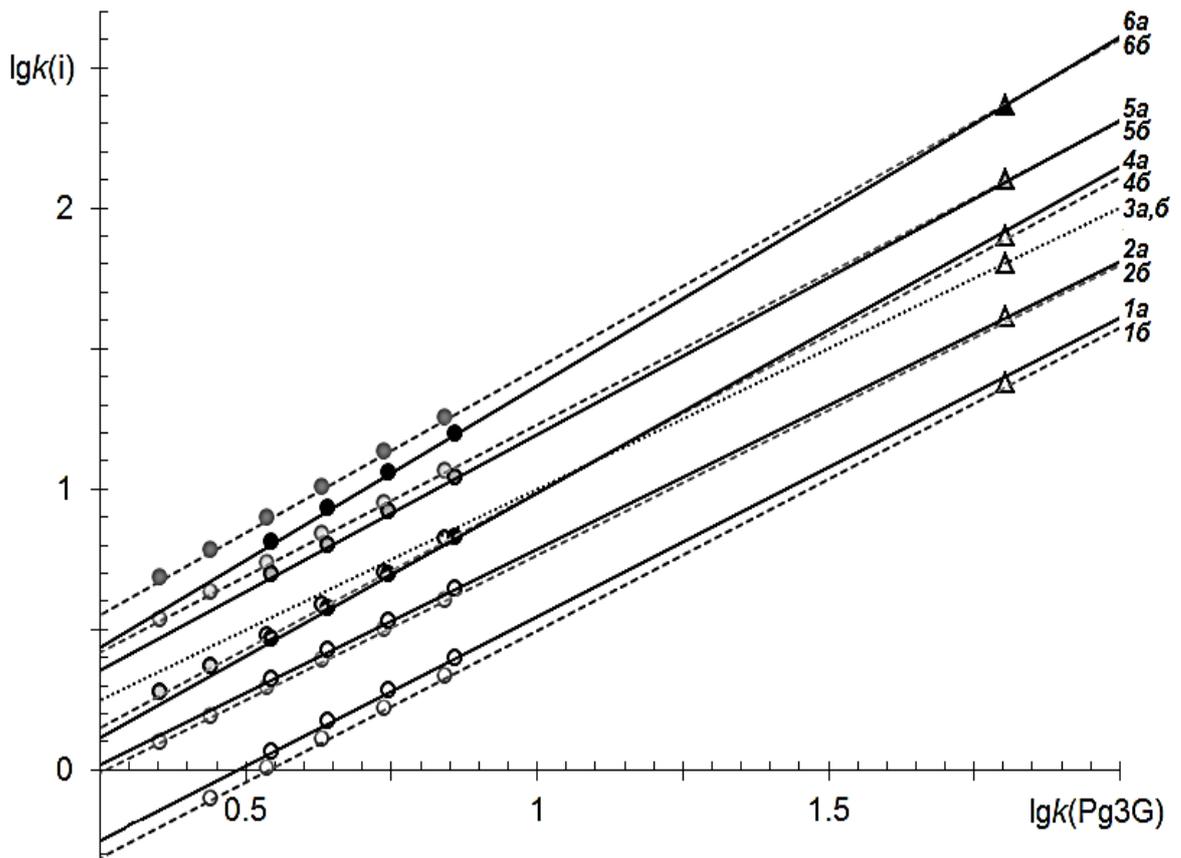


Рисунок 3.4 – Карта разделения второго типа для 3-глюкозидов основных природных антоцианидинов в двух элюентных системах - « CH_3COCH_3 -10 об.% HCOOH -вода» с индексами *a*, и « CH_3CN -10 об.% HCOOH -вода» с индексами *б*.

1 – Dp3G; 2 – Cy3G; 3 – Pg3G; 4 – Pt3G; 5 – Pn3G; 6 – Mv3G.

Линии трендов на данном рисунке для одинаковых антоцианов в разных элюентных системах имеют тенденцию к пересечению в правой части карты разделения. При этом линии для мальвидина и пеонидина пересекаются в точках с одной и той же абсциссой, что можно интерпретировать как достижение составов с нулевым содержанием органического модификатора. Для этих веществ (включая Pg3G) координаты точек пересечения совпадают с точками, полученными по уравнению (3.2) в элюентах систем «ацетон-10 об.% муравьиной кислоты-вода» и «ацетонитрил-10 об.% муравьиной кислоты-вода», как предполагалось выше. Расхождение между координатами для других антоцианов, вероятно, связано со способностью ацетона (в отличие от ацетонитрила) выступать в качестве донора при образовании водородной связи, поскольку при переходах от пеларгонидин-3-глюкозида к 3-глюкозидам петунидина, цианидина и дельфинидина увеличивается число гидроксильных групп в структуре агликона. Соответственно, в обеих элюентных системах порядок прочности взаимодействия антоцианов с С18-фазой одинаков для обеих элюентных систем при нулевом содержании органического модификатора:

$$t_{R(Dp3G)_{aq}} < t_{R(Cy3G)_{aq}} < t_{R(Pg3G)_{aq}} < t_{R(Pt3G)_{aq}} < t_{R(Pn3G)_{aq}} < t_{R(Mv3G)_{aq}},$$

и этот порядок в реальных составах подвижных фаз включает только одну инверсию:

$$t_{R(Dp3G)} < t_{R(Cy3G)} < t_{R(Pt3G)} < t_{R(Pg3G)} < t_{R(Pn3G)} < t_{R(Mv3G)}.$$

Наконец, при экстраполировании удерживания антоцианов на подвижные фазы с большой элюирующей силой (перемещаясь влево на карте разделения) антоцианы группируются по числу ОН-групп в агликоне и в элюентах на основе ацетона, рис. 3.5, и в элюентах на основе ацетонитрила [270].

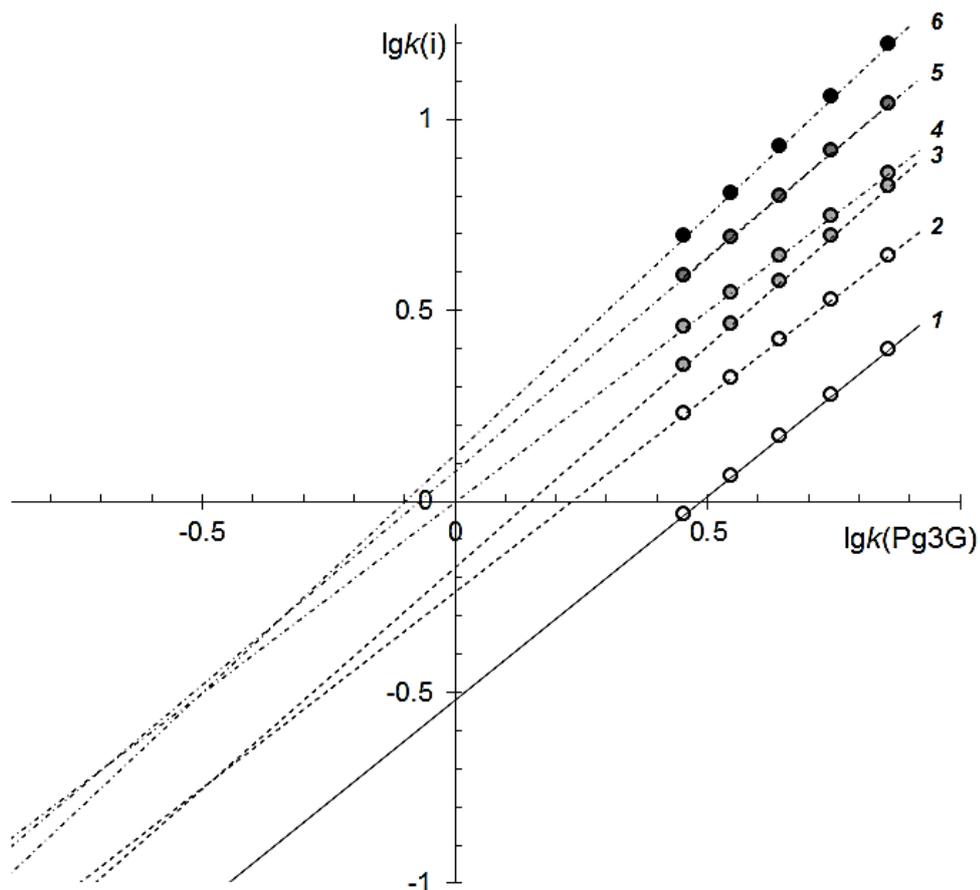


Рисунок 3.5 – Группировка линий трендов по числу гидроксильных групп в структуре антоцианов.

Элюентная система - « CH_3COCH_3 –10 об.% HCOOH –вода». Нумерация сорбатов как на рис. 3.4.

3.2. Замена органического модификатора

3.2.1 Замена органического модификатора при определении антоцианов с муравьиной кислотой в качестве подкислителя

Замена ацетонитрила на метанол может сопровождаться реакцией этерификации с муравьиной кислотой, что косвенно подтвердилось уже в первых опытах. При выводе хроматографической системы в режим в элюенте, содержащем 12 об. % метанола и 10 об.% муравьиной кислоты в воде, дождаться прекращения дрейфа времен удерживания не удалось даже за 3 ч, рис. 3.6, хотя обычно для стабилизации удерживания антоцианов достаточно 20–30 мин.

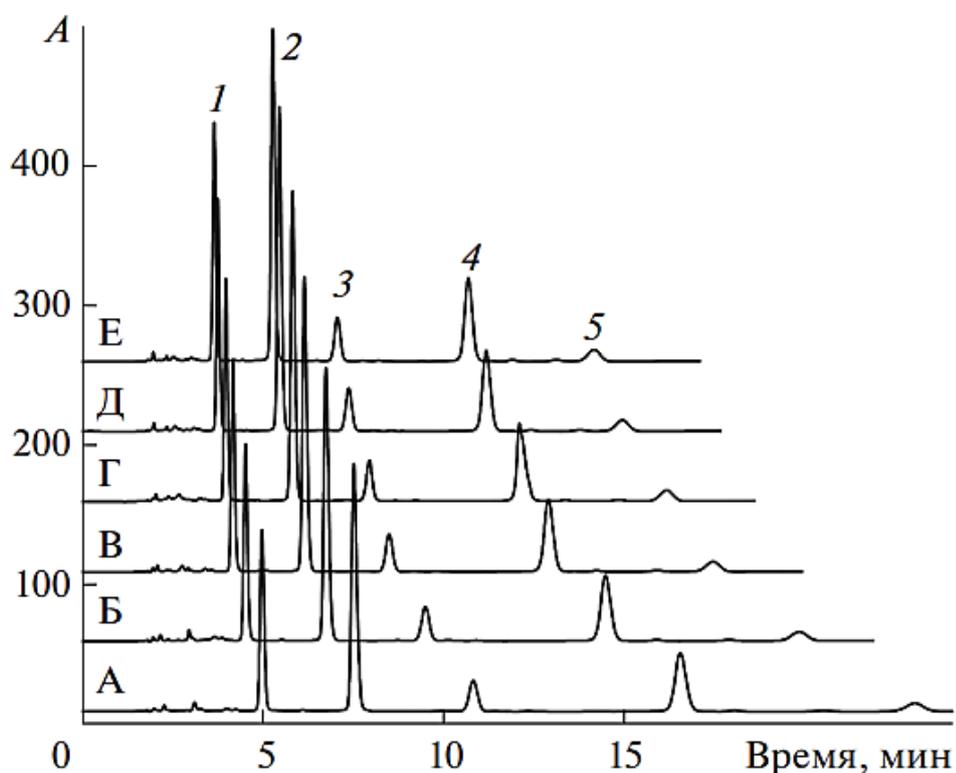


Рисунок 3.6 – Дрейф удерживания антоцианов в подвижной фазе $\text{CH}_3\text{OH}-\text{HCOOH}-\text{H}_2\text{O}$ (12 : 10 : 78, по объему). Интервал между вводом проб А–Е 25–30 мин. Антоцианы: 1 – Dp3G; 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pn3G; 5 – Mv3G. Колонка 4.6×150 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Температура 40°C , скорость подачи подвижной фазы 0.8 мл/мин.

При этом наблюдается предсказанное выше уменьшение времен удерживания всех компонентов пробы. Используемая в ряде работ уменьшенная концентрация муравьиной кислоты (менее 10 об. %) также приводит к дрейфу времен удерживания, но более медленному, рис. 3.7.

Стоит отметить, что в литературе не обнаружены указания на дрейф времен удерживания при работе с подобными смесями в составах подвижных фаз. Решение проблемы – смешивание двух растворов, один из которых содержит кроме воды только метанол, а второй представляет собой раствор муравьиной кислоты в воде. Такой подход использовали в некоторых работах по определению антоцианов в градиентных режимах [79, 86].

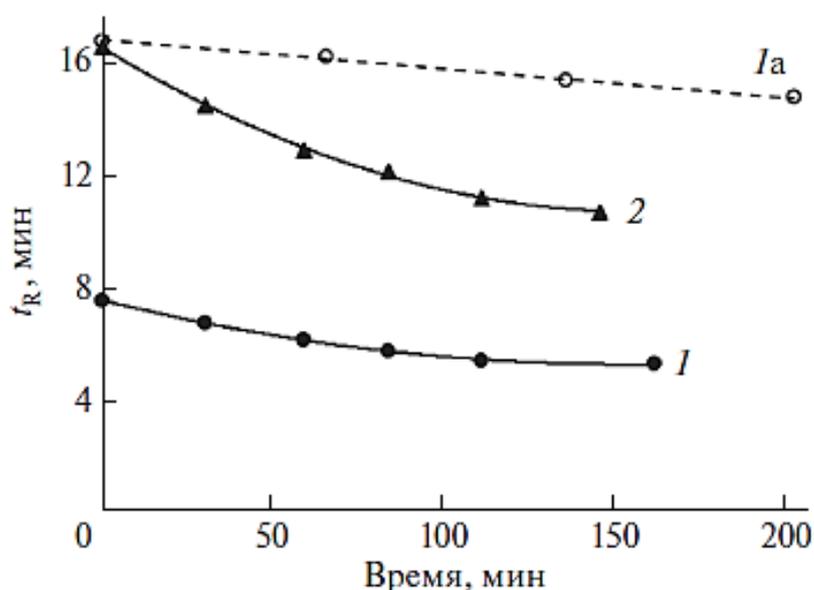


Рисунок 3.7 – Дрейф удерживания антоцианов в системе «CH₃OH–НСООН–Н₂O».

Интервал между вводом проб А–Е 25–30 мин. Антоцианы: 1 и 1a – Су3G; 2 – Рn3G.

Подвижные фазы для 1 и 2 – 12% CH₃OH и 10% НСООН в воде; для 1a – 13% CH₃OH и 5% НСООН в воде.

Нами экспериментально установлено, что указанный прием позволяет вывести хроматографическую систему в стационарный режим за обычное время (20–30 мин), но, к сожалению, одноканальные изократические насосы в этом случае становятся непригодными. Именно этот способ использовали в дальнейшем при исследовании возможности замены ацетонитрила на метанол.

Для сопоставления разделения 3-глюкозидов пяти из шести основных антоцианидинов при замене ацетонитрила на метанол наиболее эффективным к настоящему времени является метод сравнения карт разделения в варианте относительного удерживания, предложенный в работе [271], рис. 3.8.

Оказалось, что замена ацетонитрила на метанол, как на компонент с большей вязкостью, приводит к небольшому росту давления (лишь на 10–15%) для использованных в работе составов подвижных фаз. При этом происходит более

компактное элюирование в неизменном для обоих органических модификаторов подвижной фазы порядке:

$$t_R(\text{Dp3G}) < t_R(\text{Cy3G}) < t_R(\text{Pt3G}) < t_R(\text{Pn3G}) < t_R(\text{Mv3G})$$

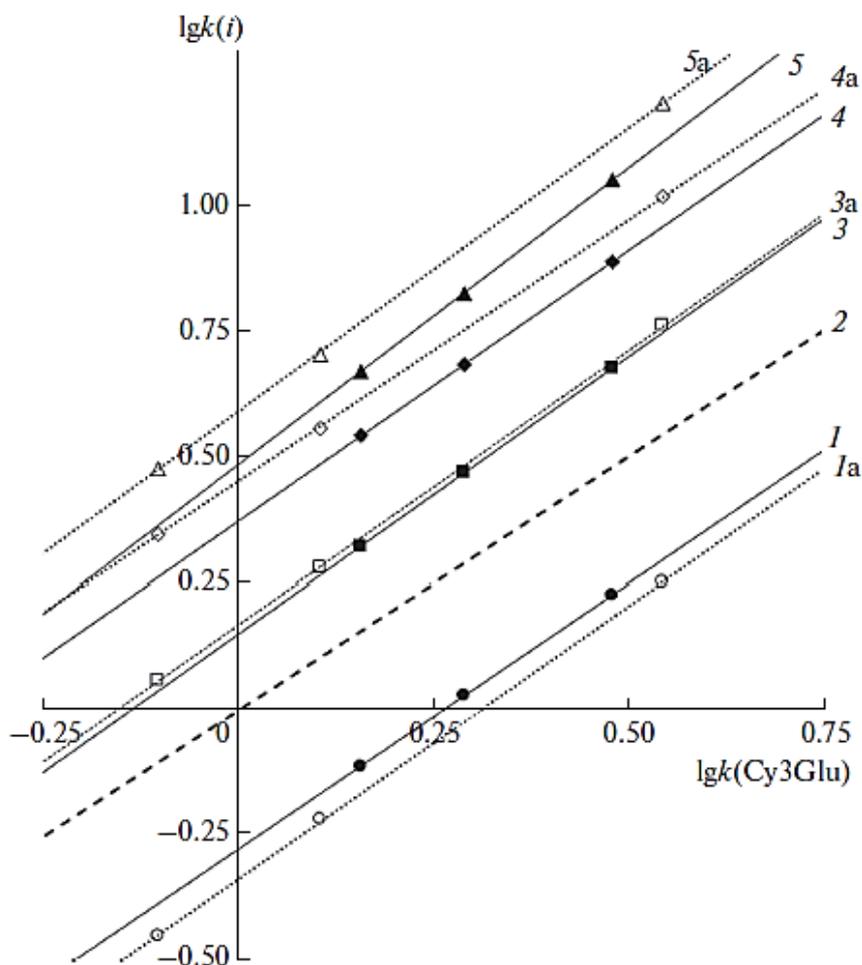


Рисунок 3.8 – Карта разделения антоцианов для системы подвижных фаз I: метанол–10 об. % муравьиной кислоты–вода в сравнении с картой разделения антоцианов для системы II: ацетонитрил–10 об. % муравьиной кислоты–вода. Пунктирными линиями и цифрой с буквой «а» обозначено относительное удерживание в системе II. Антоцианы: 1 – Dp3G; 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pn3G и 5 – Mv3G.

Такая компактность может быть использована для сокращения времени, необходимого для разделения всех или некоторых компонентов природных смесей антоцианов, когда нет смысла в увеличении времени элюирования наиболее сильно удерживающегося компонента.

Добавка OH-группы в кольцо В при переходе от Cy3G к Dp3G приводит при применении обоих типов органических модификаторов подвижной фазы к логичному уменьшению удерживания вследствие возрастания относительной гидрофильности

сорбата. Поэтому линии трендов на карте разделения для Dp3G располагаются ниже линии тренда для Cy3G. Однако этот рост гидрофильности для подвижных фаз на основе метанола оказывается несколько меньшим, чем в случае подвижных фаз на основе ацетонитрила. При добавлении метоксигрупп линии тренда всегда располагаются выше, что можно интерпретировать как рост липофильности антоцианов. При этом линии трендов для Mv3G и Pn3G для подвижных фаз, содержащих метанол, располагаются ниже аналогичных линий трендов для подвижных фаз на основе ацетонитрила. Эти два фактора и приводят к уменьшению диапазона времен удерживания 3-глюкозидов (а, следовательно, и любых других однотипных гликозидов) пяти из шести основных природных антоцианидинов.

Строгое объяснение найденных изменений для одного состава подвижной фазы проблематично, поскольку в действительности каждый сорбат имеет свой баланс гидрофильных и гидрофобных свойств, т.е. его удерживание должно описываться минимум двухпараметрическим уравнением:

$$\lg k(i) = a_0 + a_1 \cdot \lg(Cy\ 3G), \quad (3.8)$$

где логарифм фактора удерживания сорбата i сопоставляется с логарифмом фактора удерживания сорбата, выбранного в качестве вещества сравнения (Cy3G).

В этом уравнении параметр a_1 может рассматриваться как относительная характеристика липофильности сорбата (по отношению к веществу сравнения). Параметр a_0 не является однозначной характеристикой гидрофильности, для ее уточнения необходимо определить абсциссы точек конвергенции [272]. Однако в случае антоцианов гомологи, необходимые для нахождения координат таких точек, отсутствуют. Впрочем, сопоставляя наклоны линий трендов на рис. 3.8, можно установить, что на самом деле относительная липофильность антоцианов при добавлении метоксигрупп возрастает сильнее в случае подвижных фаз с метанолом.

Для линий трендов на рис. 3.8 существует еще одна полезная для подтверждения их корректности особенность. Так, при аппроксимации вправо, т.е. на большие времена удерживания (или на малые содержания метанола или ацетонитрила) линии для одного и того же вещества должны пересекаться в точке, при которой концентрация органического модификатора (кроме муравьиной кислоты) обращается в ноль. И действительно, анализируя уравнения относительного удерживания, находим, что абсциссы точек пересечения для пар линий трендов для веществ Dp3G, Pn3G и Mv3G близки друг к другу: 1.99, 2.09 и 2.02, что удовлетворительно для линий, построенных только по трем экспериментальным точкам для каждой из зависимостей.

При исследовании влияния замены ацетонитрила на метанол на разделение различных типов гликозидов одного и того же антоцианидина (цианидина) линии трендов для одних и тех же соединений были близки (приложение А, табл. А.3).

При этом наклон линии тренда для дигликозидов примерно на 0.1 больше, чем для 3-моноголикозида цианидина, с заметным ростом для 3-рутинозида вследствие появления в углеводном заместителе метильной группы; для 3-тригликозидов наклон возрастает еще на 0.15, как и при использовании в качестве модификатора ацетонитрила.

Таким образом, замена растворителя практически не приводит к изменению в разделении антоцианов при усложнении строения углеводного заместителя, а параметр a_1 , как и при использовании ацетонитрила [273], остается уникальным индикатором числа моноз в углеводном заместителе, что удобно при предварительной идентификации антоцианов без использования масс-спектрометрического детектирования.

Сопоставление эффективности. Для исследования эффективности хроматографических систем обычно используют анализ экспериментальных данных по динамическому подходу по уравнению Ван Деемтера [274]. Такой анализ в нашем случае позволил установить, что минимальная высота теоретической тарелки достигается при нерационально малой скорости подачи подвижной фазы (менее 0.20 мл/мин), рис. 3.9.

В связи с этим для хроматографирования необходимо находить компромисс между степенью разделения (R_s) и временем хроматографирования, т.е. степень разделения может быть при необходимости увеличена за счет снижения скорости подачи подвижной фазы. Анализ данных рис. 3.9 показывает, что эффективность хроматографических систем даже немного увеличивается при замене ацетонитрила на метанол.

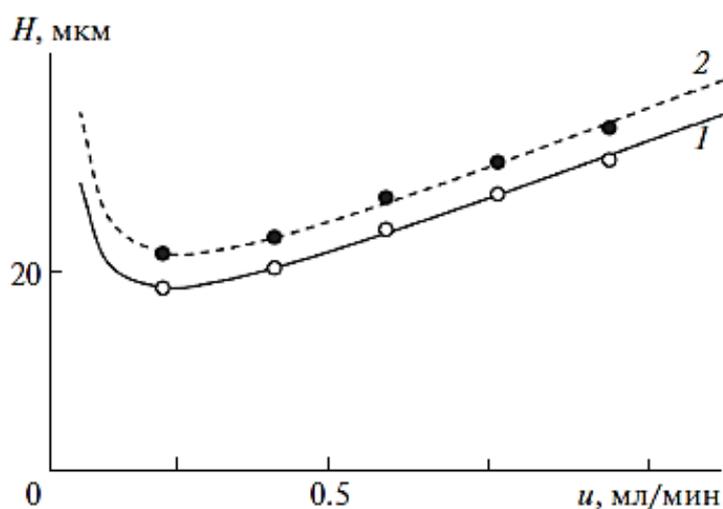


Рисунок 3.9 – График Ван Деемтера для Су3G в двух подвижных фазах.

Подвижные фазы: 1 – 16 об. % CH_3OH и 10 об. % HCOOH в воде; 2 – 8.8 об. % CH_3CN и 10 об. % HCOOH в воде.

Определение антоцианов плодов клюквы. Относительную долю различных видов антоцианов в экстракте плодов клюквы можно определить при одной длине волны без введения поправок [275]. Это объясняется тем, что электронные спектры поглощения всех шести основных 3-гликозидов практически не различаются. Разделение антоцианов плодов клюквы иллюстрирует рис. 3.10, а в табл. А.4 (приложение А) приведены результаты определения антоцианов и их изменение по мере созревания клюквы.

Кроме шести основных антоцианов, которые были обнаружены в целом ряде работ [276–280], на хроматограмме заметны также несколько минорных компонентов, доля которых в сумме антоцианов по площадям пиков не превышает 3–5%. Строение этих антоцианов в настоящей работе не определяли, но по анализу параметров линий трендов можно предположить, что они (кроме компонента *a* на рис. 3.10) являются моногликозидами цианидина, при этом их ацилирование некоторыми алифатическими кислотами не исключено.

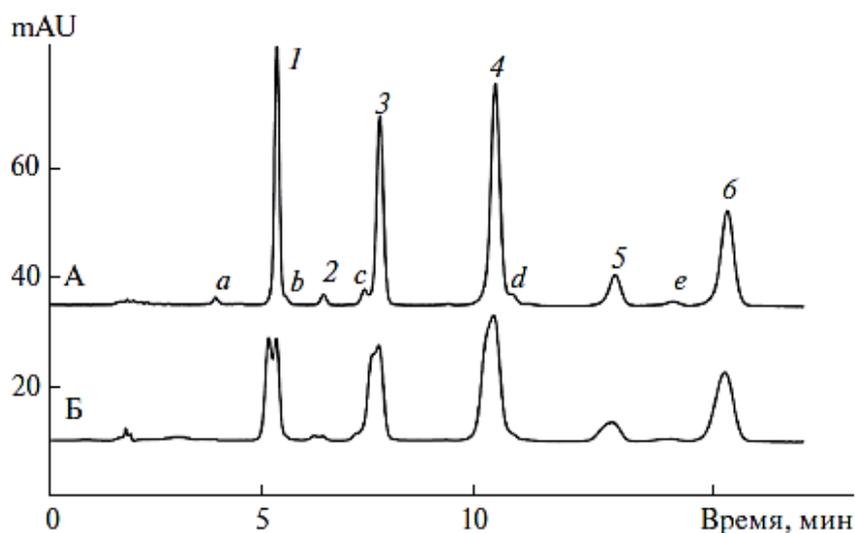


Рисунок 3.10 – Разделение антоцианов плодов клюквы красной окраски в подвижной фазе 15 об. % CH_3OH и 10 об. % HCOOH в воде. Растворители проб – смеси метанола, муравьиной кислоты и воды в соотношениях: А – 20 : 10 : 70; Б – 50 : 10 : 40 по объему. Детектирование при 215 нм. Соединения: 1 – Cy3Gala ; 2 – Cy3G ; 3 – Cy3Ara ; 4 – Pn3Gala ; 5 – Pn3G ; 6 – Pn3Ara ; a, b, c, d, e – не идентифицированы.

Ацилирование алифатическими кислотами (по нашему опыту) мало сказывается на наклоне линий трендов, но удерживание при этом сильно зависит от положения ацилирования углеводного заместителя. Учитывая, что при пробоподготовке и хранении пробы не исключено ацилирование антоцианов муравьиной кислотой, исследовали вариант, при котором пробу готовили, заменив муравьиную кислоту ортофосфорной. Оказалось, что такая замена (подробнее в п. 3.2.2) никак не сказывается на виде

хроматограммы, т.е. минорные пики являются не артефактами, а следствием особенностей биосинтеза антоцианов в плодах клюквы. Однако по мере созревания плодов (или в зависимости от интенсивности окраски, рис. 3.11) наблюдаются изменения в антоциановом составе. Особенно заметен рост относительной доли Су3G и Pn3G, (приложение А, табл. А.4).

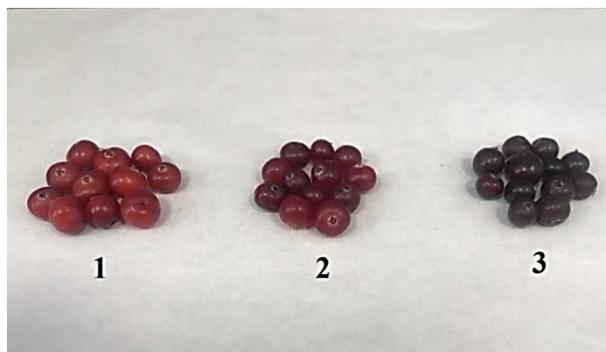


Рисунок 3.11 – Ягоды клюквы по интенсивности окраски

В одной из работ по ВЭЖХ антоцианов, выполненных в нашей лаборатории [281], показано, что при неверной пробоподготовке возможно появление на хроматограмме артефактных пиков. Они могут возникать при растворении пробы в растворителе, обладающем более высокой элюирующей способностью по сравнению с используемой подвижной фазой. При применении метанола оценка влияния состава растворителя на качество получаемой хроматограммы особенно важна, поскольку в литературе имеется немало публикаций, в которых рекомендуют в конце пробоподготовки растворять пробу в метаноле для последующего хроматографирования.

Были приготовлены пробы, растворенные в растворителях на основе метанола (с 10 об. % муравьиной кислоты) с одинаковой концентрацией антоцианов, но различной концентрацией метанола (от 10 до 50 об. %). При последующем хроматографировании установлено, что даже при концентрации метанола в пробе на уровне 50% происходит раздвоение пиков антоцианов с меньшими временами удерживания и существенное уширение пиков антоцианов с большими временами удерживания (рис. 3.10 б). Артефакты отсутствовали только при растворении пробы в смеси, приближенной по составу к используемой подвижной фазе; при этом условно допустимо изменение концентрации метанола лишь на $\pm 50\%$. Поэтому не удивительно, что в работе [282], в которой хроматографировали пробу, растворенную в метаноле, на хроматограмме появляются раздвоенные пики веществ с наименьшими временами удерживания.

Замена ацетонитрила на ацетон. Среди растворителей, не чувствительных к присутствию большой концентрации муравьиной кислоты в составе подвижной фазы

можно выделить ацетон (надеясь на отсутствие альдольной или кротоновой конденсации ацетона в присутствии большой концентрации воды). Результат использования ацетона вместо ацетонитрила представлен ниже.

Порядок удерживания при разделении антоцианов в системе «ацетон–муравьиная кислота–вода» при нулевом содержании ацетона для 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов увеличивается в ряду, рис. 3.12:

$$t_R(\text{Dp3G}) < t_R(\text{Cy3Glu}) < t_R(\text{Pt3G}) < t_R(\text{Pg3G}) < t_R(\text{Pn3G}) < t_R(\text{Mv3G})$$

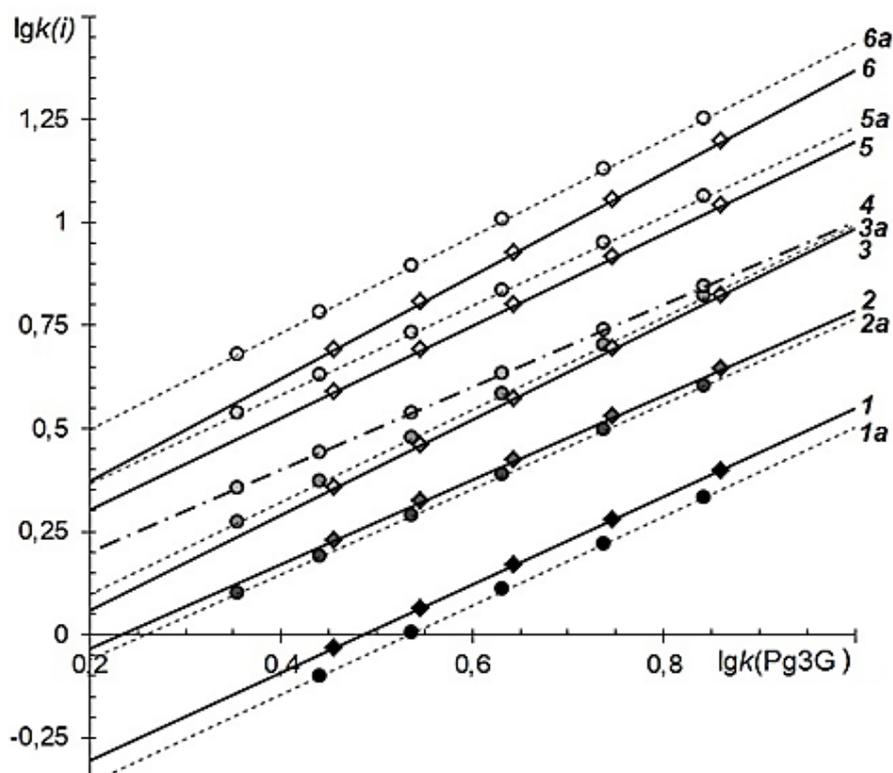


Рисунок 3.12 – Карты разделения антоцианов для системы подвижных фаз I: ацетонитрил–10 об. % муравьиной кислоты–вода в сравнении с картой разделения антоцианов для системы II: ацетон–10 об. % муравьиной кислоты–вода. Пунктирными линиями и цифрой с буквой «а» обозначено относительное удерживание в системе I. Антоцианы: 1 – Dp3G, 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pg3G; 5 – Pn3G и 6 – Mv3G.

При увеличении концентрации ацетона данный порядок меняется на другой, а именно происходит инверсия времен удерживания Pt3G и Pg3G. А анализ карты разделения шести основных антоцианов, с линиями трендов, экстраполированными на большие концентрации ацетонитрила в ПФ, рис. 3.12, указывает на сближение линий трендов по числу гидроксильных групп в структуре агликона. Параметры квадратичной зависимости для шести основных антоцианов указаны в табл. А.5 (приложение А).

При замене ацетонитрила на ацетон увеличение роста числа ОН-групп приводит к тому, что относительное удерживание возрастает сильнее, а при добавлении ОСН₃-групп относительное удерживание уменьшается сильнее, чем при замене на метанол. При переходе от P_g3G к C_y3G (добавлении ОН-группы в кольцо В) наклон линий трендов возрастает на 0.032, а при переходе к D_p3G этот показатель возрастает еще больше (на 0.088), что объясняется увеличением числа дисперсионных взаимодействий. При переходе от P_n3G к M_v3G с увеличением ОСН₃-групп наклон также возрастает (с 1.08 до 1.171), табл. А.6 (приложение А).

Линии тренда на карте разделения, рис. 3.12, для D_p3G, C_y3G, P_t3G расположены выше относительно линий тренда, построенных в системе «ацетонитрил-муравьиная кислота- вода», а для P_n3G и M_v3G – ниже, что приводит к более компактному элюированию – диапазон времен удерживания уменьшается.

На рис. 3.13 справа отмечены точки, которые были получены путем экстраполяции параметра a_0 по уравнению (3.3). Данные точки практически ложатся на прямые, полученные по первому уравнению.

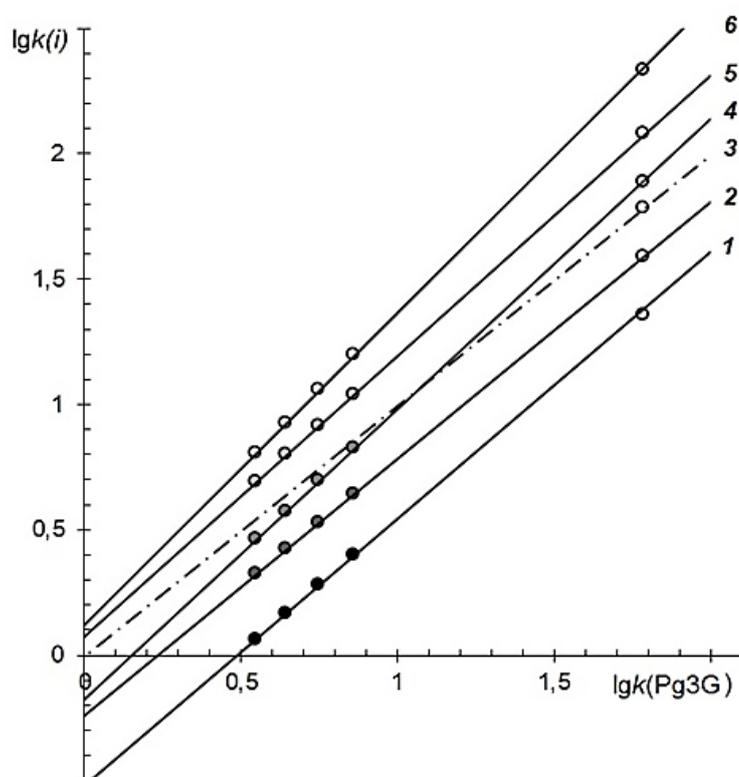


Рисунок 3.13 - Карта разделения антоцианов в элюентной системе «ацетон– муравьиная кислота–вода» с экстраполяционными точками. Антоцианы: 1 – D_p3G, 2 – C_y3G; 3 – P_t3G; 4 – P_g3G; 5 – P_n3G и 6 – M_v3G.

Для анализа влияния строения гликозидного радикала на удерживание антоцианов выбрано 6 производных цианидина – один 3-моноголикозид (Cy3G), три 3-дигликозида: 3-софорозид (Cy3Sopho); 3-самбубиозид (Cy3Sam) и 3-рутинозид (Cy3Rut) и два 3-тригликозида: 3-(2"-глюкозилрутинозид) (Cy3GR) и 3-(2"-ксилозилрутинозид) (Cy3XRut).

При исследовании влияния замены ацетонитрила на ацетон на разделение различных типов гликозидов одного и того же антоцианидина (цианидина) линии трендов для одних и тех же соединений были близки, табл. А.7 (приложение А).

Если в случае замены ацетонитрила на метанол наблюдался заметный рост параметра a_0 для 3-рутинозида, то в случае замены на ацетон происходит небольшое снижение. Для остальных 3-ди- и 3-тригликозидов сохраняются те же тенденции, а именно увеличение наклонов линий тренда, как и в случае использования в качестве органического модификатора метанола.

Таким образом, замена растворителя практически не приводит к изменению в разделении антоцианов при усложнении строения углеводного заместителя, а параметр a_1 , как и при использовании ацетонитрила и метанола, также может быть использован индикатором числа моноз в углеводном заместителе.

Замена ацетонитрила на этилацетат. К числу растворителей, которые не должны быть чувствительными к присутствию 10 об. % муравьиной кислоты в подвижной фазе, можно отнести этилацетат. Индексы полярности [283] рассмотренных выше растворителей и этилацетата уменьшаются в ряду:

$$P'_{\text{CH}_3\text{CN}}(5.8) > P'_{\text{acetone}}(5.1) = P'_{\text{CH}_3\text{OH}}(5.1) > P'_{\text{ethyl acetate}}(4.4).$$

Это значит, что в условиях обращенно-фазовой хроматографии при замене ацетонитрила последовательно на ацетон или метанол, а затем на этилацетат удерживание должно снижаться. Однако найденная закономерность отличается от предполагаемой по индексам полярности, рис. 3.14.

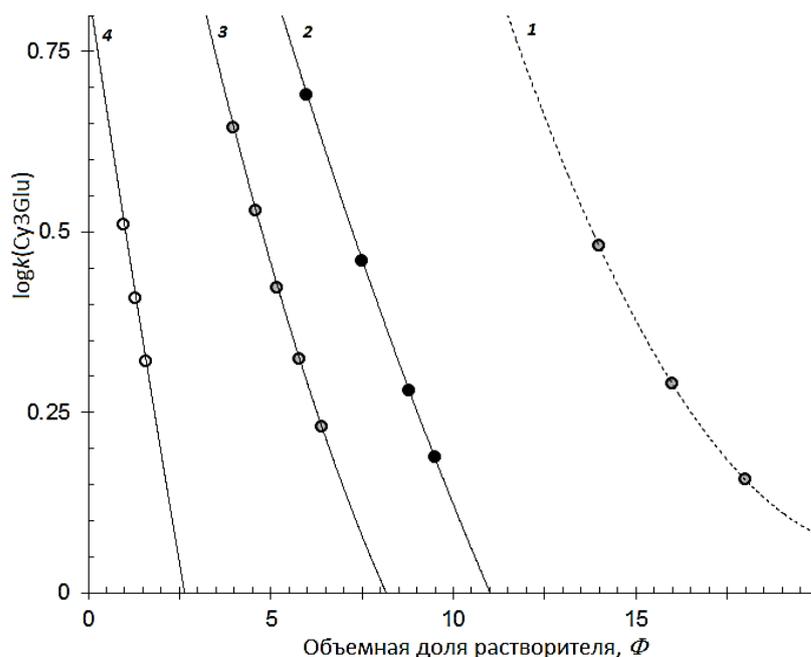


Рисунок 3.14 – Зависимость удерживания Cy3Glu от объемной доли органического модификатора с подвижными фазами, подкисленными HCOOH. Растворители: CH₃OH (1), CH₃CN (2), ацетон (3), этилацетат (4).

Так, метанол оказывается элюентом с меньшей элюирующей силой по сравнению не только с ацетоном, но и с ацетонитрилом.

При этом этилацетат остается самым компонентом с наивысшей элюирующей силой, что создает проблему при его эксплуатации, поскольку для элюирования неацилированных антоцианов с удобными для исследования временами удерживания необходимо использовать крайне малые добавки этого растворителя (от 1 до 2 об.%). А это чревато коллапсом фаз. И действительно, например, при элюировании антоцианов в подвижной фазе, содержащей 1.5 об. % этилацетата и 10 об.% муравьиной кислоты в воде вывести хроматографическую систему в стабильный хроматографический режим не удалось даже за 3.5 ч. Это затрудняет анализ закономерностей удерживания как функции строения агликона или гликозидного заместителя.

Для 3-глюкозидов шести основных природных антоцианидинов карты разделения второго типа представлены на рис. 3.15.

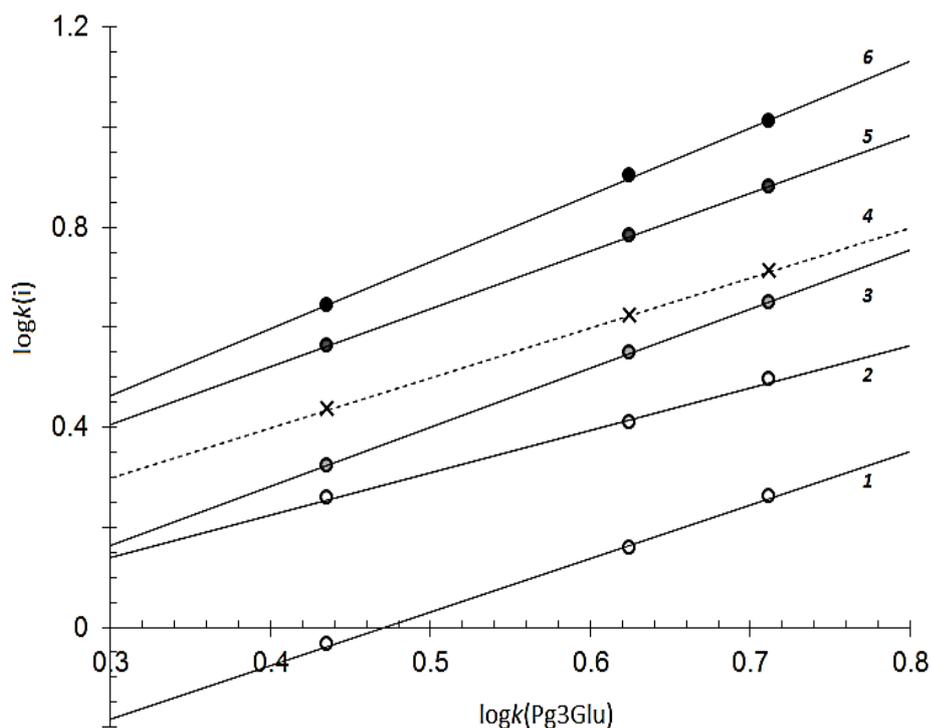


Рисунок 3.15 – Карта разделения антоцианов для системы этилацетат–10 об. % муравьиной кислоты–вода. Антоцианы: 1 – Dp3G, 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pg3G; 5 – Pn3G и 6 – Mv3G.

Данная карта разделения напоминает приведенные выше, но уникальное поведение демонстрирует Cy3G. Это – единственная хроматографическая система, в которой наклон линии тренда для Cy3G (0.848) меньше, чем для вещества сравнения Pg3G с наклоном равным 1. Создается впечатление об особом типе сольватации Cy3G этилацетатом, при котором сорбция на обращенной фазе не приводит к удалению этой молекулы растворителя. Для Dp3G наклон линии тренда такой же, как и для ацетона, а для Mv3G и Pn 3G еще больше, табл. А.8 (приложение А).

Отметим, что возможность разделения набора различных гликозидов цианидина сохраняется, хотя диагностическая роль наклонов линий трендов (как индикатора числа моносахаридов, входящих в один гликозидный радикал) менее надежна, чем в выше рассмотренных элюентных системах, рис. 3.15.

Но наиболее странной особенностью элюентной системы на основе этилацетата остается заметно более высокая эффективность (меньшая ширина) пика Cy3G на хроматограммах экстракта как смеси антоцианов листьев багряника канадского и плодов барбариса, так и экстракта плодов бузины черной, рис. 3.16.

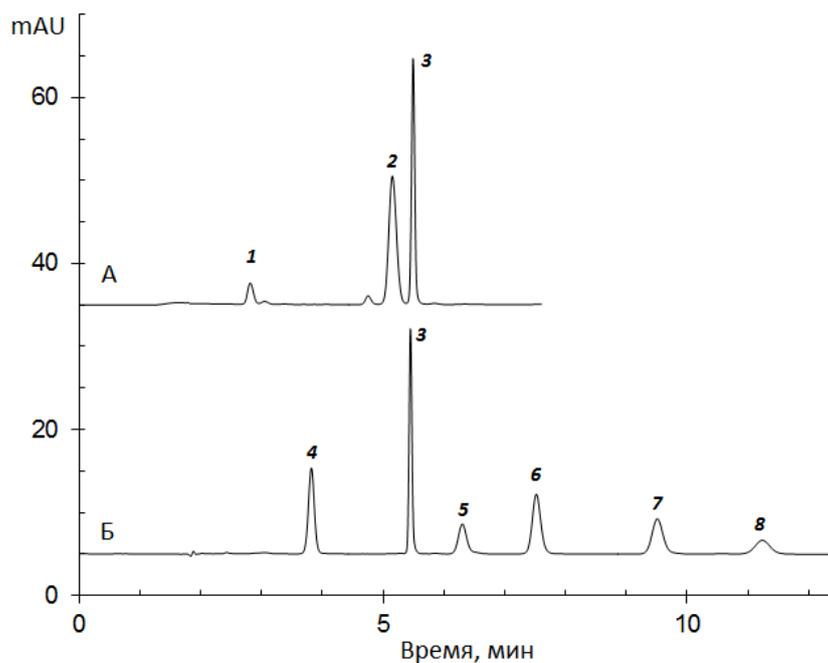


Рисунок 3.16 – Хроматограммы экстрактов плодов бузины черной (А) и смеси экстрактов листьев багрянника канадского и плодов барбариса обыкновенного (Б). Подвижна фаза 1.5 об.% этилацетата и 10 об. % муравьиной кислоты в воде. Антоцианы: 1 – Cy3Rut5G, 2 – Cy3Sam; 3 – Cy3G; 4 – Dp3G; 5 – Pt3G, 6 – Pg3G, 7 – Pn3G, 8 - Mv3G.

Особенную эффективность хроматографической системы в случае Б можно было бы связать с ее взаимодействием с хлорогеновой кислотой, присутствующей в экстракте Б и имеющей почти совпадающие времена удерживания с Cy3G. Но в случае экстракта А никаких заметных в широком диапазоне длин волн сопутствующих экстрактивных веществ мы не обнаружили.

Таким образом, этилацетат не очень удобен в качестве замены ацетонитрила вследствие проблем с выходом хроматографической системы в рабочий режим.

3.2.2 Влияние замены муравьиной кислоты на фосфорную на разделение антоцианов

При использовании ацетонитрила для разделения антоцианов подвижная фаза должна содержать кислоты, из которых чаще всего применяется муравьиная кислота [257]. Потребность в подкислении объясняется тем, что для анализа антоцианов необходим перевод всех форм антоцианов в окрашенную флавилиевую форму, которая позволяет детектировать только антоцианы в присутствии большого количества других экстрактивных веществ, не имеющих окраски. Антоцианы существуют преимущественно в окрашенной флавилиевой форме только при $\text{pH} \leq 1$. При повышении pH доля флавилиевой формы снижается практически до нуля при pH 4,5.

По литературным данным доля муравьиной кислоты в элюенте может достигать 10 об % - значение, при котором рН около 1.5. Высокое содержание муравьиной кислоты, которая, являясь летучей, обладает едким удушливым запахом, а также выше упомянутые характеристики ацетонитрила, указывают на необходимость поиска альтернативы в сторону экологически благоприятных реагентов, что, является важнейшим направлением в так называемой «зеленой хроматографии» [257].

В случае муравьиной кислоты альтернативой может выступать экологически более приемлемая фосфорная кислота. Результаты такой замены и ее влияние на хроматографическое поведение антоцианов представлены в работе [284]. Однако в данной работе вопрос об уширении пиков на хроматограммах детально не рассматривается.

Замена муравьиной кислоты на фосфорную требует увеличения концентрации ацетонитрила для достижения тех же времен удерживания. Так для достижения фактора удерживания равного 3 для Су3G содержание ацетонитрила должно составлять 6.67 и 15.45 об.% для подвижных фаз с муравьиной кислотой и с ортофосфорной, соответственно, рис. 3.17. Это обусловлено тем, что элюирующая способность фосфорной (в отличие от муравьиной) кислоты близка к нулю.

Для оценки влияния замены муравьиной кислоты на ортофосфорную на разделение шести 3-глюкозидов основных антоцианидинов удобно воспользоваться картами разделения, построенными по методу относительного удерживания, рис. 3.17, в которых удерживание антоцианов описывается линейной зависимостью логарифма фактора удерживания относительно вещества сравнения (в данном случае Pg3G):

$$\lg k(i) = a \cdot \lg k(Pg3G) + b \quad (3.9)$$

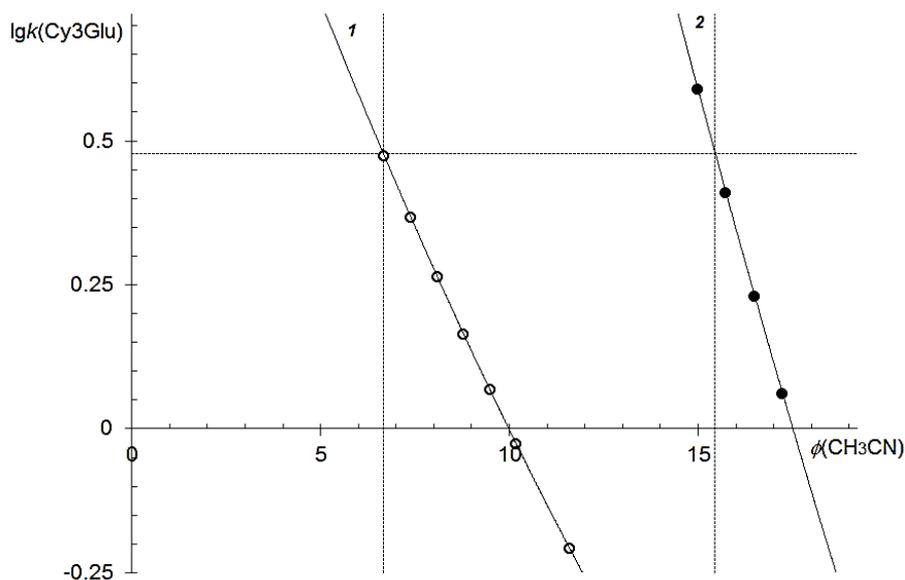


Рисунок 3.17 – Зависимость логарифма фактора удерживания цианидин-3-глюкозида от объемной доли ацетонитрила в подвижных фазах с добавками муравьиной (1) и ортофосфорной (2) кислот.

По представленным на рис. 3.18 данным шесть 3-глюкозидов элюируются в несколько меньшем диапазоне времен удерживания.

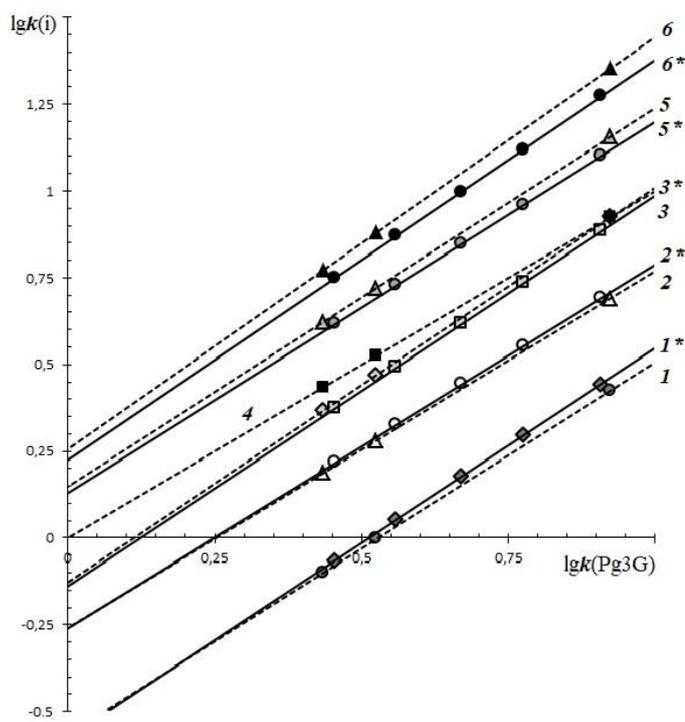


Рисунок 3.18 – Карта разделения 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов в системе «ацетонитрил–муравьиная кислота–вода». Линии тренда для системы «ацетонитрил–фосфорная кислота–вода» обозначены цифрой со звездочкой. Вещества: 1 – Dp3G; 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pg3G; 5 – Pn3G; 6 – Mv3G.

При этом добавление ОН-группы в кольцо В приводит к уменьшению удерживания антоцианов в ОФ ВЭЖХ в следствие роста гидрофильности аналитов. Однако это изменение удерживания в элюентах с фосфорной кислотой меньше, чем в элюентах в сравнении с муравьиной кислотой. В тоже время при добавлении СН₃О-групп удерживание увеличивается благодаря росту липофильности, причем этот рост для подвижных фаз с ортофосфорной кислотой оказывается меньшим, чем в случае с муравьиной кислотой.

Таким образом, разделительная способность подвижной фазы на основе ацетонитрила при замене муравьиной кислоты на фосфорную в относительно небольшой степени снижается, что удобно при разделении антоцианов с одинаковым типом гликозилирования вследствие уменьшения времени, требуемого на единичное хроматографирование.

Эффективность хроматографической системы (по числу теоретических тарелок) при уменьшении концентрации фосфорной кислоты (т.е. с увеличением рН) заметно уменьшается, рис. 3.19 и табл. А.9 (приложение А). Это связано с тем, что удерживание незаряженной полуацетальной формы антоцианов меньше удерживания заряженной флавилиевой формы. В таком случае ширины пиков на половине высоты должны возрастать вследствие двух причин уширения пиков вследствие дисперсии кратности сорбции каждой из форм и вследствие кратности сорбции различных форм.

Следовательно, недостаточное подкисление подвижной фазы приводит к нежелательному уширению пиков, рис. 3.19, что может создать проблемы с разделением сложных смесей с антоцианами с близкими временами удерживания.

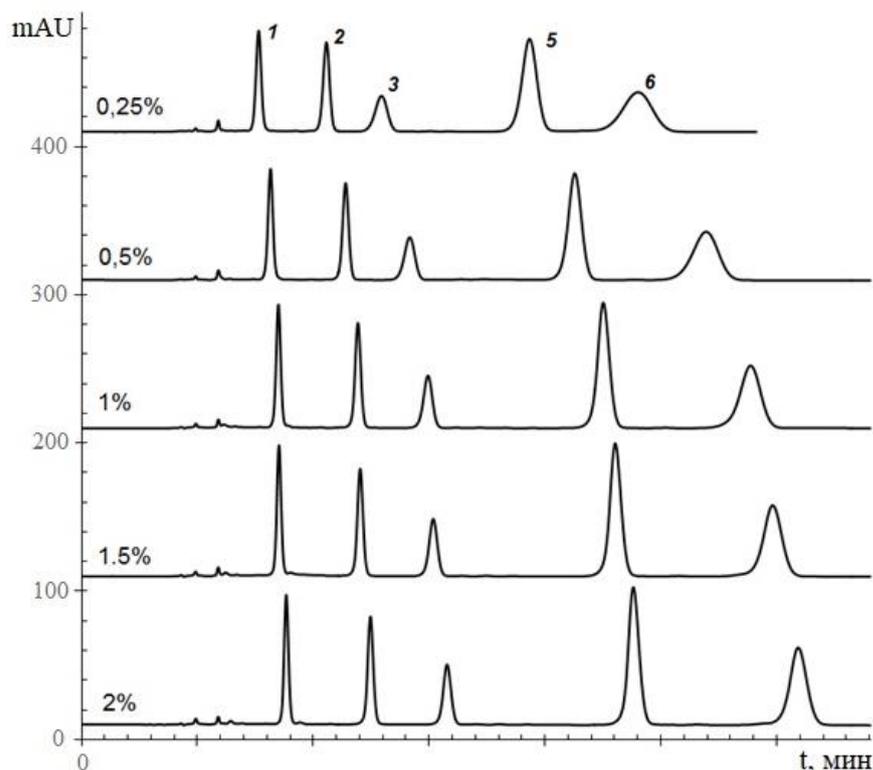


Рисунок 3.19 – Изменение ширины пиков 3-глюкозидов пяти основных антоцианидинов при изменении концентрации фосфорной кислоты (об. %, указано на рисунке) при содержании ацетонитрила 12 об. %, 0.8 мл/мин.

Нумерация пиков как на рис. 3.13.

Поэтому важен выбор подвижной фазы с обоснованной степенью подкисления, табл. А.10 (приложение А), тем более, что для различных 3-глюкозидов степень гидратации (и, следовательно, доли полуацетальной формы, и площади пиков) различны, рис. 3.20.

Это создает проблемы при количественном сопоставлении долей антоцианов по методу внутренней нормировки, делая необходимым градуировку по каждому из компонентов, требуя использования труднодоступных стандартных веществ.

Однако при некоторых различиях в поведении антоцианов кардинальных изменений при замене муравьиной кислоты на фосфорную не обнаружено.

Таким образом, замена муравьиной кислоты на ортофосфорную может рассматриваться, как альтернативный и более благоприятный с точки зрения экологии вариант изменения состава подвижной фазы в рамках «зеленой хроматографии».

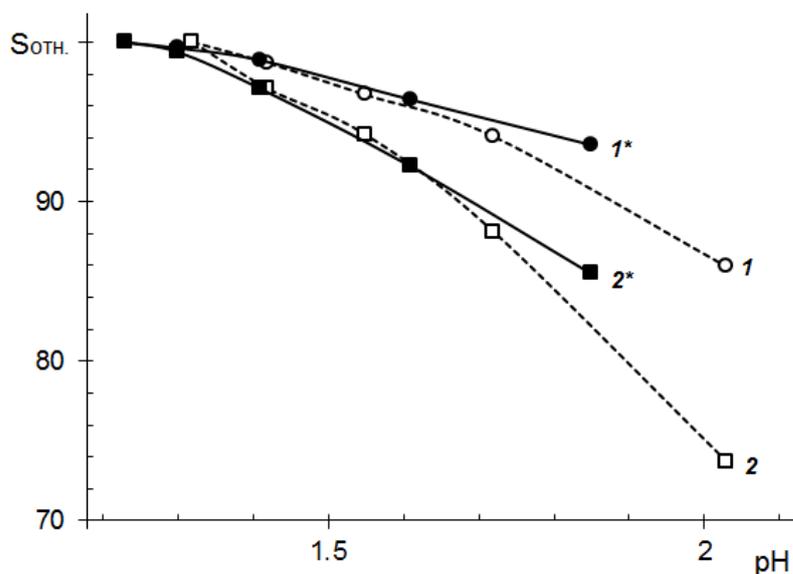


Рисунок 3.20 – Изменение доли флавилиевой формы при изменении pH (доли кислот по площадям пиков) подвижной фазе.

1 – изменение для Cu3G в элюентах с добавкой муравьиной кислоты; 1* - для Cu3G в элюентах с добавкой фосфорной кислоты; 2 – изменение для Mv3G в элюентах с добавкой муравьиной кислоты; 2* - для Mv3G в элюентах с добавкой фосфорной кислоты.

Замена ацетонитрила на метанол. Карта разделения 3-гликозидов шести антоцианидинов различного строения в элюентах на основе метанола на фоне карты разделения этих же антоцианов в элюентах на основе ацетонитрила представлена на рис. 3.21. Это сопоставление напоминает аналогичное сопоставление хроматографического поведения 3-гликозидов пяти антоцианидинов, но в элюентах, подкисленных не *орто*-фосфорной, а муравьиной кислотой, рис. 3.8. Добавление OH-группы в кольцо В антоцианидиновой основы приводит к относительному росту удерживания. Этот рост увеличивается примерно вдвое при добавлении второй OH-группы. В тоже время добавление метокси-группы – к относительному снижению удерживания, также практически удваивающемся при добавлении второй метокси-группы.

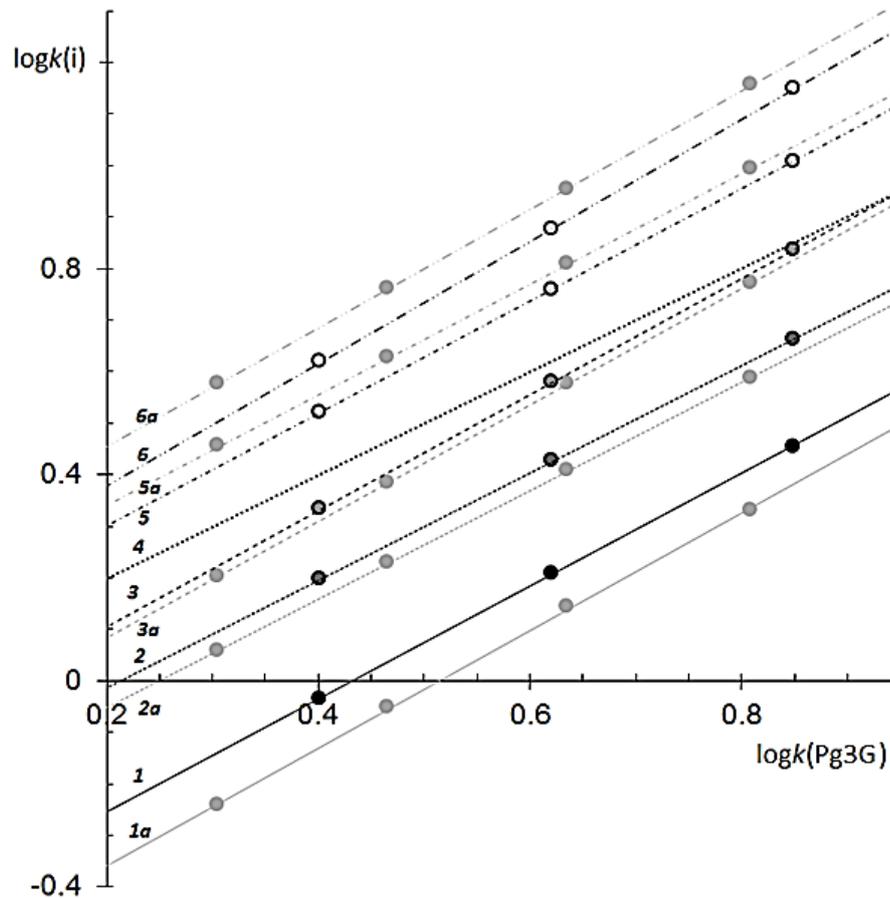


Рисунок 3.21 - Карта разделения 3-гликозидов шести основных антоцианидинов в системе «метанол–фосфорная кислота–вода» на фоне карты разделения в системе «метанол–уксусная кислота–вода» (прямые линии с буквой *a*). Линии тренда для системы «ацетонитрил–фосфорная кислота–вода» обозначены цифрой со звездочкой. Вещества: 1 – Dp3G; 2 – Cy3G; 3 – Pt3G; 4 – Pg3G; 5 – Pn3G; 6 – Mv3G.

При этом указанные рост и снижение с учетом неразличимости обеих систем при уменьшении концентрации органического модификатора до нуля связано с уменьшением и ростом параметров a_1 уравнения относительного удерживания антоцианов для соответствующих линий трендов. Это эквивалентно уменьшению и увеличению числа молекул органического модификатора при сорбции антоцианов, соответственно, табл. А.11 (приложение А).

Таким образом, замена ацетонитрила на метанол мало сказывается на порядке элюирования и степени разделения шести 3-гликозидов. Впрочем, система на основе метанола позволяет проводить более компактное разделение антоцианов, как и при использовании муравьиной кислоты.

Сопоставление относительного удерживания различных гликозидов цианидина в элюентах на основе метанола и ацетонитрила представлено на рис. 3.22. Как видно из представленных результатов на рис. 3.22 и в табл. А.12 (приложение А), различия

имеются, но они не существенны: порядок элюирования 3-дигликозидов и 3-тригликозидов не изменился, необходим выбор условий для разделения двух антоцианов - Cy3G и Cy3Sam, поскольку в некоторых составах подвижных фаз возможно их соэлюирование. При этом и параметры a_1 возрастают примерно на 0.100 при переходе от 3-моногогликозидов к 3-дигликозидам цианидина и на 0.210-0.245 при переходе к 3-тригликозидам цианидина, что находится в полном соответствии для параметров относительного удерживания этих же антоцианов при использовании в качестве компонента подвижных фаз ацетонитрила.

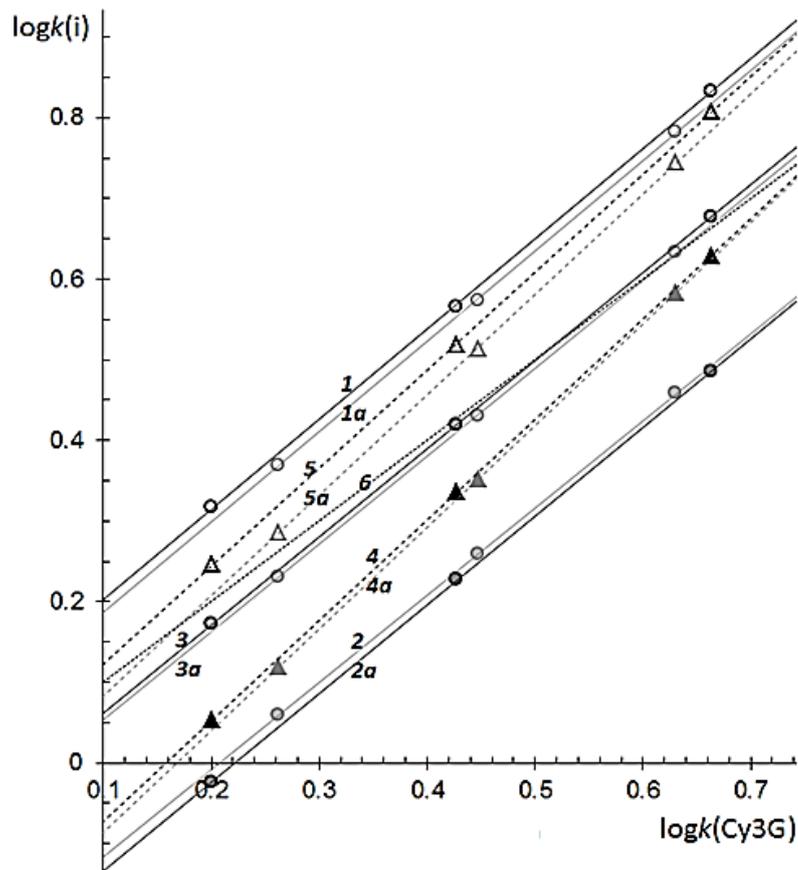


Рисунок 3.22 – Карта разделения 3-гликозидов цианидина в системе «метанол–1 об.% фосфорной кислоты–вода» на фоне карты разделения в системе «ацетонитрил–1 об.% фосфорной кислоты–вода» (линии с буквой *a*). Вещества: 1 – Cy3Rut; 2 – Cy3Sopho; 3 – Cy3Sam; 4 – Cy-3²GRut; 5 – Cy3²XRut; 6 – Cy3G.

Замена ацетонитрила на этанол. Сопоставление удерживания антоцианов в подвижных фазах с различными органическими модификаторами исследовали как было указано выше.

Сравнение удерживания цианидин-3-глюкозида (Cy3G) на карте разделения в координатах $\lg k(i)$ vs ϕ (объемная доля органического модификатора) для трех различных элюентных систем приведено на рис. 3.23.

Для каждой из них зависимость логарифма фактора удерживания Cy3G от состава подвижных фаз описывается квадратичным уравнением (2). При этом ослабление элюирующей силы подвижных фаз при переходе от системы а) к системе б) объясняется тем, что муравьиная кислота является не только кислотным модификатором для перевода форм антоцианов преимущественно во флавилиевую, но и модификатором, определяющим удерживание антоцианов вместе с ацетонитрилом.

Переход к элюентной системе б) связан с необходимостью создания корректной системы сравнения для системы в) из-за нестабильности свойств системы 10 об. % муравьиной кислоты – этанол – вода вследствие ацилирования спирта муравьиной кислотой. Сопоставление показывает, что этанол оказывается компонентом с заметно меньшей по сравнению с ацетонитрилом элюирующей силой: для достижения $\lg k(\text{Cy3G}) = 0.5$ требуются подвижные фазы, содержащие 7.25, 10.12 и 12.62 об. % органического модификатора для систем а), б) и в), соответственно.

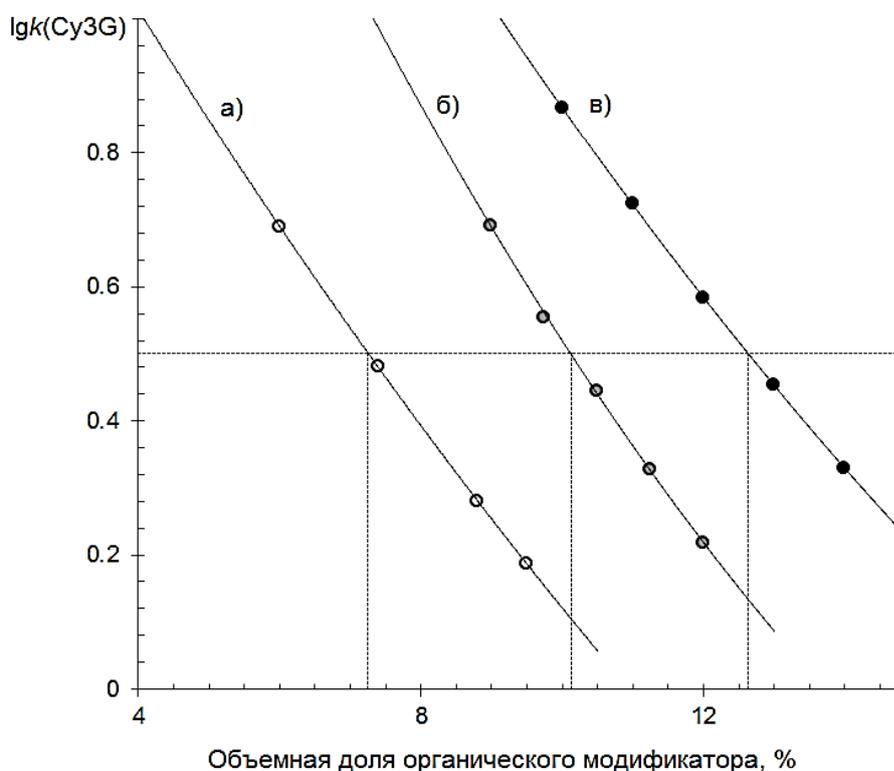


Рисунок 3.23 — Влияние концентрации органического модификатора на удерживание цианидин-3-глюкозида в трех элюентных системах: а) 10 об. % муравьиной кислоты – 6-10 об.% ацетонитрила – вода; б) 1 об. % ортофосфорной кислоты – 10-20 об. % ацетонитрила – вода; в) 1 об. % ортофосфорной кислоты – 10-15 об. % этанола – вода.

По предложенному в нашей лаборатории поплавочному механизму [4] зависимость удерживания от строения принципиально различается для агликона, проникающего внутрь привитой фазы, и для гликозидных заместителей, остающихся на поверхности обращенной фазы.

Зависимость удерживания от строения агликона исследовали на примере пяти 3-глюкозидов дельфинидина, цианидина, петунидина, пеонидина и мальвидина, рис. 3.24.

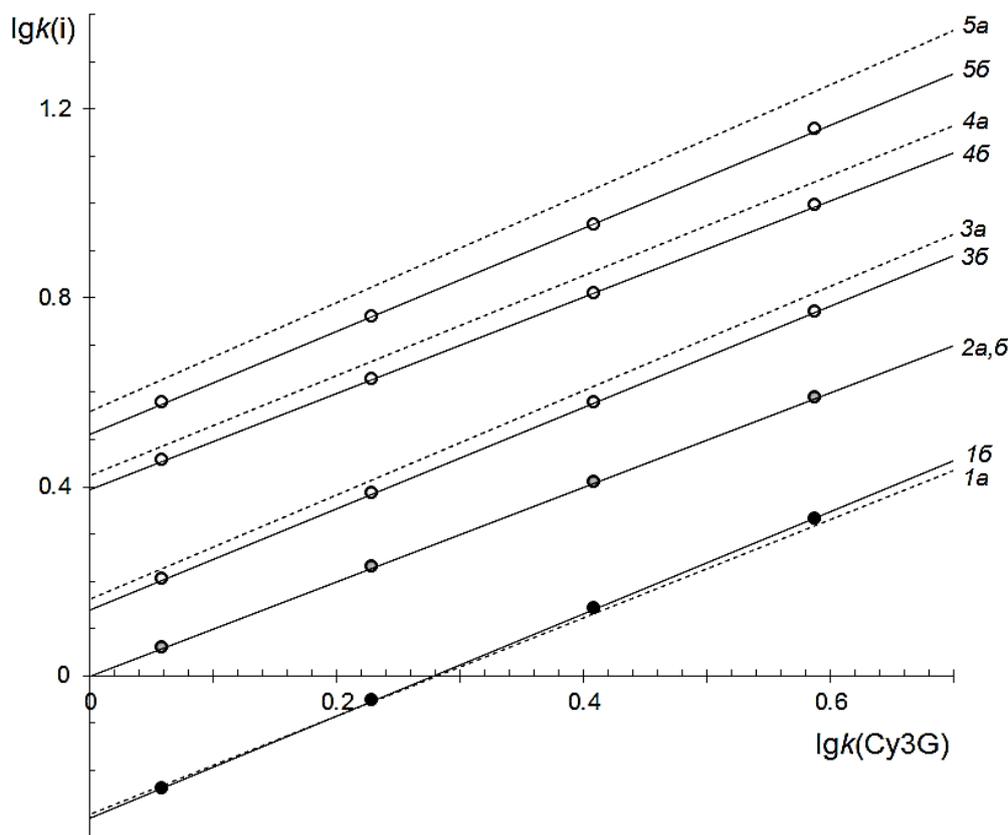


Рисунок 3.24 – Сопоставление удерживания пяти 3-глюкозидов в двух элюентных системах а) 10 об. % муравьиной кислоты – 6-10 об.% ацетонитрила – вода; б) 1 об. % ортофосфорной кислоты – 10-20 об. % ацетонитрила – вода;. Антоцианы: 1 – Dp3G, 2 – Cy3Glu, 3 – Pg3G, 4 – Pn3G, 5 – Mv3G.

На рис. 3.24 сопоставлено разделение антоцианов в двух элюентных системах а) и б). Из представленных данных следует, что порядок элюирования пяти 3-глюкозидов оказывается одинаковым для любых, удобных для определения этих антоцианов (по затратам времени) составов подвижных фаз, сопоставляемых элюентных систем:

$$t_R(\text{Dp3G}) < t_R(\text{Cy3G}) < t_R(\text{Pt3G}) < t_R(\text{Pn3G}) < t_R(\text{Mv3G}).$$

При этом замена муравьиной кислоты на ортофосфорную несколько уменьшает диапазон времен удерживания между Dp3G и Mv3G, что удобно при определении

чувствительного к сорту винограда соотношения между концентрациями пяти неацилированных антоцианов.

Результат замены ацетонитрила на этанол (при сохранении ортофосфорной кислоты в качестве подкислителя подвижной фазы) демонстрирует рис. 3.25.

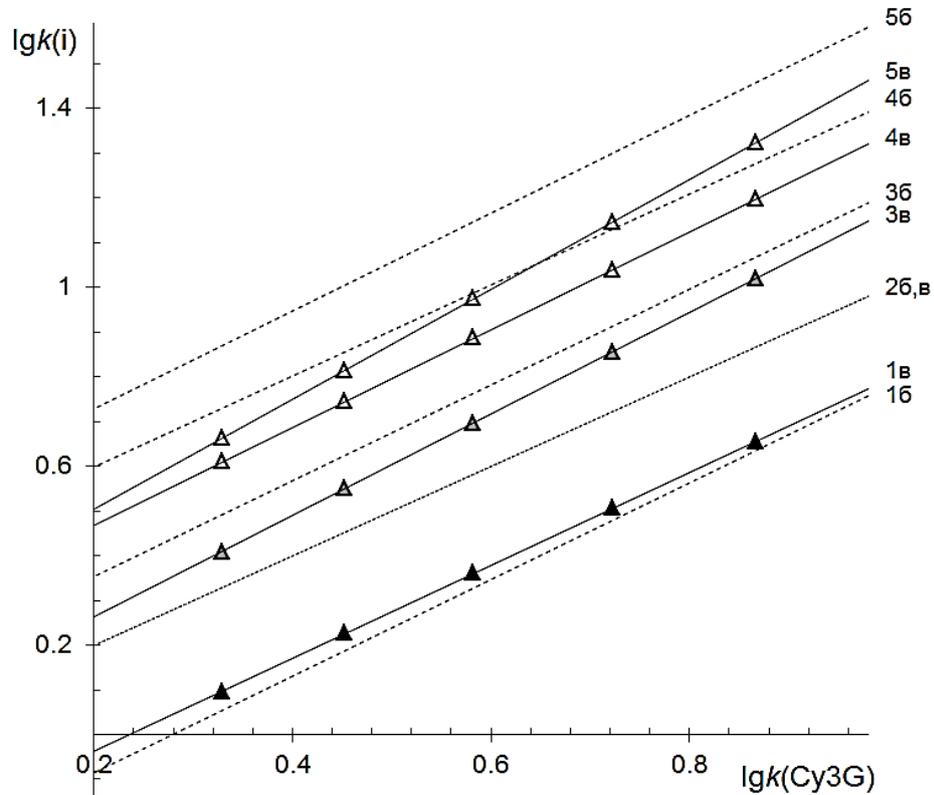


Рисунок 3.25 – Сопоставление удерживания пяти 3-гликозидов в двух элюентных системах ; б) 1 об. % ортофосфорной кислоты – 10-20 об. % ацетонитрила – вода; в) 1 об. % ортофосфорной кислоты – 10-15 об. % этанола – вода. Антоцианы: 1 – Dp3G, 2 – Cy3G, 3 – Pg3G, 4 – Pn3G, 5 – Mv3G.

Очевидно, что относительное падение удерживания 3-гликозидов, содержащих в кольце В агликона метоксигруппы (производные мальвидина, пеонидина и петунидина) с ростом концентрации этанола в подвижной фазе существенно возрастает при замене ацетонитрила на этанол. Добавление ОН-группы в кольцо В (переход от Cy3G к Dp3G) приводит к противоположному эффекту. При этом порядок элюирования пяти 3-гликозидов остается таким же, как указано выше, но с ростом концентрации этанола различие во временах удерживания Mv3G и Pn3G уменьшается, создавая проблемы в разделении этих компонентов.

При исследовании влияния замены ацетонитрила на этанол на разделение различных типов гликозидов одного и того же антоцианидина (цианидина) в элюентных системах б) и в) были сопоставлены карты разделения, представленные на рис. 3.21.

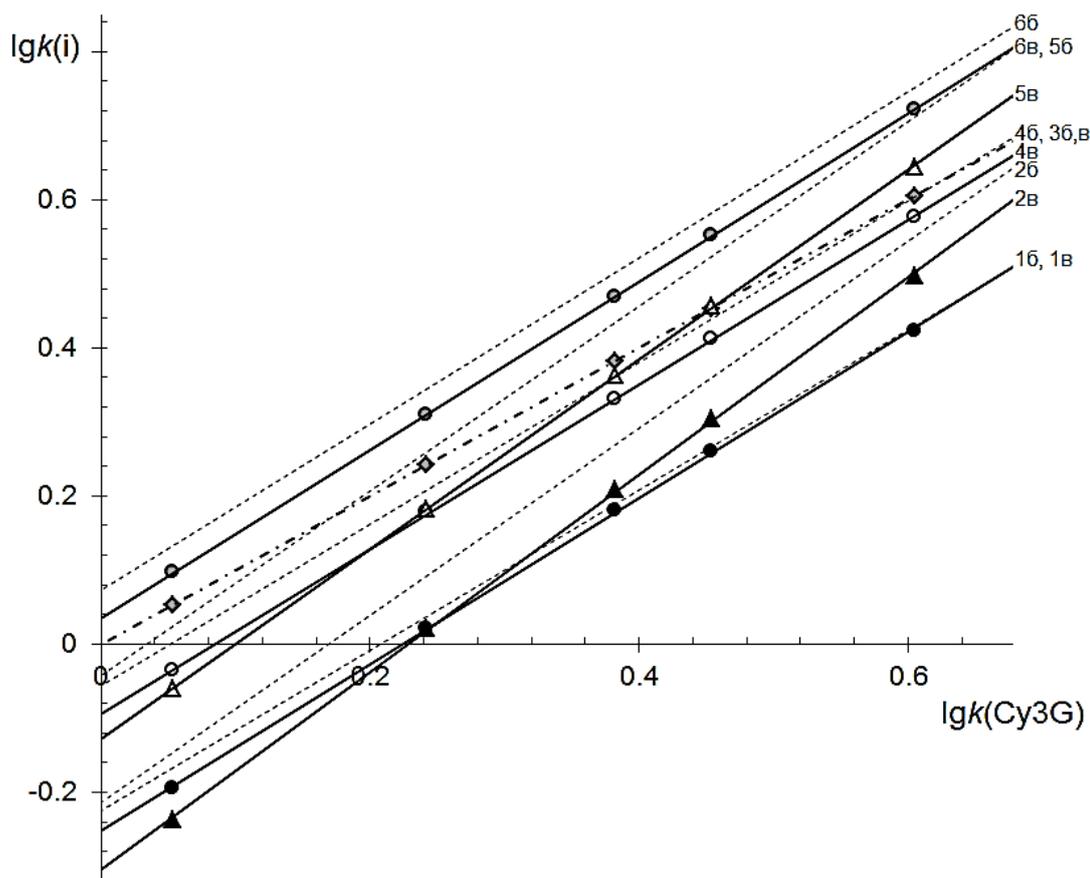


Рисунок 3.26 – Разделение шести различных 3-глюкозидов цианидина в подвижной фазе состава 11.2 об. % этанола – 1 об. % ортофосфорной кислоты – 87.8 об. % воды, расход подвижной фазы 0.8 мл/мин, температура 40°C, колонка 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Антоцианы: 1 – Cy3Sopho, 2 – Cy3GRut, 3 – Cy3G, 4 – Cy3Sam, 5 – Cy3XRut, 6 – Cy3Rut

Полученные данные указывают на то, что анализ смеси всех шести компонентов требует тщательного подбора состава подвижной фазы для каждой из систем вследствие большого числа пересечений линий на карте (т.е. инверсий порядка элюирования).

В обоих случаях наклон прямых линий возрастает при усложнении состава гликозидного радикала от моногликозида до тригликозида. Очевидно также, что утверждение о том, что при добавлении гликозидного радикала в структуру уже существующего не может быть корректным, поскольку порядок элюирования зависит от состава подвижной фазы. Но при этом замена ацетонитрила на этанол приводит к заметному ослаблению удерживания 3-тригликозидов и 3-дигликозидов по сравнению с моногликозидом, что можно объяснить лучшей сольватацией гликозидных заместителей этанолом по сравнению с ацетонитрилом.

Сопоставляя удерживание цианидин-3-глюкозида (Cy3G) на карте разделения в координатах $Igk(i)$ vs ϕ (объемная доля органического модификатора) для всех четыре органических модификаторов, рис. 3.22, можно сделать вывод о том, что наибольшей элюирующей силой из этих органических растворителей имеет ацетон, немного превосходящий по этому свойству ацетонитрил, элюирующая сила спиртов (этанола и метанола) заметно ниже. Таким образом, использование ацетона вместо ацетонитрила позволит уменьшить расход менее экологически вредного органического модификатора подвижной фазы.

Стоит также отметить, что указываемая в качестве неудобного свойства этанола высокая вязкость для элюентов, содержащих более 80% воды, мало сказывается на величинах входного давления на колонку по сравнению с ацетонитрилом - давление возрастает только от 150 до 170 бар. Наконец, и эффективность по числу теоретических тарелок оказалась также сопоставимой для элюентных систем б) и в).

Таким образом, этанол является эффективной альтернативой экологически не благоприятному ацетонитрилу при определении антоцианов – как однотипных гликозидов различных агликонов, так и различных типов гликозидов одного и того же агликона.

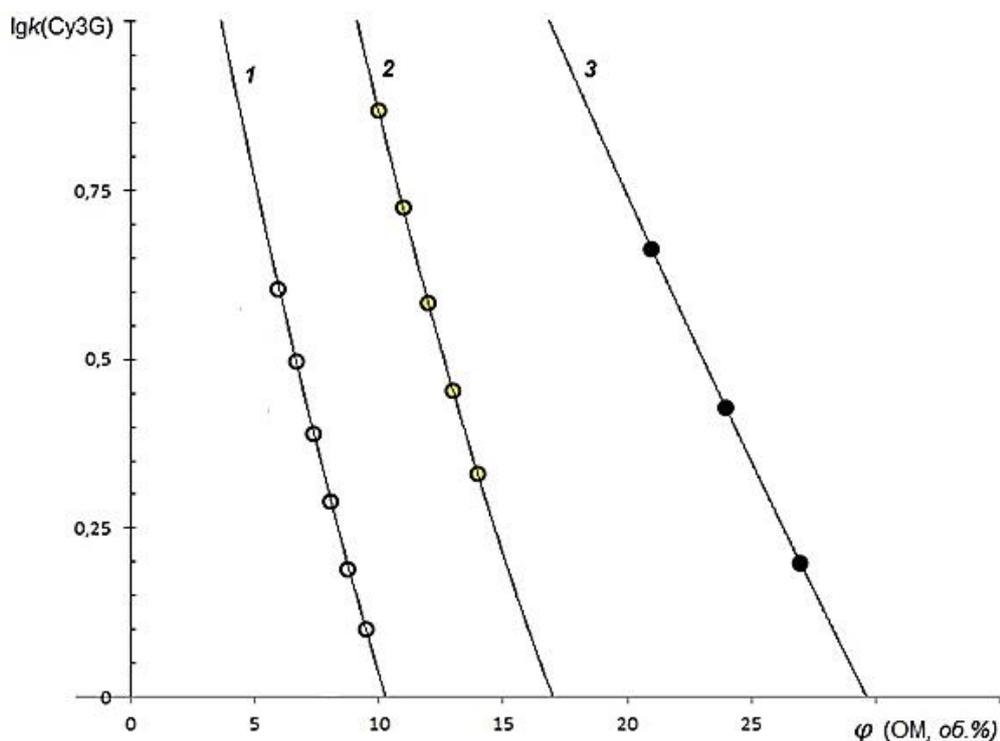


Рисунок 3.27 – Влияние концентрации органического модификатора на удерживание цианидин-3-глюкозида в трех элюентных системах «органический модификатор–1 об.% фосфорная кислота–вода»: 1 – ацетонитрил; 2 – этанол; 3 – метанол;

Таким образом, для определения антоцианов в условиях ОФ ВЭЖХ могут быть использованы следующие элюенты с диапазоном концентраций органических модификатором:

Элюент А: ацетонитрил (6 ÷ 9.5 об.%) – муравьиная кислота (10 об. %) - вода

Элюент Б: ацетон (4 ÷ 6.4 об.%) – муравьиная кислота (10 об. %) - вода

Элюент В: этилацетат (1.5 ÷ 4 об.%) – муравьиная кислота (10 об. %) - вода

Элюент Г: этанол (10 ÷ 14 об.%) – ортофосфорная кислота (1 об. %) - вода

Элюент Д: ацетонитрил (15 ÷ 18 об.%) – ортофосфорная кислота (0.5 об. %) – вода

Элюент Е: метанол (21 ÷ 30 об.%) – ортофосфорная кислота (0.5 об. %) – вода

Стоимость подвижных фаз для выполнения 100 измерений при близких временах удерживания цианидин-3-глюкозида приведена в табл. 3.1.

Таблица 3.1 – Оценка стоимости элюентов для разделения антоцианов для различных органических модификаторах подвижных фаз при близких временах удерживания Су3Glu (4.9 – 5.3 мин)

Элюент	Класс опасности ОМ	Содержание ОМ, об. %	Время удерживания, мин		Время анализа, мин	Объем, мл*	Цена анализа** руб
			Су3G	Mv3G			
А	4	8	5.28	15.8	17	13.6	313
Б	3	6.4	4.96	10.9	13	10.4	135
В	4	1.6	5.03	10.03	12	9.6	116
Г	3	14	5.36	9.59	11	8.8	75
Д	4	12	5.095	12.77	14	11.2	262
Е	3	27	5.045	10.12	12	9.6	276

* - с учетом скорости подачи подвижной фазы 0,8 мл/мин,

** - за 100 определений.

Проведенный нами анализ (табл 3.1) показывает, что предложенные в работе варианты подвижных фаз эффективны не только с экологической точки зрения, но и позволяют снизить стоимость растворителей, используемых для приготовления подвижных фаз. И наиболее эффективным является использование подвижных фаз на основе этанола с подкислением ортофосфорной кислотой.

3.2.3 Замена органического модификатора при определении монокофеоилхинных кислот и кофеина

Разделение в системе «ацетонитрил-муравьиная кислота-вода». На карте разделения первого типа представлена зависимость удерживания монокофеоилхинных кислот от концентрации ацетонитрила в подвижных фазах, подкисленных муравьиной кислотой, рис. 3.28. Отметим, что все разделения, описанные в данном разделе, осуществляли на стационарной фазе Symmetry C18.

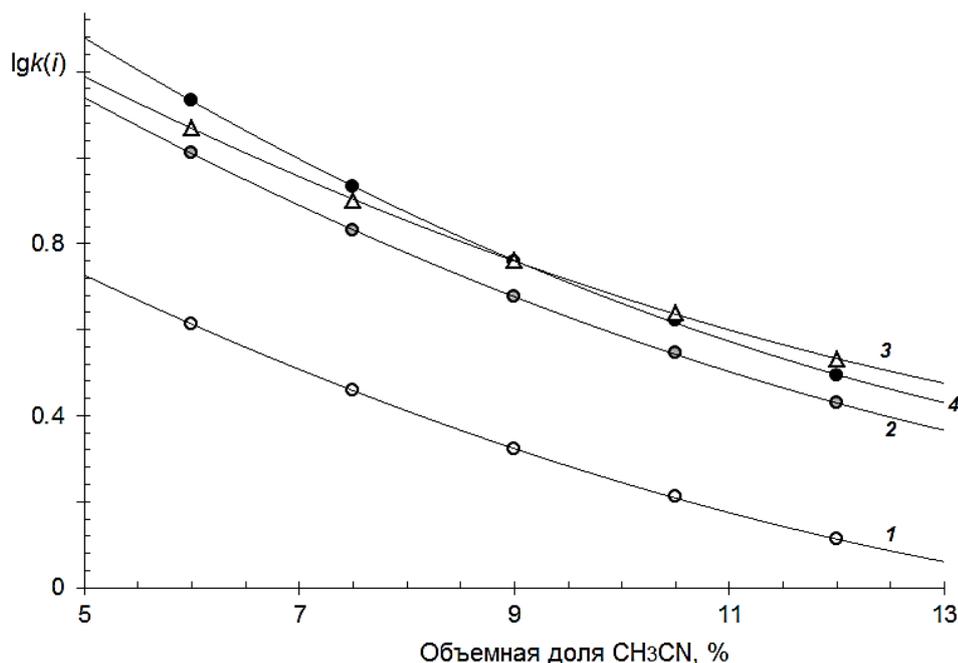


Рисунок 3.28 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «ацетонитрил – 1 об.% муравьиной кислоты – вода»
Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 - кофеин

Добавка 1 об.% муравьиной кислоты в подвижную фазу использована для подавления диссоциации монокофеоилхинных кислот. К монокофеоилхинным кислотам добавлен и кофеин, как соединение, сопутствующее этим хлорогеновым кислотам в кофе и в настоях листьев падуба парагвайского (т.е. в чае мате).

Из представленных данных следует, что три изомерные хлорогеновые кислоты разделяются достаточно хорошо во всех использованных условиях, а их порядок элюирования остается неизменным во всем исследованном диапазоне концентраций ацетонитрила в подвижной фазе:

$$t_R(3CQA) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA).$$

Однако положение элюирования кофеина в этом ряду изменяется при изменении концентрации ацетонитрила, что мешает одновременному определению

кофеина и монокофеоилхинных кислот. Но принципиально можно выбрать составы подвижной фазы, позволяющие разделять все компоненты как при меньшей элюирующей способности подвижной фазы (в правой части на рис. 3.28), так и при высокой элюирующей способности (в левой части на рис. 3.28), рис. 2.29.

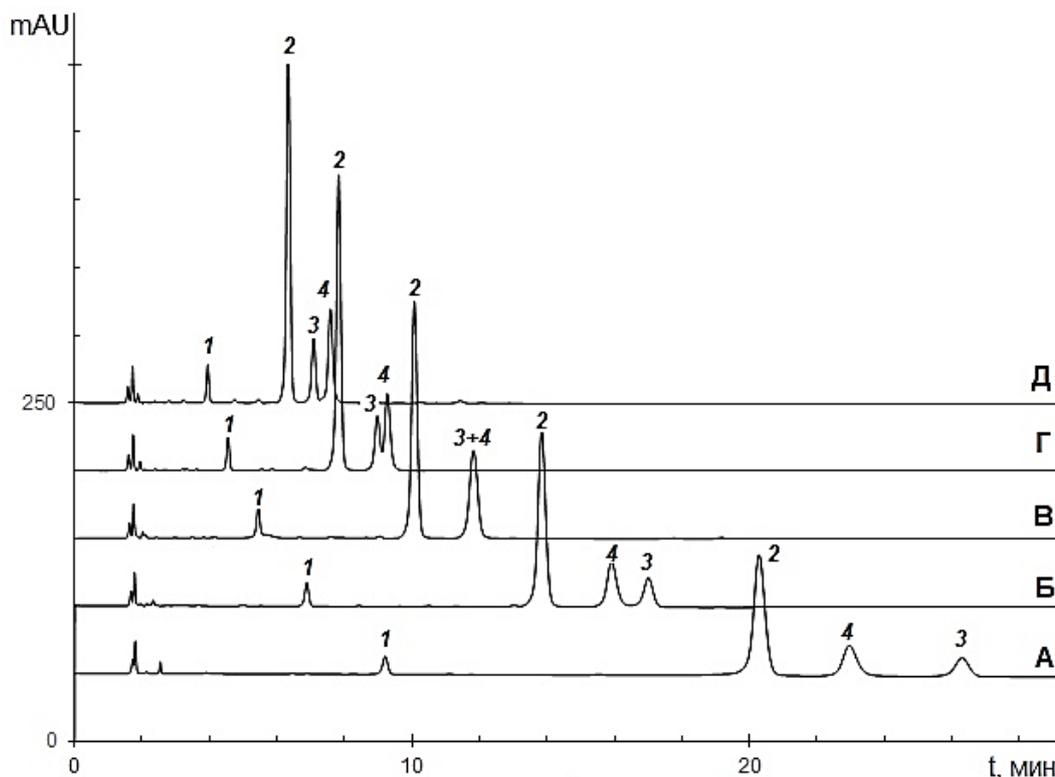


Рисунок 3.29 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах, содержащих 1 об. % HCOOH. Объемная доля ацетонитрила: А – 6 об. %, Б – 7,5 об.%, В – 9 об. %, Г – 10,5 об. %, Д – 12 об. %. Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 – кофеин; скорость подвижной фазы 0,8 мл/мин; термостат колонки: 25⁰С; детектор: 270 нм.

Строго говоря, для определения хлорогеновых кислот положение кофеина на хроматограмме не принципиально, поскольку при аналитической длине волны для определения хлорогеновых кислот (при $\lambda_{\max} = 325$ нм) абсорбцией кофеина можно пренебречь. Однако для определения кофеина (при $\lambda_{\max} = 277$ нм) поглощением хлорогеновых кислот (имеющих практически одинаковые для трех изомеров спектры поглощения) пренебречь нельзя, рис. 3.30.

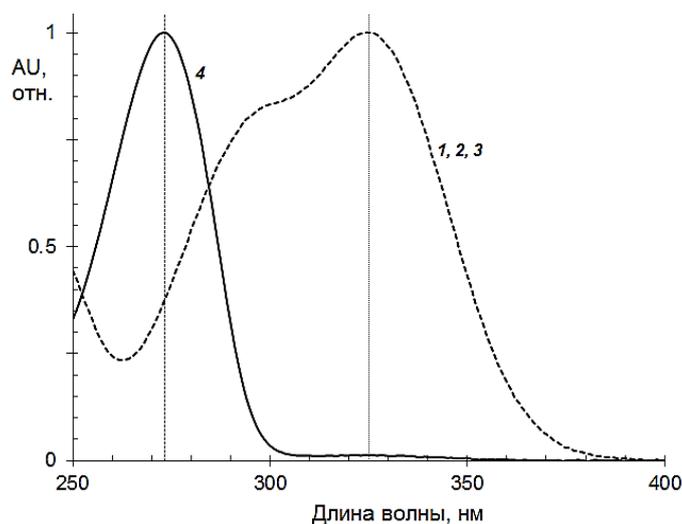


Рисунок 3.30 – Электронные спектры поглощения хлорогеновых кислот и кофеина.

Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 5 - кофеин

Зависимость удерживания этих соединений (как логарифма фактора удерживания сорбата) от объемной доли ацетонитрила (ϕ) описывается квадратичными уравнениями с высокими значениями R^2 , табл. А.13 (приложение А):

На картах разделения второго типа, построенных по методу относительного удерживания с использованием кофеина в качестве вещества сравнения, рис. 3.31, получены линейные зависимости по уравнению (3.10):

$$\lg k(i) = a \cdot \lg k(\text{caffeine}) + b \quad (3.10)$$

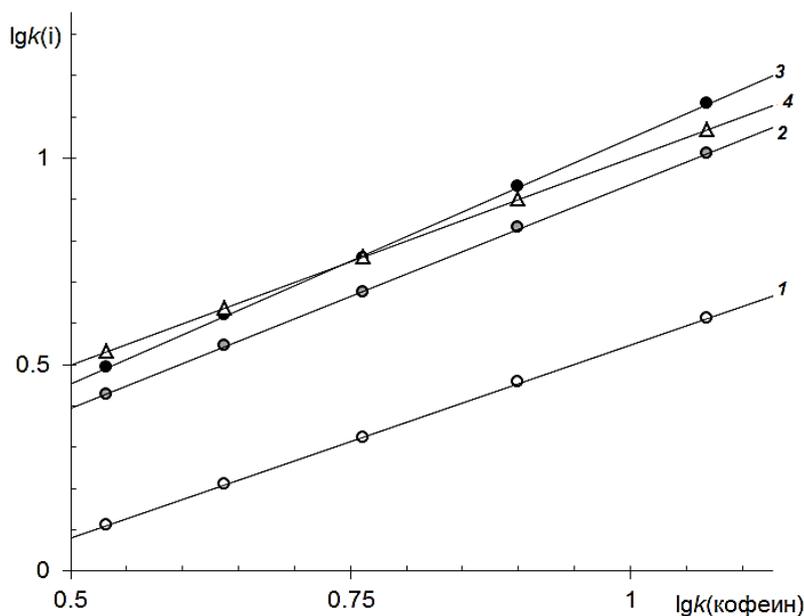


Рисунок 3.31 – Удерживание хлорогеновых кислот относительно кофеина в элюентной системе «ацетонитрил – 1 об.% муравьиной кислоты – вода». Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 5 - кофеин

При увеличении концентрации ацетонитрила удерживание всех компонентов уменьшается, но не одинаково: удерживание кофеина уменьшается медленнее, чем удерживание двух из трех хлорогеновых кислот, что свидетельствует о большем числе молекул ацетонитрила, высвобождаемых при сорбции на стационарной фазе этих соединений по сравнению с кофеином, табл. А.14 (приложение А).

Однако, изменение порядка элюирования в паре 4СQA – кофеин неудобно, поскольку оно может зависеть, (как будет показано далее) от состояния стационарной фазы (от длительности ее эксплуатации и от активности остаточных силанольных групп) и от марки стационарной фазы.

При этом в целом неожиданно близкие значения параметров a_1 для хлорогеновых кислот и кофеина исключают плоскую сорбцию хлорогеновых кислот на поверхности привитой фазы вследствие существенных различий в размерах изомерных кислот и кофеина, схема 3.1.

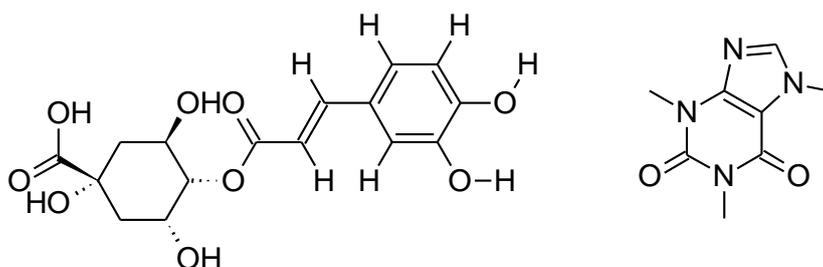


Схема 3.1 – Структуры 4СQA и кофеина

Однако, изменение порядка элюирования в паре 4СQA – кофеин неудобно, поскольку оно может зависеть, (как будет показано далее) от состояния стационарной фазы (от длительности ее эксплуатации и от активности остаточных силанольных групп) и от марки стационарной фазы.

Вследствие различия хроматографических параметров различных марок стационарных фаз для быстрого изменения состава подвижной фазы (при необходимости) необходимо также изучить зависимость удерживания рассматриваемых соединений от объемной доли муравьиной кислоты.

В серии исследований при постоянном содержании ацетонитрила (6 об. %) концентрацию муравьиной кислоты варьировали в пределах от 1 до 10 об.%) при комнатной температуре.

Как следует из представленных данных, муравьиная кислота, действительно, выступает не только как подкислитель, но и как модификатор подвижной фазы, от содержания которого также зависит и удерживание всех соединений исследуемой смеси.

При этом зависимость удерживания всех четырех соединений от объемной доли кислоты также лучше описывается квадратичной зависимостью по квадратичному уравнению (3.3), табл. А.15 (приложение А) и рис. 3.32, и прямолинейные зависимости получены по уравнению относительного удерживания, табл. А.16 (приложение А) и рис. 3.33.

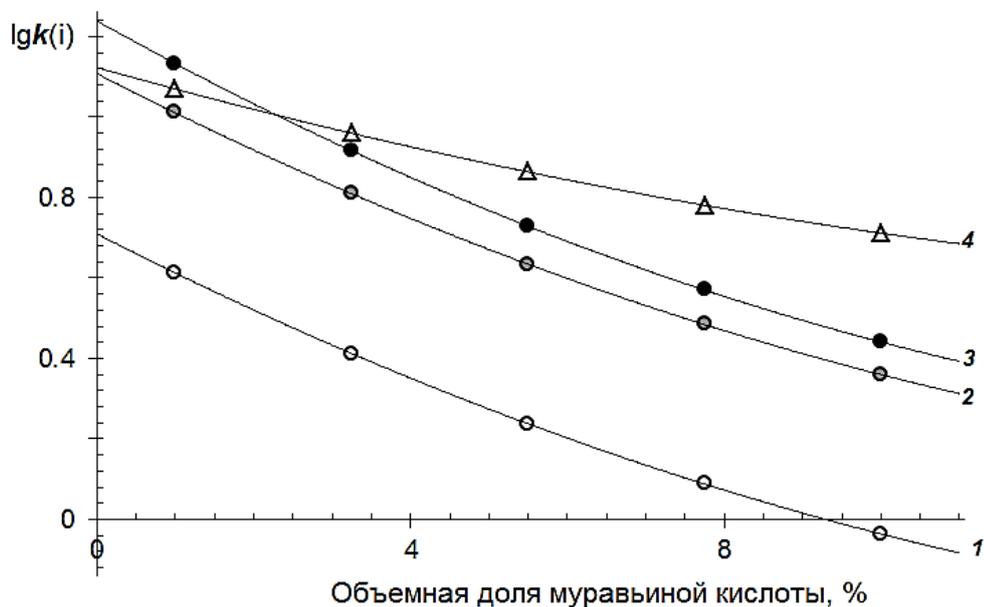


Рисунок 3.32 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «6 об. % и ацетонитрила – муравьиная кислота – вода». Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 – кофеин

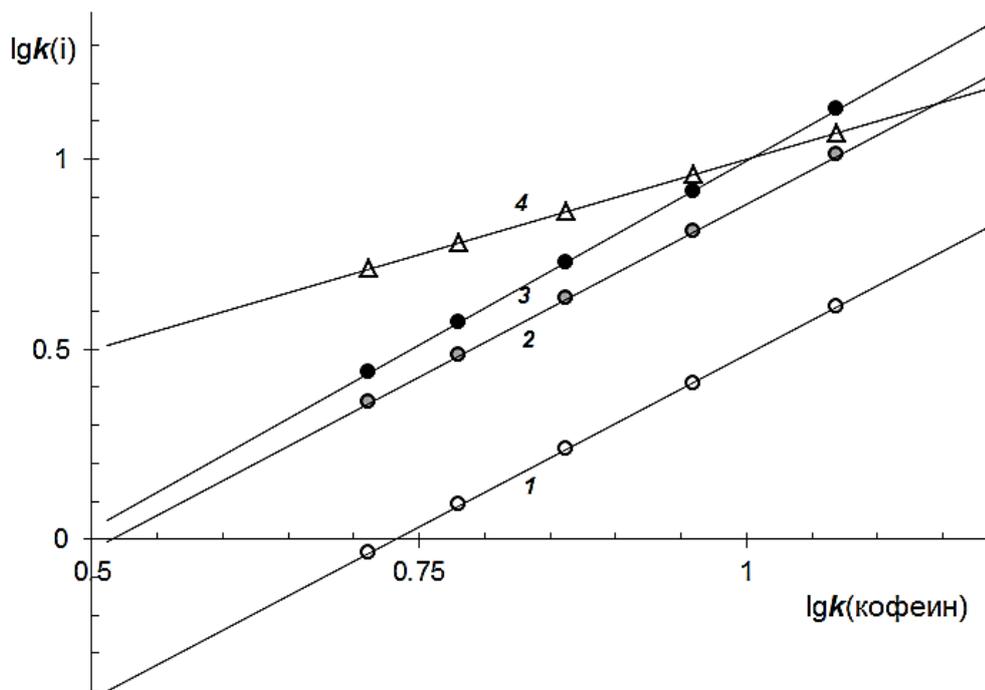


Рисунок 3.33 – Удерживание хлорогеновых кислот относительно кофеина в «6 об. % и ацетонитрила – муравьиная кислота – вода»
Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 – кофеин

Анализируя параметры уравнений из табл. А.16 (приложение А), находим, что параметр a_1 для кофеина примерно вдвое меньше, чем для хлорогеновых кислот, что согласуется с тем, что площадь полярной поверхности хлорогеновых кислот (164.74 \AA^2) существенно больше, чем у молекулы кофеина (61.84 \AA^2), как позволяет рассчитать этот параметр интерактивно сайт <https://www.molinspiration.com/>. Т.е. число моль муравьиной кислоты в сольватной оболочке в случае кофеина в два раза меньше, чем в случае хлорогеновых кислот. Для молекул ацетонитрила в соответствие с ранее полученными данными табл. А.12 (приложение А) были получены существенно менее различающиеся результаты. По этой причине различие в удерживании кофеина с одной стороны и хлорогеновых кислот с другой стороны оказывается существенно более чувствительным к изменению концентрации муравьиной кислоты.

Таким образом, система «ацетонитрил – муравьиная кислота – вода» может быть использована для разделения и одновременного определения хлорогеновых кислот и кофеина. Найденные в работе закономерности удерживания этих веществ как функция состава подвижной фазы помогут быстро изменить состав подвижной фазы для новой стационарной С18 фазы для достижения эффективного разделения всех компонентов.

Замена муравьиной кислоты (1 об. %) на ортофосфорную (0.3 об. %) привела к существенному росту удерживания 5CQA – от 20.29 мин до 29.21 мин при одинаковой концентрации ацетонитрила в подвижных фазах – 6 об. %. При изменении концентрации ацетонитрила от 6 до 12 об.% при постоянной концентрации ортофосфорной кислоты (0.3 об.%) зависимость удерживания всех веществ также квадратично зависит от концентрации ацетонитрила с коэффициентами в уравнении (3.3), представленными в табл. А.17 (приложение А), рис. 3.34, и практически линейно при изменении концентрации фосфорной кислоты, рис.3.35.

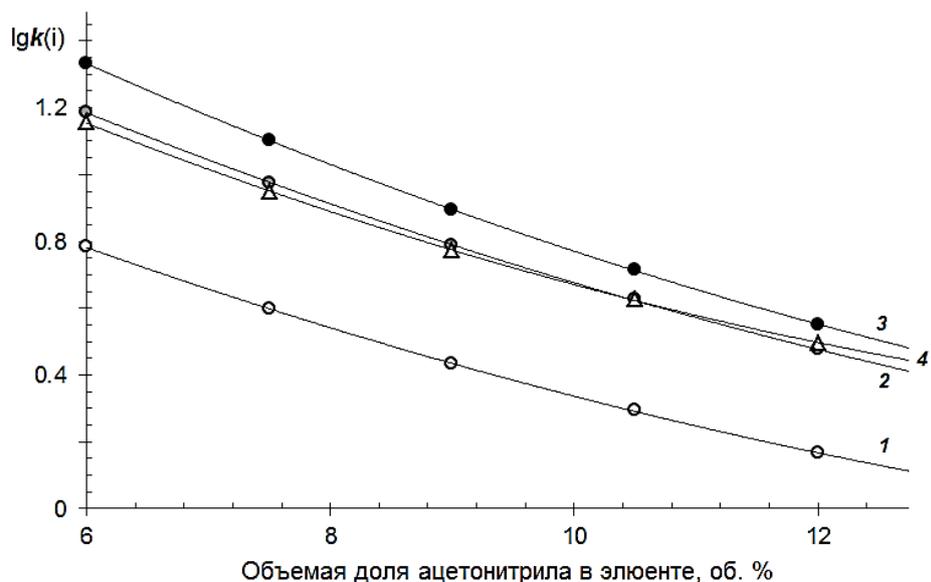


Рисунок 3.34 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «ацетонитрил – 0.3 об. % ортофосфорной кислоты – вода»
Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 - кофеин

При этом очевидно, что возникают проблемы с разделением 5CQA и кофеина. Выше было установлено, что увеличение кислотности среды за счет роста концентрации муравьиной кислоты приводит к изменению в разделении хлорогеновых кислот и кофеина вследствие различия величин полярной поверхности молекул. Поэтому интерес представляло выяснение влияния концентрации ортофосфорной кислоты на удерживание этих компонентов.

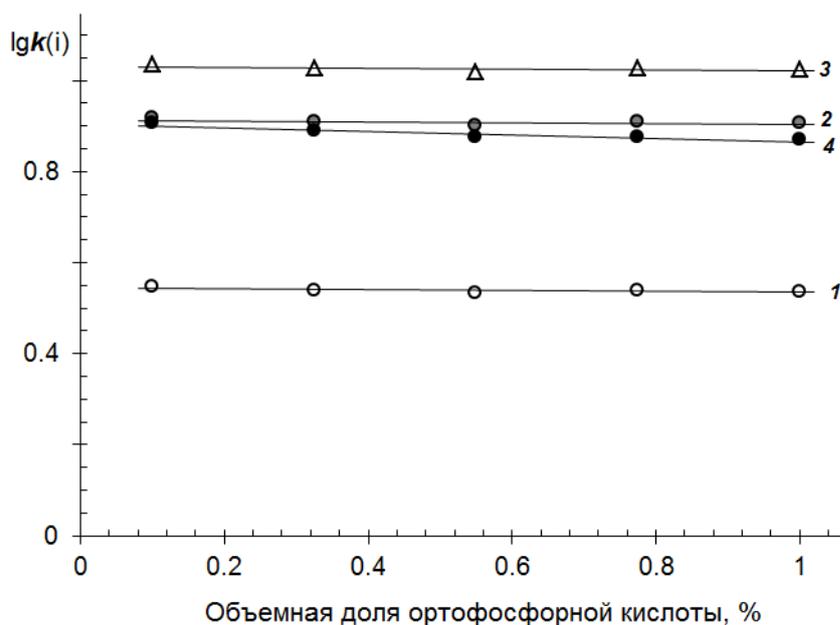


Рисунок 3.35 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «8 об. % ацетонитрила – ортофосфорная кислота – вода»

При этом удерживание хлорогеновых кислот крайне мало зависит от концентрации кислоты, как и удерживание кофеина, что не позволяет в этом случае рассчитывать на изменение в разделении интересующих соединений за счет изменения состава подвижной фазы.

Влияние замены ацетонитрила на ацетон, как экологически более благоприятный растворитель интересно с той точки зрения, что оба эти растворителя относятся к одной и той же группе селективности, поэтому не следовало бы ожидать существенных изменений в разделении. Но при этом такая замена не позволяет исследовать удерживание кофеина с прибором со спектрофотометрическим детектором, поскольку области поглощения УФ-света ацетоном и кофеином перекрываются. Таким образом, возможно только сопоставление селективности разделения изомерных кофеоилхинных кислот. Как и при использовании ацетонитрила зависимость удерживания от объемной доли ацетона описывается уравнением второго порядка, табл. А.18 (приложение А) и рис.3.36.

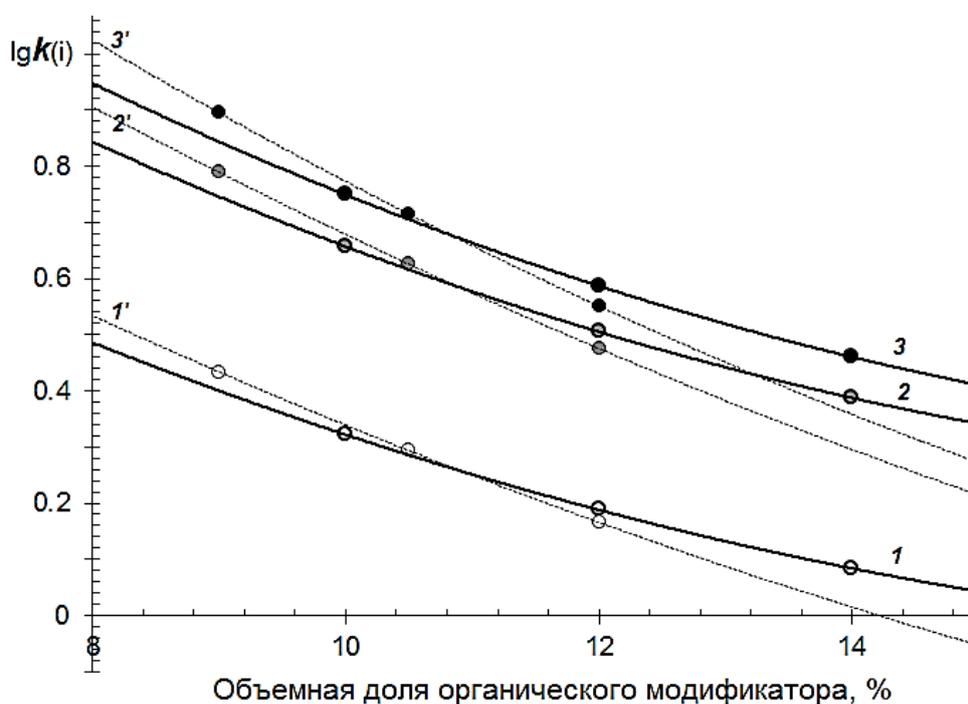


Рисунок 3.36 – Разделение хлорогеновых кислот в подвижных фазах «ацетон – 0.5 об. % ортофосфорной кислоты – вода» и «ацетонитрил – 0.3 об. % ортофосфорной кислоты – вода»
Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA

Сравнивая полученные данные с данными для подвижных фаз, содержащих ацетонитрил, получаем странные результаты:

- в случае ацетона кривые имеют наклон с большим вкладом квадратичного члена в уравнении (3.3),
- но элюирующая сила обеих систем примерно одинакова при содержании органического модификатора около 11 об.%,
- при меньшем содержании органического модификатора элюирующая сила ацетонитрила оказывается меньше, чем ацетона, тогда как при более высоких концентрациях соотношение между элюирующими силами обращается.

Полученные результаты могут быть следствием различного типа ассоциации ацетона и ацетонитрила с водой.

Использование карт разделения второго типа с 5CQA, используемым в качестве реперного соединения для элюентных систем на основе ацетонитрила и ацетона позволяет получить также неожиданную информацию, рис. 3.37. В этом случае подтверждается отнесение ацетона и ацетонитрила к растворителям одной – VI-ой группы селективности по Снайдеру. Так, линии трендов для трех изомерных кофеилхинных кислот практически совпадают – точки для элюентов на основе ацетона прекрасно укладываются на прямые линии трендов, построенные для ацетонитрила.

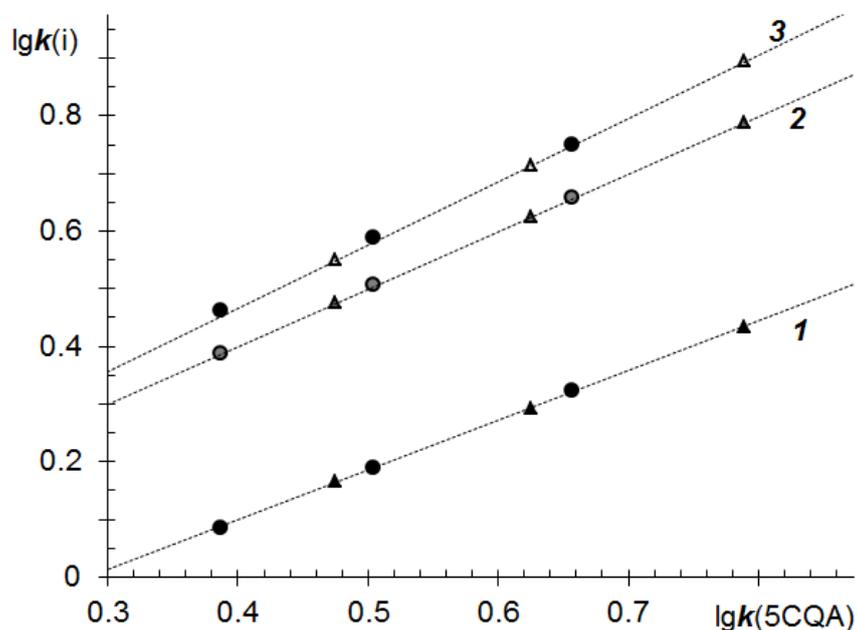


Рисунок 3.37 – Удерживание хлорогеновых кислот относительно 5CQA в элюентах с ортофосфорной кислотой, ацетонитрилом (треугольники) и ацетоном (кружки).

Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA

Таким образом, ацетон может заменить ацетонитрил при определении хлорогеновых кислот в таких объектах, как кофе, чай мате, чай каркадэ, содержащие эти вещества в качестве основных антиоксидантов.

Замена ацетонитрила на пропанол-2 (изопропиловый спирт) является перспективным направлением в «зеленой» хроматографии, тем более, что пропанол-2 не препятствует детектированию кофеина.

Зависимость разделения хлорогеновых кислот и кофеина от концентрации пропанола-2 при постоянной концентрации ортофосфорной кислоты (0.3 об. %) представлена на рис. 3.38. В этом случае, как в выше рассмотренных случаях, зависимость удерживания всех четырех веществ от концентрации пропанола-2 носит квадратичный характер, табл.А.19 (приложение А).

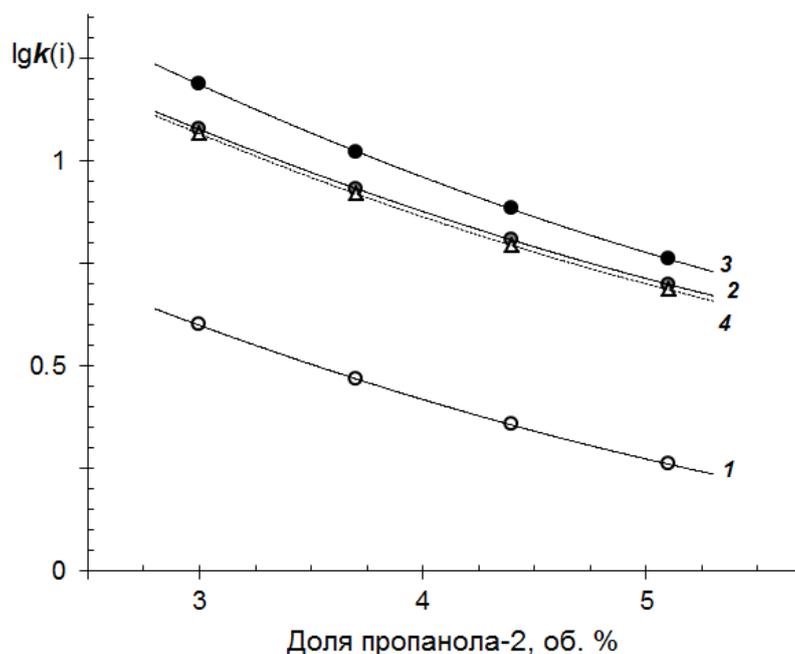


Рисунок 3.38 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «пропанол-2–0.3 об.% ортофосфорной кислоты–вода»

При этом отклонение от линейной формы уравнения Снайдера более выражено по сравнению с выше рассмотренными случаями (для ацетонитрила и ацетона), что следует из больших значений параметра a_2 .

На картах разделения второго типа также получаются прямые линии для относительного удерживания изомерных монокофеоилхинных кислот относительно кофеина, рис. 3.39 и табл. А.20 (приложение А).

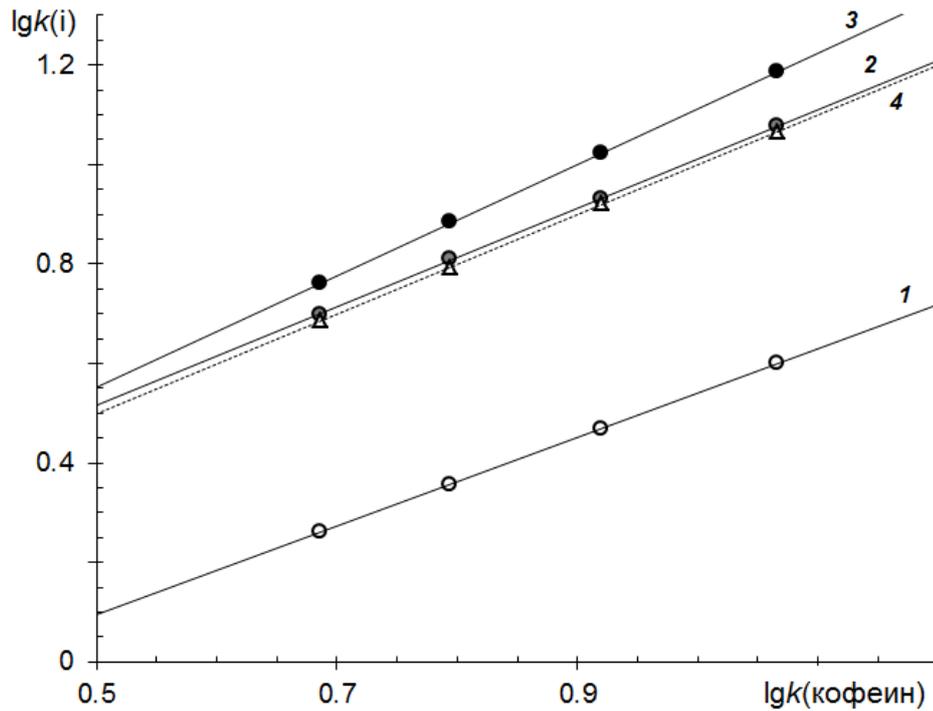


Рисунок 3.39 – Удерживание хлорогеновых кислот относительно кофеина в элюентах системы «пропанол-2–0.3 об. % ортофосфорной кислоты–вода». Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA

При этом для данной элюентной системы характерен практически не зависящий от состава подвижной фазы порядок элюирования

$$t_R(3CQA) < t_R(\text{кофеин}) < t_R(5CQA) < t_R(4CQA).$$

Замена ацетонитрила на этилацетат также важна для перехода к более дешевому и более экологически приемлемому органическому растворителю без проблем детектирования всех компонентов.

Удерживание всех четырех компонентов лучше описывается квадратичным уравнением, рис. 3.40.

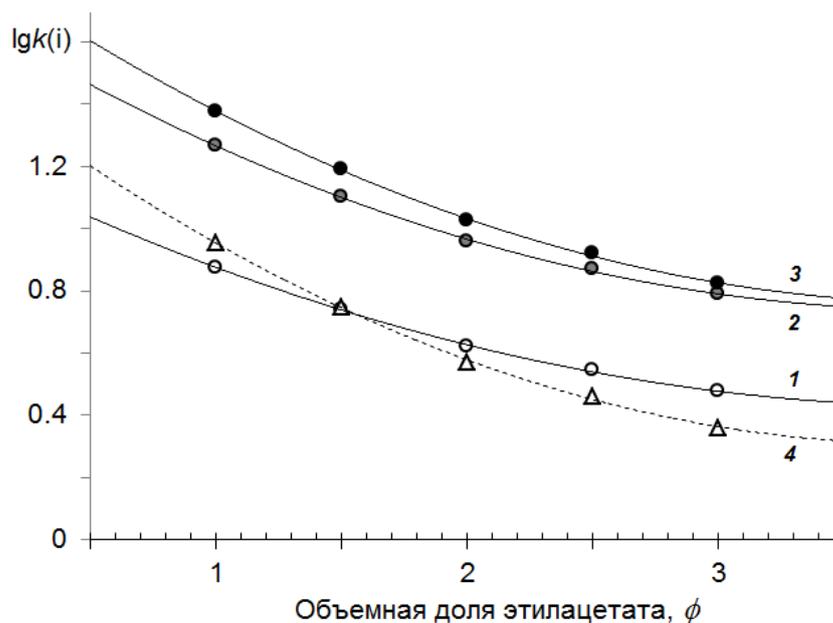


Рисунок 3.40 – Разделение хлорогеновых кислот и кофеина в подвижных фазах «этилацетат–0.6 об.% ортофосфорной кислоты–вода»

Особенность хроматографического поведения монокофеоилхинных кислот и кофеина:

- наименьшая среди исследованных концентрация органического модификатора, необходимая для элюирования всех веществ;
- в элюентах с относительно большей элюирующей способностью кофеин удерживается даже слабее 3CQA.

Параметры уравнений относительного удерживания представлены в табл. А.21 (приложение А). Из представленных данных следует, что R^2 имеет наименьшее значение по сравнению с выше рассмотренными случаями.

Это является следствием заметной криволинейности линии тренда для варианта с использованием любого из изомеров монокофеоилхинных кислот, например:

$$\lg k(\text{кофеин}) = -0.373 + 0.763 \cdot \lg k(5\text{CQA}) + 0.227 \cdot [\lg k(5\text{CQA})]^2, R^2 = 0.9996.$$

Еще одна особенность – вследствие ограниченной растворимости этилацетата в воде элюирование дикофеоилхинных кислот практически невозможно. Это позволяет отделять монокофеоилхинные кислоты и кофеин от сопутствующих дикофеоилхинных кислот, присутствующих как в кофе, так и в чае мате.

Таким образом, замена ацетонитрила на другой органический растворитель при совместном определении монокофеоилхинных кислот и кофеина возможна. В целом можно сказать, что замена ацетонитрила на ацетон не приводит к экономии органического растворителя, хотя более экологически вредный ацетонитрил (ПДК в воздухе рабочей зоны

10 мг на 1 м³) заменяется на более экологически безопасный ацетон (ПДК 200 мг на 1 м³ по ГОСТ 12.1.007). Замена на пропанол-2 более эффективна для экономии растворителя (1.5 – 2 раза), но нет выигрыша в экологической безопасности (ПДК в воздухе рабочей зоны 10 мг на 1 м³ по ГОСТ 9805-84). Замена на этилацетат приводит к наибольшей экономии органического растворителя (в 3 – 4 раза) с улучшением экологических параметров ((ПДК 200 мг на 1 м³ по ГОСТ 22300-76). При сопоставлении удерживания 5CQA при использовании исследованных выше органических модификаторов подвижной фазы получатся рис. 3.41.

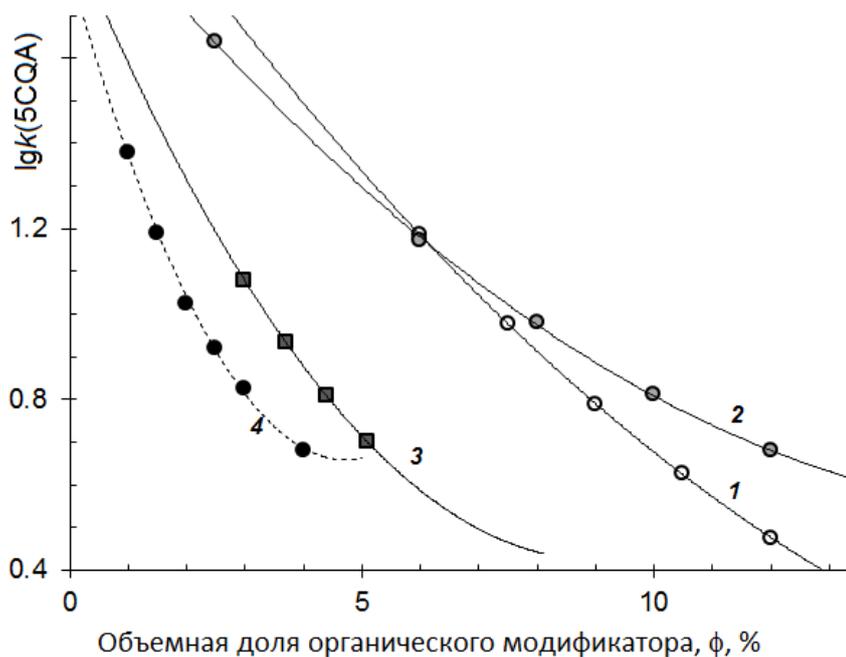


Рисунок 3.41 – Зависимость удерживания 5CQA от концентрации органического модификатора в подвижной фазе. Органический модификатор; 1 – ацетонитрил, 2 – ацетон, 3 – пропанол-2, 4 – этилацетат.

Необычное в рассмотренном ряду поведение сорбатов в элюентах на основе этилацетат может быть связано с чрезвычайно низкой концентрацией органического модификатора, при которой возможен коллапс фаз.

Разделение монокофеилхинных кислот и кофеина было рассмотрено выше, но относительно разделения самих изомеров (несмотря на то, что обращенно-фазовая ВЭЖХ обычно мало чувствительна к строению изомеров) заметно различается, рис. 3.42.

При этом из использованных растворителей только пропанол-2 по классификации Снайдера относится ко II группе селективности, в то время как остальные - ацетон, ацетонитрил и этилацетат – к VI группе. И если для ацетона и ацетонитрила, как указывалось выше, экспериментальные точки неплохо укладываются на общую прямую, то

для этилацетата отличия существенны. Следовательно, классификация Снайдера хороша, но не является универсальной, приемлемой для всех случаев.

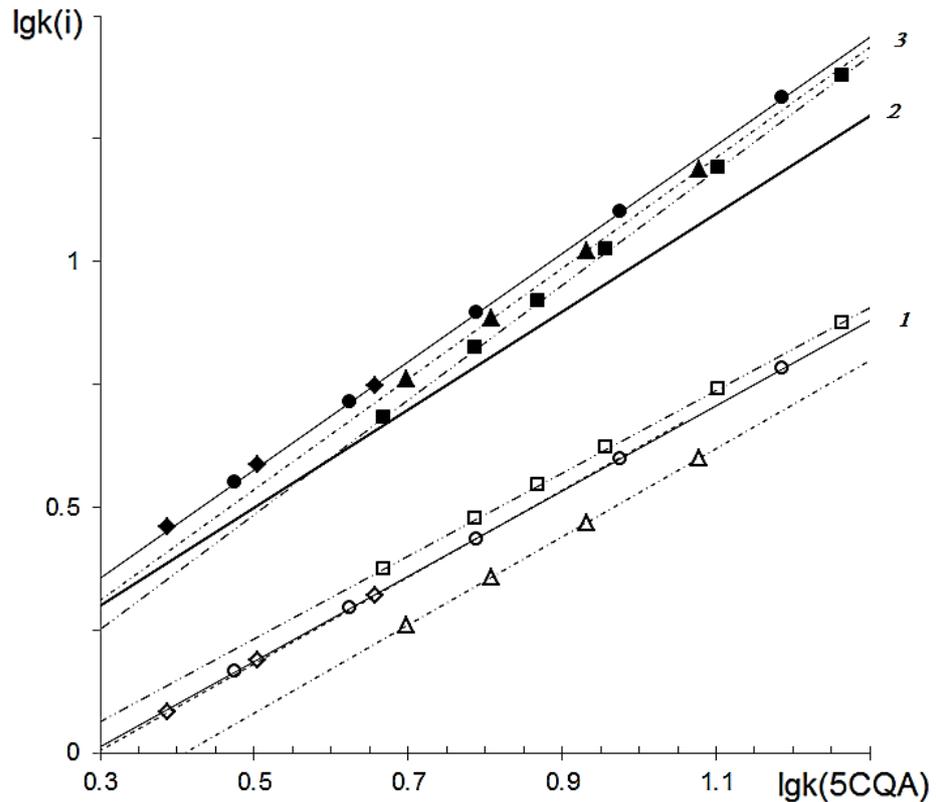


Рисунок 3.42 – Удерживание хлорогеновых кислот относительно 5CQA в элюентах с ортофосфорной кислотой, ацетонитрилом (кружки), пропанолом-2 (треугольниками), ацетоном (ромбы) и этилацетатом (квадраты). Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA

3.2.4 Замена органического модификатора при определении дикофеоилхинных кислот

Разделение в системе «ацетонитрил–ортофосфорная кислота–вода». Карта разделения ДКХ кислот в элюентной системе «ацетонитрил–0.25 об. % ортофосфорной кислоты–вода» представлена на рис. 3.43, а параметры уравнения относительного удерживания приведены в табл. А.22 (приложение А). В качестве реперного соединения использована 5CQA.

Из представленных данных следует, что при сорбции четырех из пяти дикофеоилхинных кислот параметр a_1 больше 1.5, что может свидетельствовать об одновременном участии обоих радикалов кофейной кислоты при сорбции молекулы дикофеоилхинной кислоты на поверхности обращенной фазы.

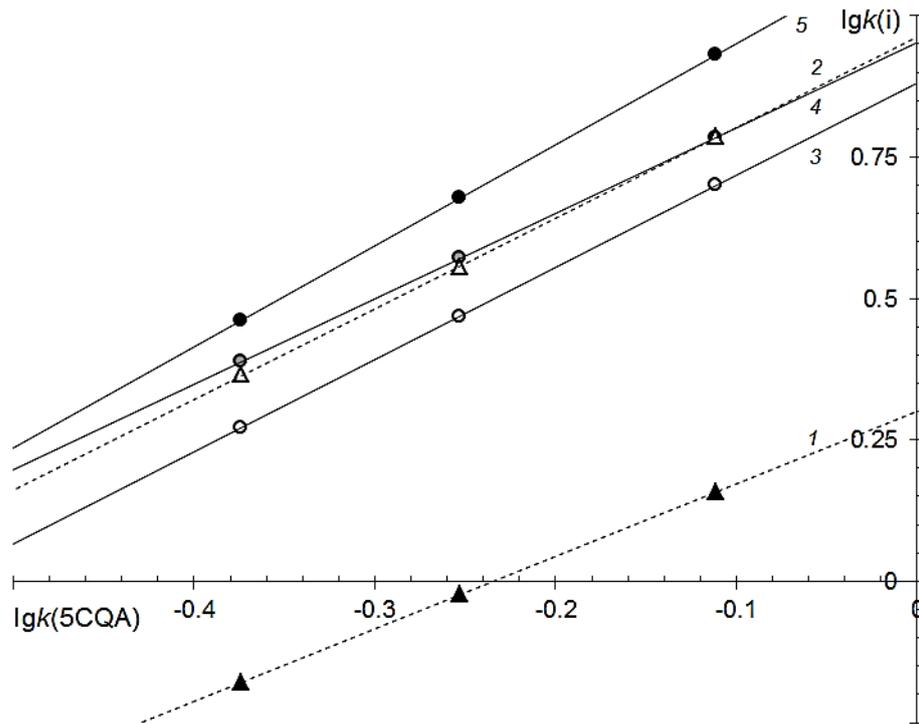


Рисунок 3.43 – Карта разделения ДКХ кислот в элюентной системе «ацетонитрил – 0.25 об.% фосфорной кислоты – вода» для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 25°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Это согласуется с предположением о том, что сорбция на поверхности привитой фазы является основным механизмом удерживания монокофеоилхинных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ [159]. Сорбционный механизм подтверждается и разделением изомерных ДКХ кислот, что не характерно для распределительного механизма.

Отметим, что в данном случае прямые линии трендов проходят через точки, получаемые при аппроксимации удерживания по первому типу карт разделения, что видно по положению пересечений пунктирных линий (для значений a_0 для квадратичной зависимости) с линиями трендов соответствующих diCQA, рис. 3.44.

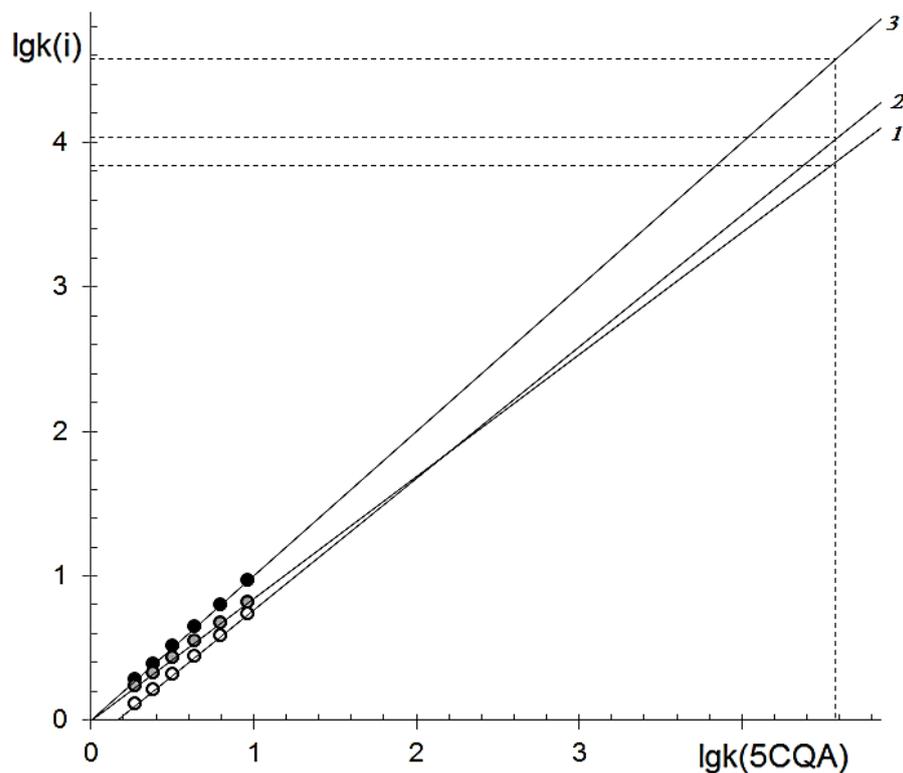


Рисунок 3.44 – Карта разделения ДКХ кислот в элюентной системе «ацетонитрил – 0.25 об.% фосфорной кислоты – вода» для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 25°C. Вещества: 1 – 3,4diCQA; 2 – 3,5diCQA; 3 – 4,5diCQA.

Неожиданно низкое относительное удерживание 1,3diCQA связано с особенностями строения этой кислоты, для которой, по крайней мере, в одной из конформаций возможен внутримолекулярный стэкинг с параллельным выстраиванием ароматических колец двух радикалов кофейной кислоты, рис. 3.45, препятствующий сорбции соединения на поверхности обращенной формы двумя заместителями. Это приводит к существенному отличию этого изомера от других изомеров по УФ-спектру, рис. 3.45.

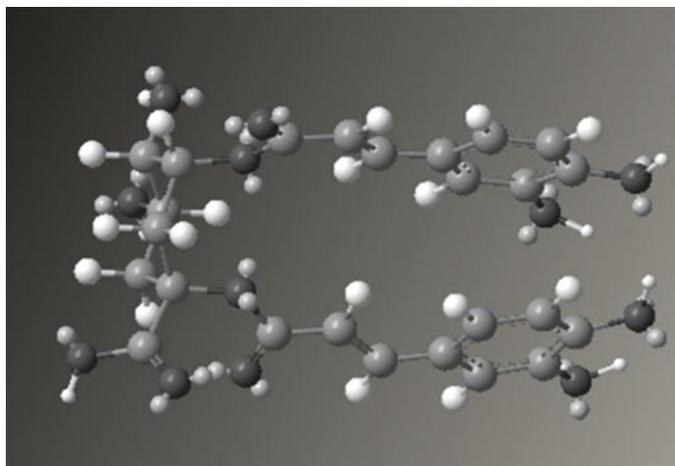


Рисунок 3.45 – Стэкинг заместителей хинной кислоты в молекуле 3,5-diCQA

Рассматриваемая хроматографическая система удобна для определения diCQA в кофе и мате, в которых отсутствуют изомеры, содержащие кофеильный радикал в положении 1. Но присутствие изомера 1,5diCQA делает эту систему не очень удобной из-за проблем в разделении 1,5diCQA и 3,5diCQA.

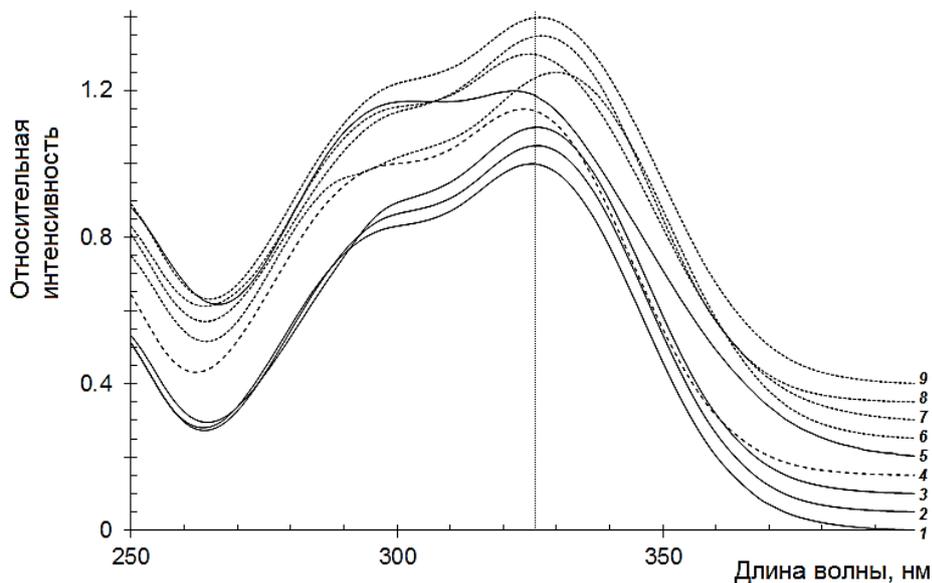


Рисунок 3.46 – УФ-спектры веществ, записанные в кювете детектора.

Вещества; 1 – 3CQA; 2 – 4CQA; 3 – 5CQA; 4 – кофейная кислота; 5 – 1,3diCQA; 6 – 1,5diCQA; 7 – 3,4diCQA; 8 – 3,5diCQA; 9 – 4,5diCQA. Растворитель 20 об. % пропанола 2, 0,25 об.% ортофосфорной кислоты в воде.

Для дифференциации изомеров обычно используют полный комплект стандартных веществ, но, учитывая дороговизну этих образцов, возникает вопрос о возможности дифференциации diCQAs, которые могут быть найдены в сложных смесях по электронным спектрам поглощения (при применении диодно-матричных детекторов) и по масс-спектрам (при применении масс-спектрометрического детектирования), а также по их хроматографическому поведению.

В настоящей работе отнесение ДКХ кислот выполнено по порядку удерживания ДКХ кислот (после подтверждения их состава методами УФ-спектроскопии и масс-спектроскопии), найденному в литературе [136, 138, 208, 284–286]. При этом такое отнесение подтверждается хроматографическим методом - соотношением параметров a_1 , согласующимся с параметрами a_1 линий трендов для монокофеилхинных кислот, найденных в этой же системе:

$$a_1(3CQA) < a_1(5CQA) < a_1(4CQA)$$

При сохранении аддитивности параметр a_1 должен возрасти именно в ряду (табл. А.16, приложение А):

$$a_1(3,5\text{diCQA}) < a_1(3,4\text{diCQA}) < a_1(4,5\text{diCQA})$$

В таком случае (см. рис. 3.43) при разумных составах подвижных фаз (при которых фактор удерживания больше 2 и меньше 10) порядок элюирования для соответствующих ДКХ кислот остается неизменным:

$$t_R(3,4\text{diCQA}) < t_R(3,5\text{diCQA}) < t_R(4,5\text{diCQA}).$$

Тем не менее, из-за разности наклонов линий трендов при уменьшении концентрации ацетонитрила произойдет одна инверсия времен удерживания в одной из пар diCQA:

$$t_R(3,5\text{diCQA}) < t_R(3,4\text{diCQA}) < t_R(4,5\text{diCQA}).$$

И, наоборот, в подвижных фазах с большей элюирующей силой (с большей концентрацией ацетонитрила) возможна другая инверсия:

$$t_R(3,4\text{diCQA}) < t_R(4,5\text{diCQA}) < t_R(3,5\text{diCQA}).$$

При этом положение 1,5diCQA в этом ряду зависит от состава подвижной фазы и может существенно изменяться для различных условий элюирования. Т.е. наклон линий относительного удерживания является более информативным свойством по сравнению с порядком элюирования. Следовательно, ацетонитрил, как модификатор подвижной фазы не является удобным для разделения всех изомерных дикофеоилхинных кислот.

Замена ацетонитрила на метанол. Карта разделения для ДКХ кислот при ацетонитрила на метанол представлена на рис. 3.47, а параметры линий трендов - в табл. А.23 (приложение А).

Как видно из представленных данных, такая замена возможна, однако удерживание пары 3,4diCQA и 3,5diCQA также оказываются близкими.

Ситуация меняется при замене ацетонитрила на пропанол-2. Карты разделения для ДКХ кислот при использовании в качестве органического модификатора ацетонитрил и пропанол-2 представлены на рис. 3.48, а параметры линий трендов - в табл. А.24 (приложение А).

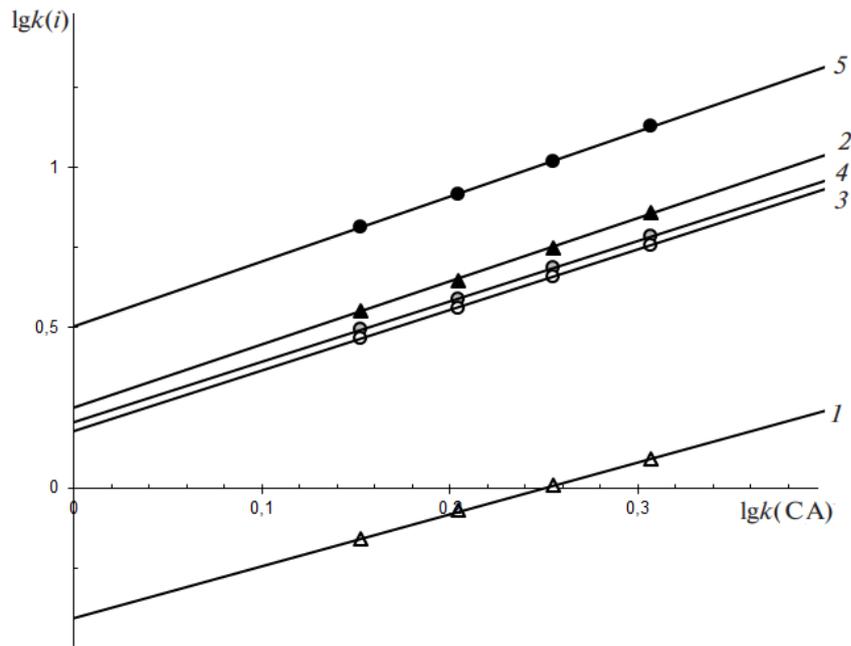


Рисунок 3.47 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «метанол–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

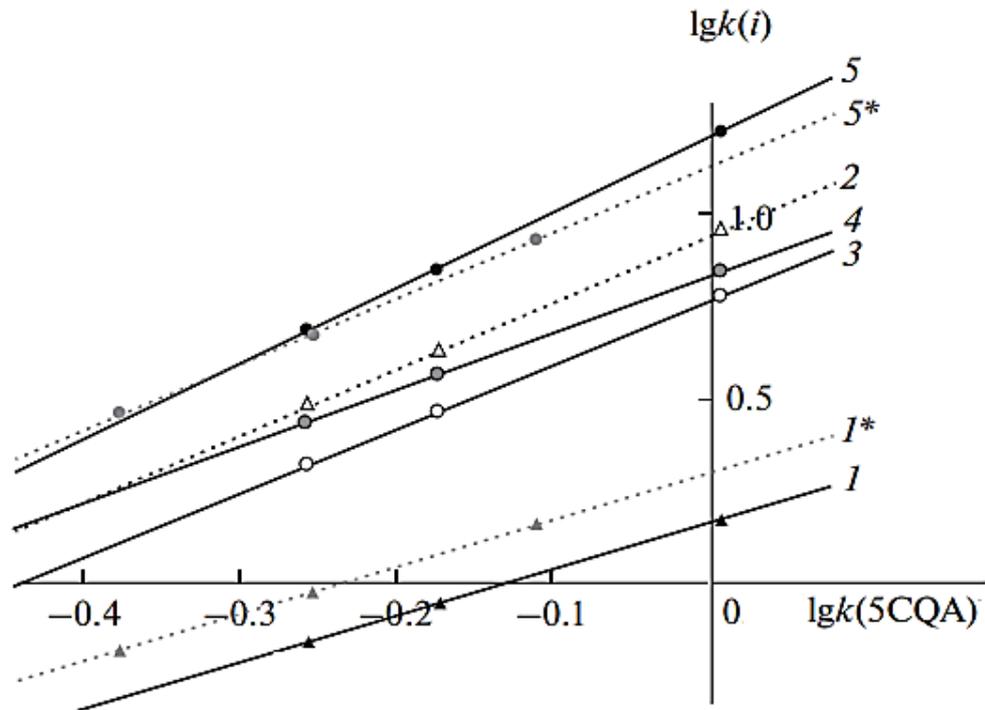


Рисунок 3.48 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе изопропанол–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Звездочкой отмечены линии трендов с рис. 3.42.

Из полученных данных следует, что диапазон времен удерживания пяти изомерных diCQAs расширен по сравнению с элюентной системой, содержащей ацетонитрил, а параметры a_1 оказались немногим больше, что также соответствует одновременной сорбции обеими заместителями кофейной кислоты. При этом заметно изменилось и разделение изомерных ДКХ кислот. Так, существуют диапазоны составов подвижной фазы, в которых полностью разделяются все пять изомеров за время, не превышающее 20 мин.

Замена ацетонитрила на этанол также является еще одним экологически благоприятным вариантом разделения ДКХ кислот, рис. 3.49, табл. А.25 (приложение А).

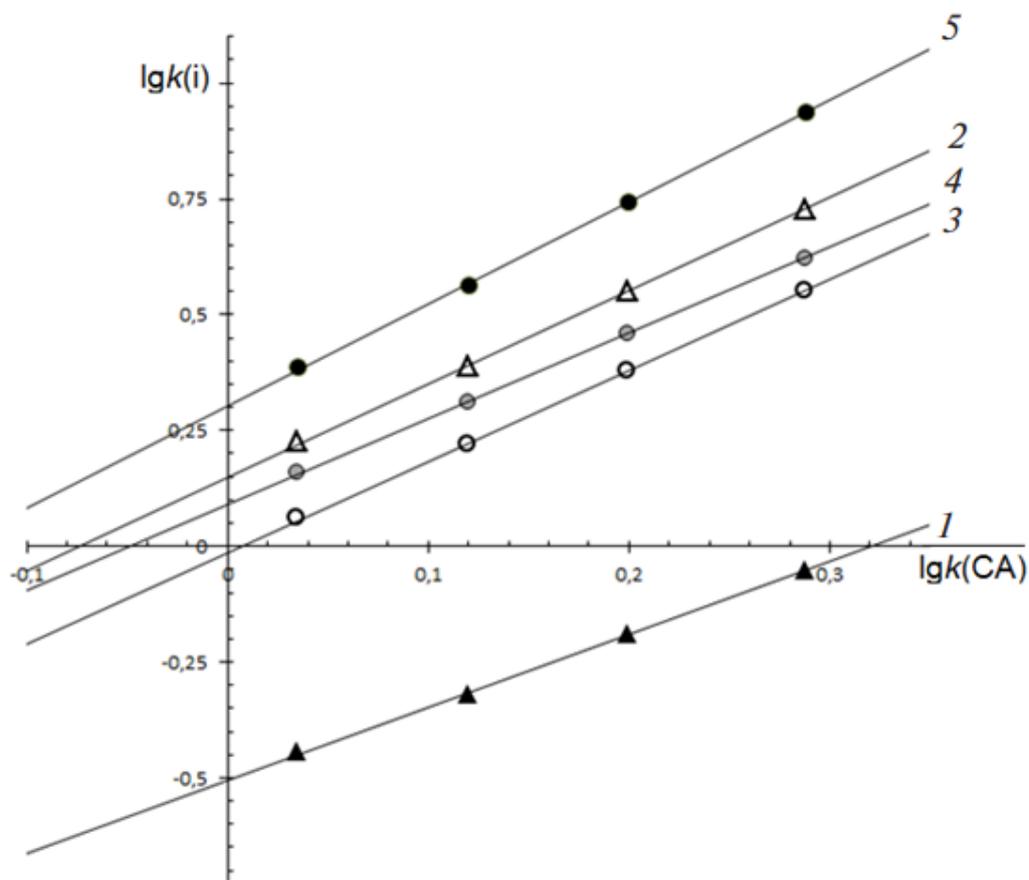


Рисунок 3.49 – Карта разделения ДКХ кислот в элюентной системе этанол–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода для стационарной фазы Kromasil 110-5-C18 при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Из полученных данных следует, что диапазон времен удерживания пяти изомерных diCQAs оказался шире по сравнению с элюентной системой, содержащей как ацетонитрил, так и пропанол-2, а параметры a_1 оказались немногим больше, чем в случае с пропанолом-2, а разделение пяти изомеров дикофеоилхинных кислот улучшилась. Т.е. такая замена позволяет не только исключить использование ацетонитрила, заменив его на

пропанол-2 или этанол (не уступающий по селективности), но и улучшить разделение пяти изомеров дикофеоилхинных кислот.

Таким образом, для определения моно- и дикофеоилхинных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ могут быть использованы следующие элюенты с диапазоном концентраций органических модификатором:

Элюент А: ацетонитрил (19 ÷ 25 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) – вода.

Элюент Б: ацетон (4 ÷ 6.4 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) - вода

Элюент В: пропанол-2 (14 ÷ 20.4 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) - вода

Элюент Г: этанол (22 ÷ 30 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) - вода

Элюент Д: метанол (35.5 ÷ 40 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) – вода

Элюент Е: этилацетат (1.5 ÷ 4 об.%) – ортофосфорная кислота (0.25 об. %) – вода

Проведенный нами анализ (табл 3.2) показывает, что наиболее оптимальным, как с экономической, так и с экологической точки зрения, является использование подвижных фаз на основе этанола с подкислением ортофосфорной кислотой.

Таблица 3.2 – Определение стоимости растворителей, используемых при определении хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой хроматографии в разработанных условиях

Элюент	Класс опасности ОМ	Содержание ОМ, об. %	Время удерживания, мин		Время анализа, мин	Объем, мл*	Цена анализа** руб
			5CQA	4,5diCQA			
А	4	25	3.15	8.31	10	10	427
Б	3	30	3.14	15.25	17	17	246
В	3	20.4	3.12	7.07	9	9	137
Г	4	30	3.19	8.08	10	10	107
Д	3	40	3.81	17.87	20	20	578
Е***	4	2.1	10.44	-	12	9.6	66

* - с учетом скорости подачи подвижной фазы 1 мл/мин,

** - за 100 определений,

*** - не пригоден для элюирования дикофеоилхинных кислот.

3.3 Замена стационарной фазы

3.3.1 Влияние остаточной силанольной активности на разделение монокофеоилхинных кислот и кофеина

Влияние остаточной силанольной активности на разделение монокофеоилхинных кислот. Судя по карте разделения первого типа, рис. 3.50, удерживание 5CQA при одинаковых составах подвижной фазы на основе ацетонитрила с добавками 2 об. % муравьиной кислоты и воды на трех различных марках обращенных C18-фаз возрастает в ряду стационарных фаз:

$$t_R(5CQA)_K < t_R(5CQA)_S < t_R(5CQA)_R,$$

где подстрочные буквы обозначают стационарные фазы:

K - Kromasil 100-5C18,

S - Symmetry C18,

R - Reprosil-Pur C18-AQ.

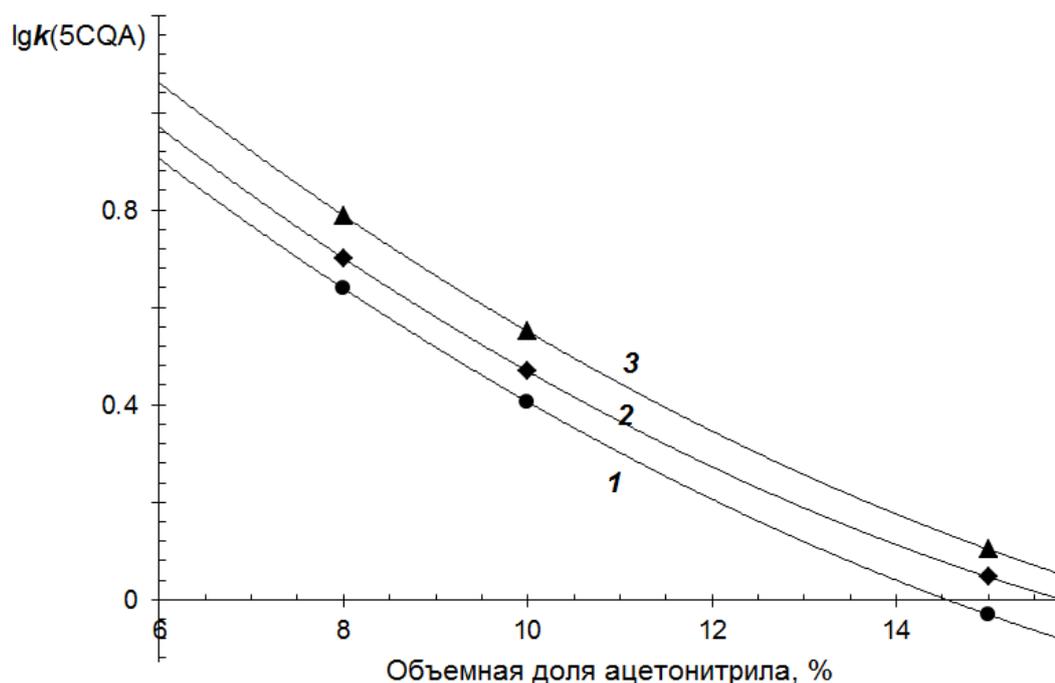


Рисунок 3.50 – Карта разделения 5CQA на стационарных фазах трех марок: 1 - Kromasil 100-5C18; 2 - Symmetry C18 и 3 - Reprosil-Pur C180AQ в подвижных фазах системы «ацетонитрил – 2 об.% муравьиной кислоты – вода».

При этом на карте разделения второго типа, рис. 3.51, Kromasil 100-5C18 и Symmetry C18 оказываются фазами с близкой селективностью относительно разделения трех изомерных монокофеоилхинных кислот. Заметно отличается от них по селективности стационарная фаза Reprosil-Pur C18-AQ, для которой относительное

удерживание и 3CQA и 4CQA уменьшается, создавая проблемы в разделении пары 5CQA и 4CQA.

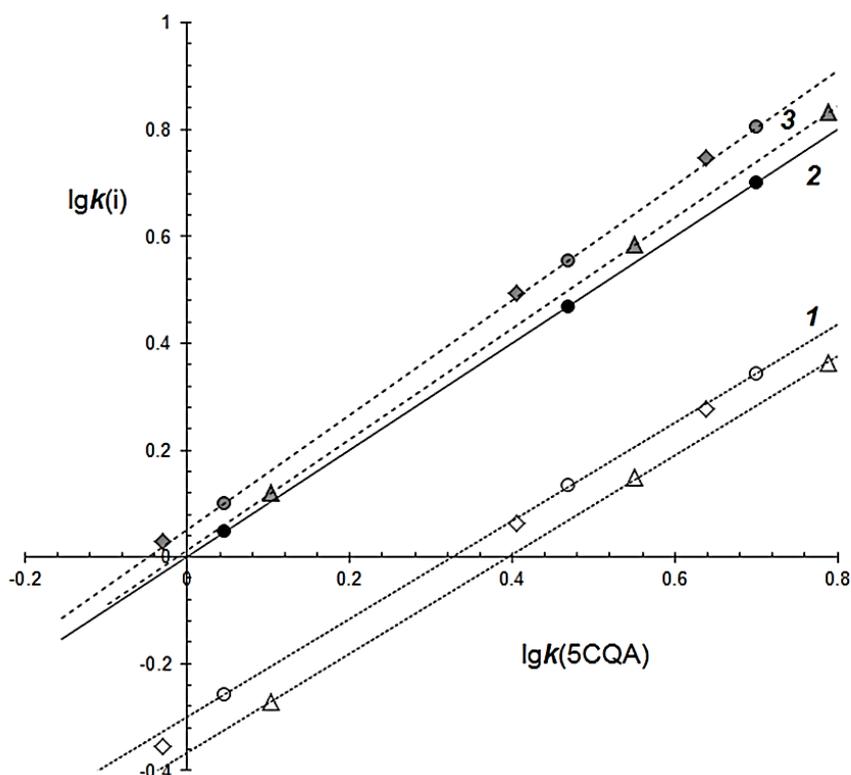


Рисунок 3.51 – Карта разделения хлорогеновых кислот на стационарных фазах Kromasil 100-5C18 (○), Symmetry C18 (◇) и Reprosil-Pur C180AQ (△) в подвижных фазах системы «ацетонитрил – муравьиная кислота – вода». Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA.

Reprosil-Pur C18-AQ (по сведениям производителей) отличается устойчивостью к коллапсу за счет специфического гидрофильного эндкеппинга, и эта особенность фазы привела к изменению разделения изомерных ХК.

Предполагая, что именно свойства подложки, а не привитой фазы, определяют разделение ХК, был выполнен эксперимент по разделению ХК на двух стационарных фазах одного производителя, различие которых могло быть связано с изменением остаточной активности силанольных групп. Для этого была взята новая колонка, заполненная фазой Диасфер-110-C18, и колонка с той же стационарной фазой, но находившаяся в длительном употреблении, включая определение антоцианов. Но определение антоцианов требует использования подвижных фаз с высокой кислотностью – за пределами их устойчивости к гидролизу ($\text{pH} < 2$), что приводит к постепенному «смывают» привитых групп, открывая доступ к силанольным группам силикагеля. И, действительно, разделение пары 4CQA и 5CQA заметно ухудшилось. Более того, при

использовании стационарной фазы Nucleosil RP-C18 (без эндкеппинга) было найдено обращение порядка элюирования изомеров указанной пары, рис. 3.52.

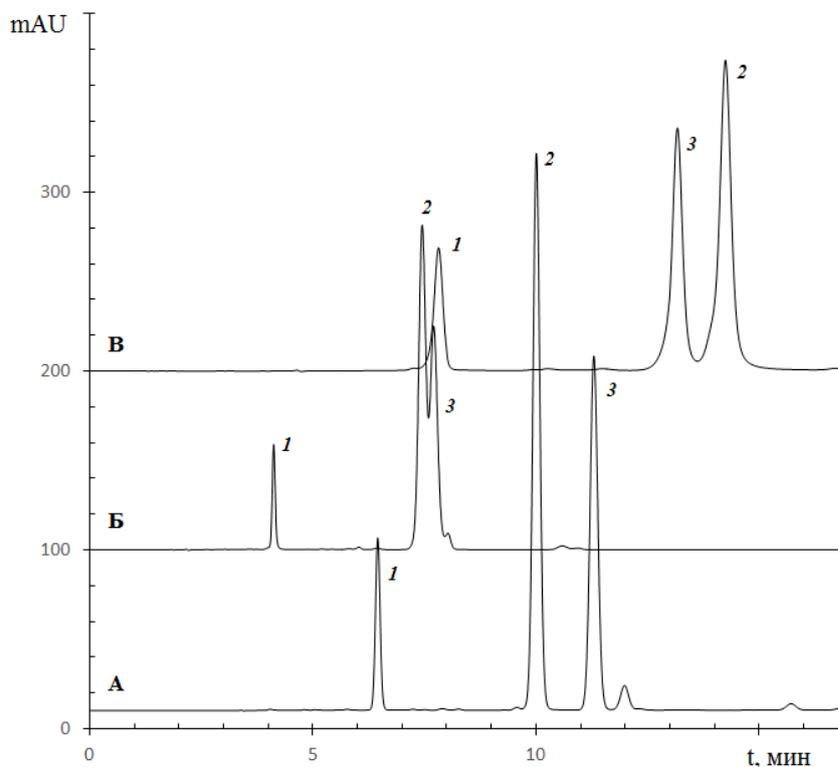


Рисунок 3.52 – Разделение хлорогеновых кислот в подвижной фазе 10 об.% CH_3CN и 1 об.% HCOOH на колонках 4.0×100 мм Диасфер-110-5C18 (А), 4.6×250 мм Диасфер-110-5C18 (Б) и 4.0×250 мм Nucleosil RP-C18 (В). Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA; скорость подвижной фазы 1 мл/мин (А и В), 0.8 мл/мин (Б), хроматограммы записаны при 325 нм.

Повышенная активность остаточных силанольных групп в стационарных фазах с изменением порядка элюирования 4CQA и 5CQA была подтверждена тестом по ранее предложенному способу [287], где исследуется корреляция между удерживанием *para*-толуидина (pT) относительно *para*-крезола (pK) в элюентах, содержащих 20 – 40 об. % ацетонитрила в водном растворе с 0.001 М фосфатным буфером с $\text{pH} = 7$.

$$\lg k(pT) = a \cdot \lg k(pK) + b \quad (3.11)$$

Для фазы 4.0×250 мм Nucleosil RP-C18 удерживание *para*-толуидина оказалось даже большим по сравнению с удерживанием *para*-крезола, и повышенная активность фазы 4.0×100 мм Диасфер-110-5C18 (по сравнению с новой фазой 4.6×250 мм Диасфер-110-5C18) оказалась также весьма заметной, рис. 3.53.

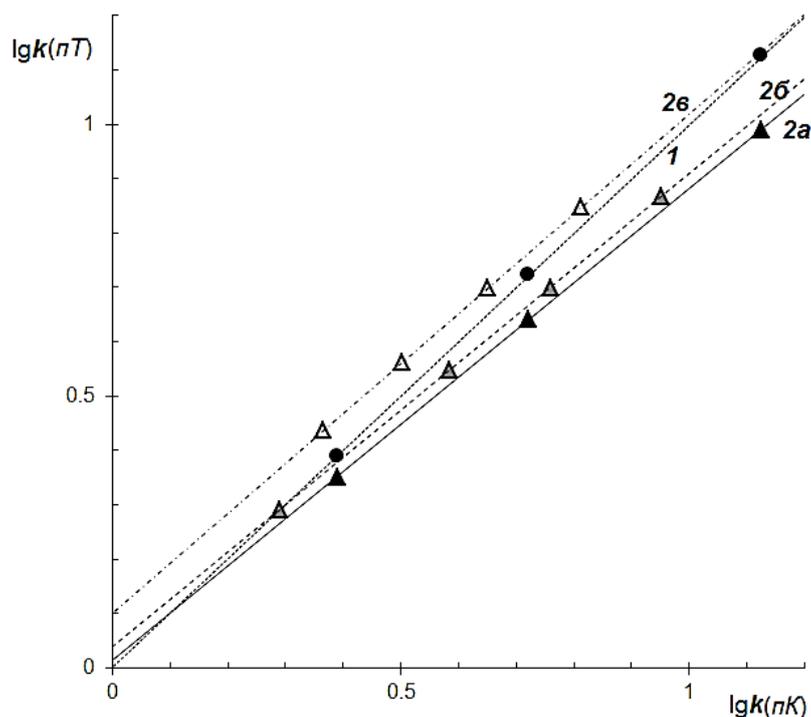


Рисунок 3.53 – Карта разделения *n*-толуидина относительно *n*-крезола.

Соединения: 1 – *para*-крезол (*nK*), 2 – *para*-толуидин (*nT*). 2а – точки для удерживания *para*-толуидина на колонке 4.6×100 мм Kromasil 100-5C18, 2б – на колонке 4.6×250 мм Kromasil 100-5C18, 2в – на колонке 4.0×250 мм Nucleosil RP-C18.

Влияние остаточной силанольной активности на разделение монокофеоилхинных кислот и кофеина. Для стационарной фазы Symmetry C18 на основе пропанола-2 и воды, подкисленной 0.3 об. % фосфорной кислоты зависимость логарифмов факторов удерживания монокофеоилхинных кислот от объемной доли пропанола-2 (от 3 до 5 %) при использовании кофеина в качестве вещества сравнения представлена была представлена ранее (рис. 3.39). При этом зависимость логарифма фактора удерживания 5CQA имела наклон, близкий к координатной биссектриссе. Из этого следует, что каких-либо изменений в разделении трех изомерных монокофеоилхинных кислот и кофеина при изменении концентрации не будет. Т.е. порядок элюирования будет таким: первым элюируется 3CQA, за которой следует кофеин с близкой к нему по удерживанию 5CQA и, наконец, появляется пик 4CQA. Т.е. для данной системы достаточно сопоставить удерживание этих соединений только при одном составе подвижной фазы на различных стационарных фазах при заданной температуре разделения (30°C), рис. 3.54.

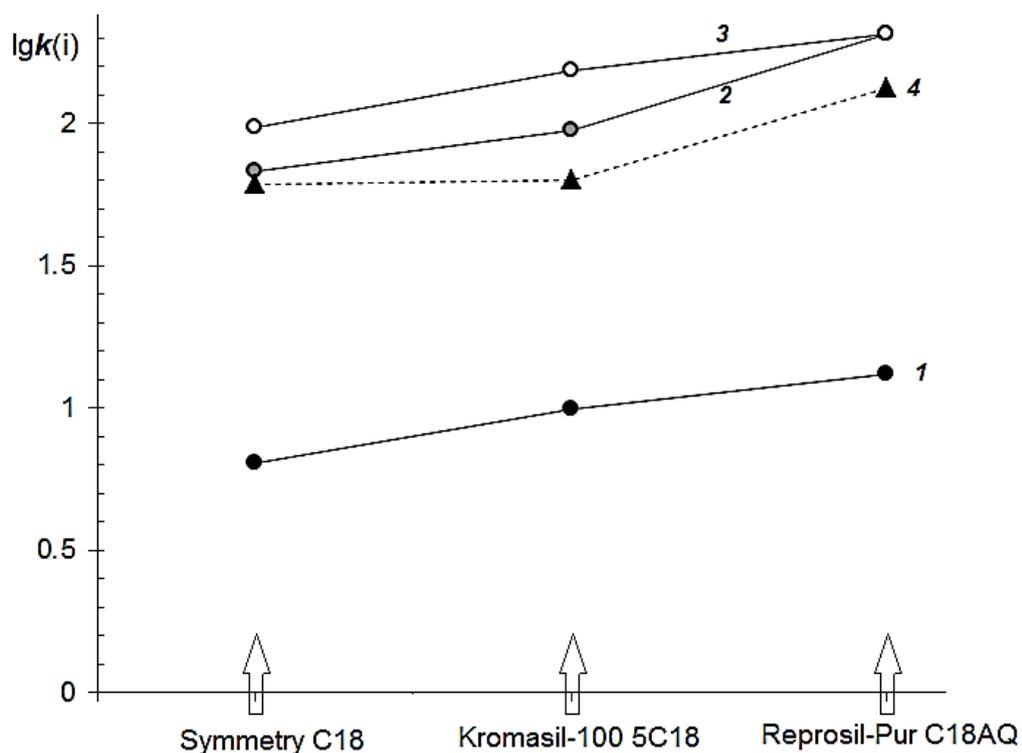


Рисунок 3.54. – Удерживание трех монокофеоилхинных кислот и кофеина на трех стационарных фазах.

Элюент: 4 об.% пропанола-2, 0.3 об.% фосфорной кислоты, вода; 30°C.

Из представленных данных следует, что при переходе от стационарной фазы Symmetry C18 к фазе Kromasil 100-5C18 удерживание всех хлорогеновых кислот несколько увеличивается, а удерживание кофеина остается практически неизменным, что делает именно вторую стационарную фазу наиболее удобной для разделения всех четырех соединений. При переходе к фазе Reprosil-Pur C18AQ удерживание хлорогеновых кислот продолжает увеличиваться, при этом не разделяются 5CQA и 4CQA (вследствие, как было установлено ранее роста активности силанольных групп), поэтому возрастает и удерживание кофеина, как слабого основания (акцептора водородных связей).

3.3.2 Замена стационарных фаз при разделении дикофеоилхинных кислот

Результаты по разделению дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Kromasil 100-C18-5 были представлены ранее (рис.3.50). В соответствии с изложенным выше подходом интерес представляет анализ удерживания на этой и других типах стационарных фаз по картам разделения первого типа – экстраполяционные параметры a_0 указывают на прочность взаимодействия сорбатов с сорбентами при отсутствии органического модификатора в подвижной фазе, табл. А.26 (приложение А).

По представленным данным в элюентах на основе ацетонитрила предельное удерживание изомерных дикофеоилхинных кислот на колонке Kromasil 1000-5C18 располагается в ряду:

$$t_{R(\max)}(4,5\text{diCQA}) > t_{R(\max)}(3,4\text{diCQA}) > t_{R(\max)}(3,4\text{diCQA}).$$

Удерживание на фенил-гексильной фазе. Этот же порядок сохраняется и для других исследованных колонок, но переход к фазе Gemini C6Ph сопровождается заметным падением удерживания, которое даже ниже, чем на стационарной фазе Диасфер C10CN. Следовательно, вклад π -взаимодействий для ароматических колец дикофеоилхинных кислот с фенильными группами привитого слоя невелик.

Параметры линий трендов на картах разделения второго типа в элюентах на основе ацетонитрила в табл. А.27 (приложение А).

Для фенил-гексильной фазы линии трендов для diCQAs имеют заметно меньшие параметры a_1 , чем для C18-фазы. Это можно интерпретировать как меньшую вероятность сорбции дикофеоилхинных кислот двумя радикалами кофейной кислоты одновременно, хотя рост липофильности при переходе от монокофеоилхинных кислот к дикофеоилхинным очевиден. Его можно объяснить ростом вероятности сорбции одним ароматическим кольцом при росте их числа в молекуле.

Как и для C18 стационарной фазы применение подвижной фазы на основе ацетонитрила неэффективно при присутствии всех пяти изомерных кислот вследствие проблем с разделением пары 1,5diCQA и 3,5diCQA, рис. 3.55. Замена ацетонитрила, как компонента, который может обеспечивать π - π -взаимодействия сорбатов с компонентом подвижной фазы, на алифатический спирт (ИПС) должна исключить такие взаимодействия и усилить роль в суммарном удерживании π - π -взаимодействий сорбатов в сорбированном на фенил-гексильной фазе состоянии. Однако эта замена привела только, во-первых, к падению предельной сорбции для всех исследованных стационарных фаз. Из этого следует, что аппроксимация на нулевое содержание органического компонента удерживание в случае органических модификаторов с высокой элюирующей способностью может привести к необычным результатам – нет совпадения с предельным удерживанием с ацетонитрилом. Причины этого эффекта могут быть связаны с небольшой концентрацией этих модификаторов и к влиянию на удерживание эффектов, приводящих к коллапсу фаз. Во-вторых, наблюдается небольшой рост параметров a_1 , табл. А.27 (приложение А), для всех изомерных ДКХ кислот, что свидетельствует о росте числа молекул органического модификатора (ИПС против ацетонитрила), высвобождаемых при сорбции на стационарной фазе.

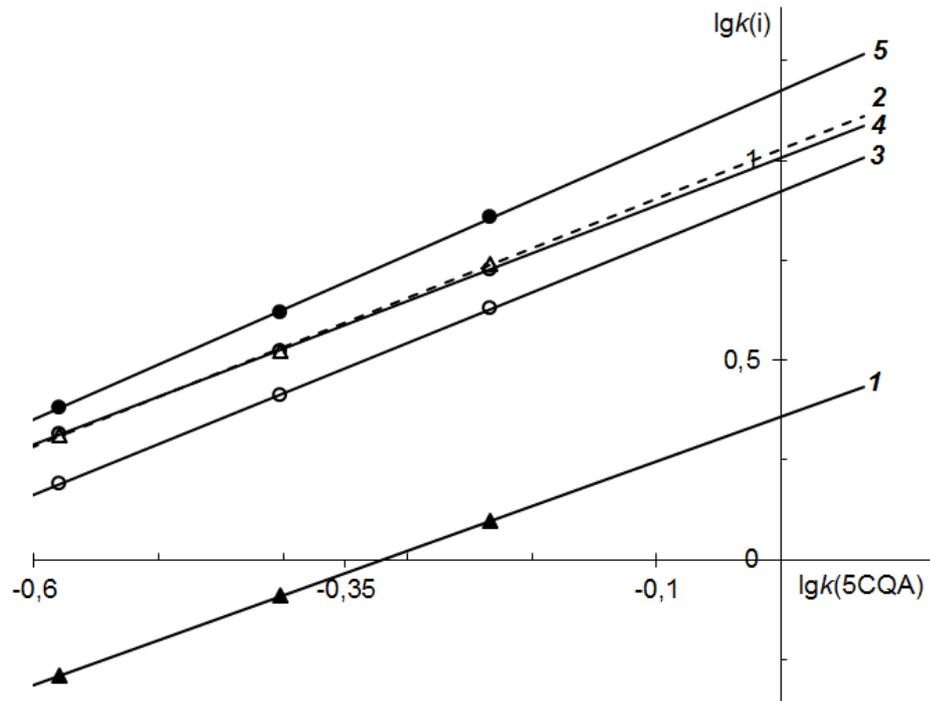


Рисунок 3.55 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «ацетонитрил–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Gemini C6Phenyl при 30°C.
 Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Следовательно, дисперсионные взаимодействия остаются главным типом взаимодействий сорбатов со стационарной фазой, определяющих их удерживание. Поэтому и порядок элюирования изомерных ДКХ кислот мало изменился – только относительное удерживание 1,5diCQA существенно снизилось, создавая новую проблемную пару с 3,4diCQA, рис 3.56.

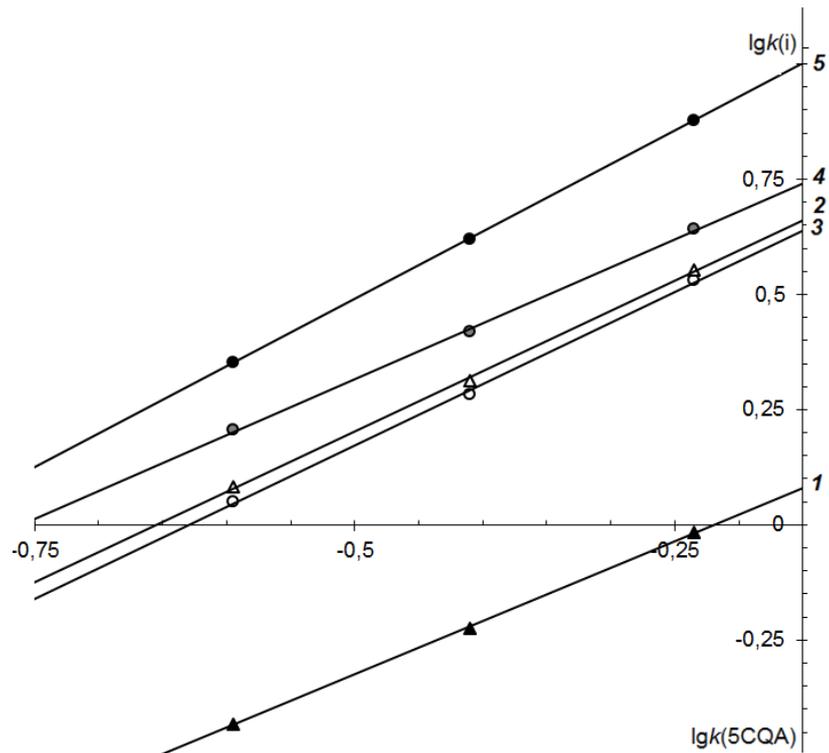


Рисунок 3.56 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «пропанол-2–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Gemini C6Phenyl при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Удерживание на алкил-нитрильной фазе. Использование стационарной фазы Диасфер C10CN 4.0×150 мм привело к появлению новой проблемной пары – 3,4diCQA и 3,5diCQA. Анализируя карты разделения, рис. 3.57, можно подобрать состав подвижной фазы, при которых будет достигнуто разделение изомеров. В данном случае необходимая доля ацетонитрила должна составлять порядка 20 об.% элюентной системы.

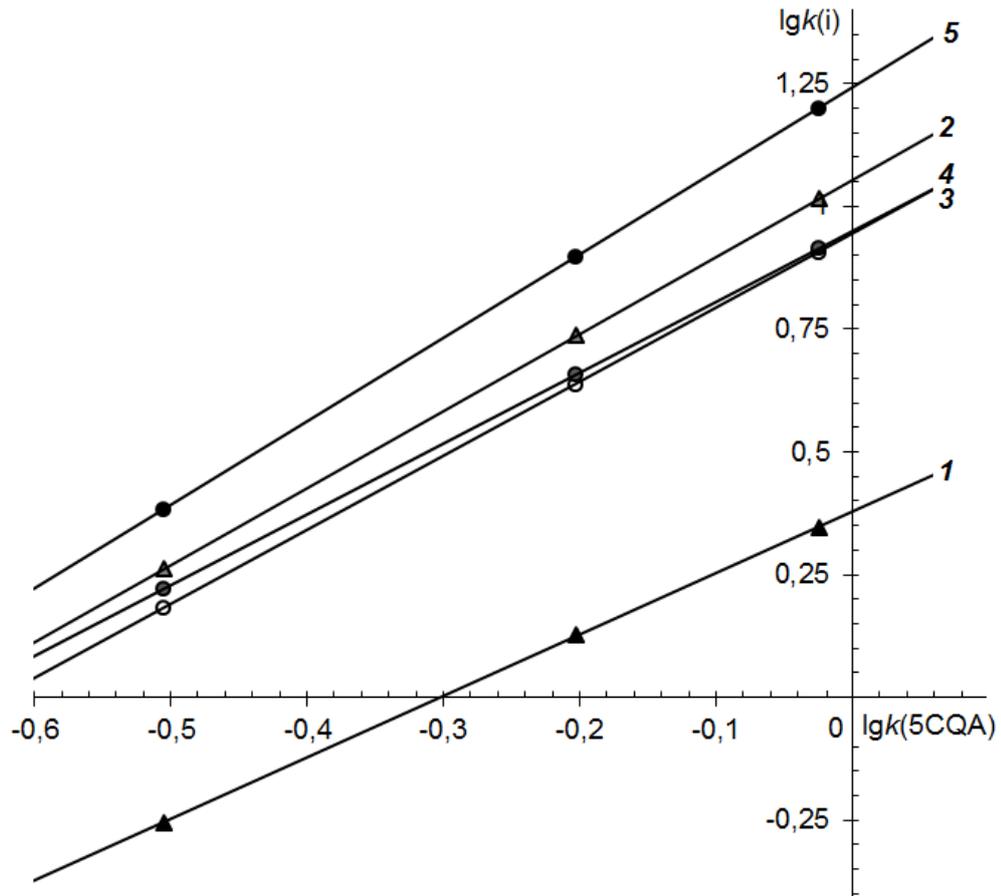


Рисунок 3.57 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «ацетонитрил–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Диасфер С10СN 4.0×150 мм при 30°С. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Замена ацетонитрила на пропанол-2 не только не способствовало полному разделению всех изомеров (проблемной оказалась пара 1,5diCQA и 3,4diCQA, рис. 3.58, но и привела к изменению порядка удерживания:

$$t_R(1,3diCQA) < t_R(1,5diCQA) < t_R(3,4diCQA) < t_R(3,5diCQA) < t_R(4,5diCQA).$$

Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Диасфер С10СN представлены в табл. А.28.

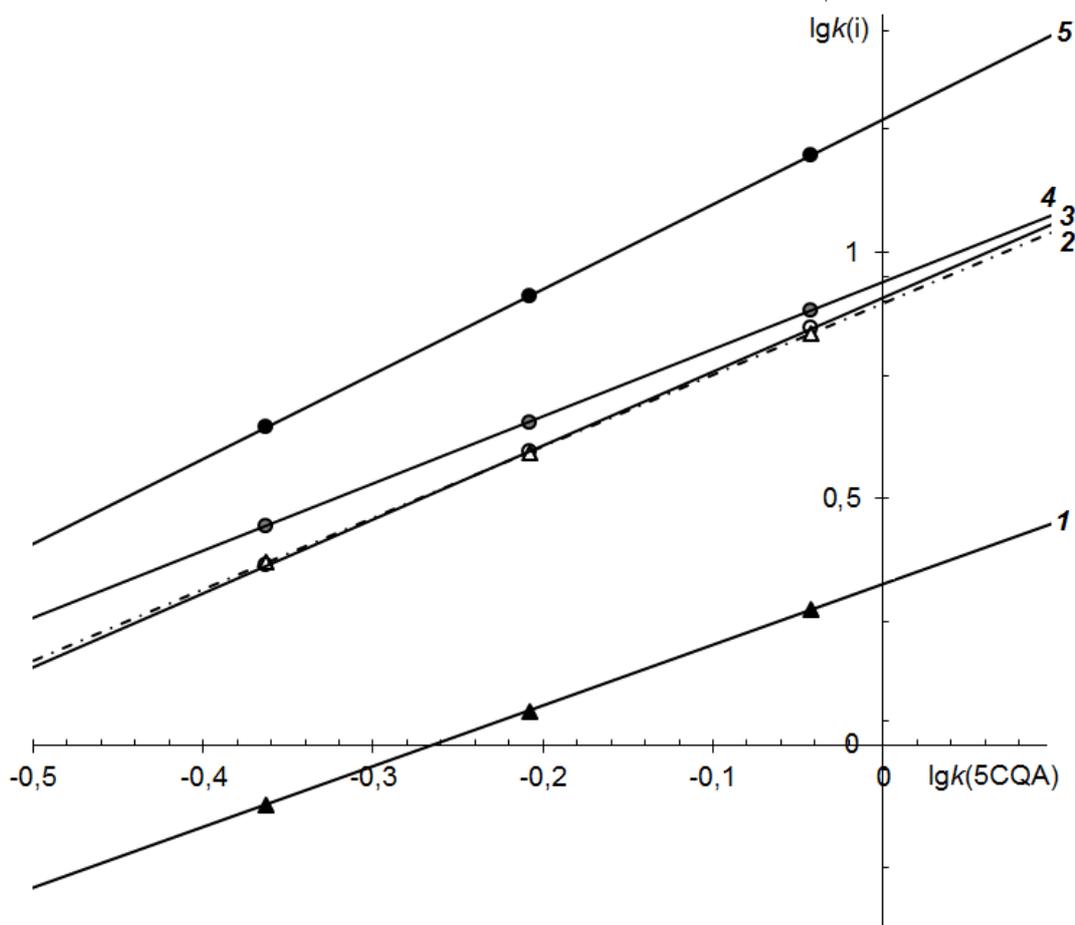


Рисунок 3.58 – Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «пропанол-2–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Диасфер С10СN 4.0×150 мм при 30°С. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Удерживание на обращенной стационарной фазе с гидрофильным эндкеппингом. В случае стационарной фазы Reprosil-Pur C18AQ 4.6×100 мм в системе «ацетонитрил–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» близкие значения времени удерживания оказались для пары 1,5diCQA и 3,5diCQA, рис. 3.59, а порядок элюирования всех изомеров оказался следующим:

$$t_R(1,3diCQA) < t_R(3,4diCQA) < t_R(3,5diCQA) < t_R(1,5diCQA) < t_R(4,5diCQA).$$

Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхиновых кислот на стационарной фазе Reprosil-Pur C18AQ представлены в табл.А.29.

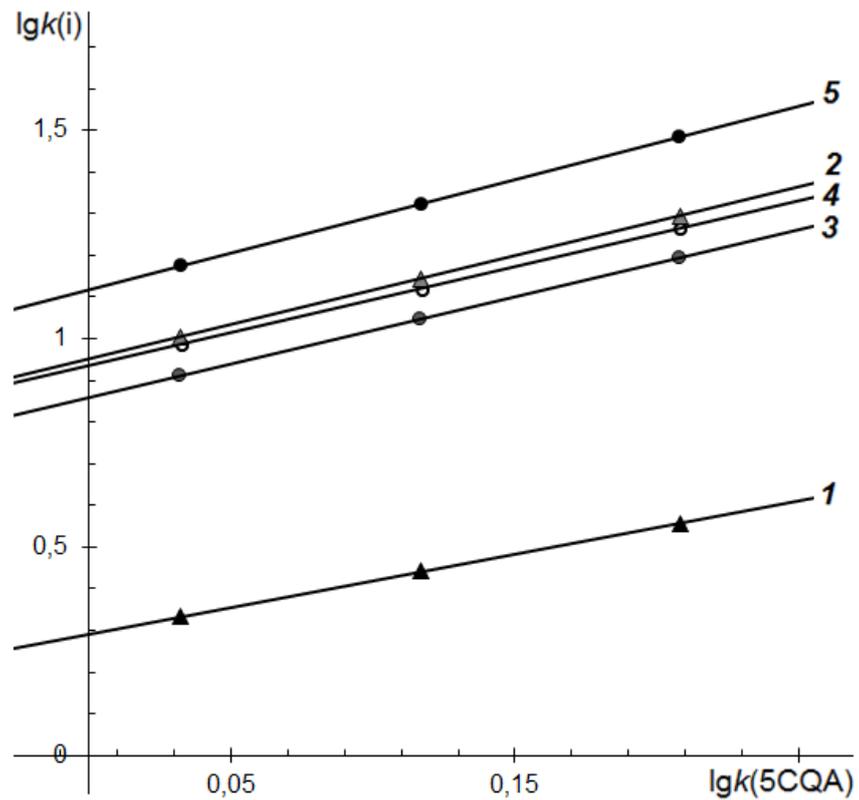


Рисунок 3.59– Карта разделения ДКХ-кислот в элюентной системе «ацетонитрил–0.25 об. % фосфорной кислоты–вода» для стационарной фазы Reprosil-Pur C18AQ 4.6×100 мм при 30°C. Вещества: 1 – 1,3diCQA; 2 – 1,5diCQA; 3 – 3,4diCQA; 4 – 3,5diCQA; 5 – 4,5diCQA.

Таким образом, наиболее эффективной альтернативой стационарной фазе Kromasil 110-5-C18 может стать фенилгексильная фаза.

3.4 Изменение рН

3.4.1 Влияние изменения рН на удерживание монокофеоилхинных кислот

Результаты исследования хроматографического поведения 3CQA, 5CQA и 4CQA на C18-фазе (Kromasil 100-5C18) в подвижных фазах с фосфатными буферами с заданным рН представлены на рис. 3.60.

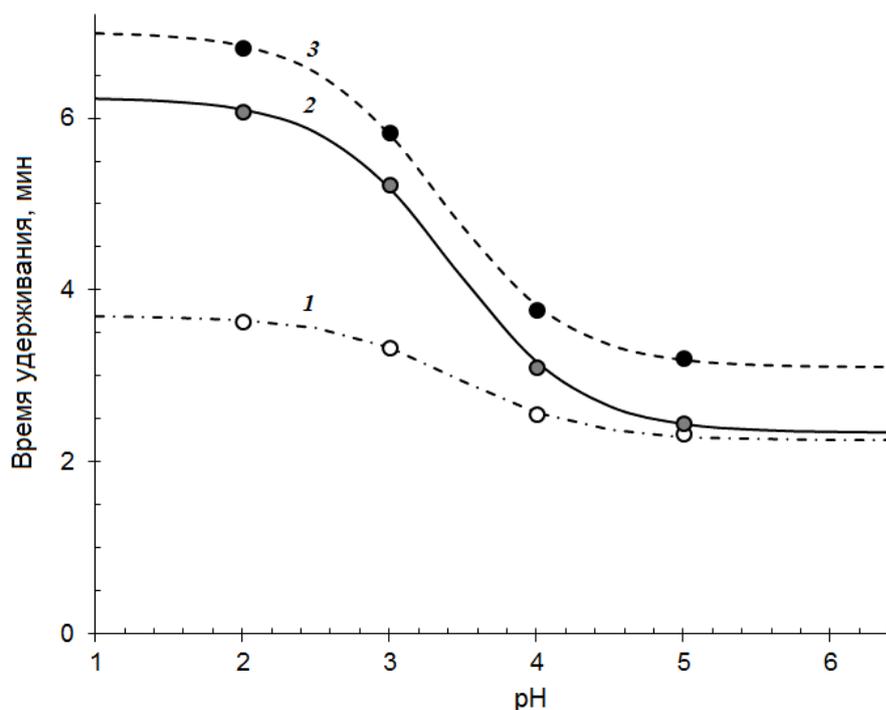


Рисунок 3.60 – Зависимость удерживания хлорогеновых кислот от pH подвижной фазы.

Вещества: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA; 3 – 4CQA, температура 30°C. Подвижные фазы: 10 об. % CH₃CN и 0.01 М фосфатный буфер. Детектор: 325 нм.

Из представленных данных следует, что, во-первых, pH ≤ 2 – условия практически полного подавления диссоциации этих трех изомерных кислот – в этом диапазоне наблюдается наибольшая липофильность всех трех изомерных кислот. Во-вторых, с ростом pH удерживание, естественно, падает вследствие ионизации карбоксильной группы и связанного с этим падением липофильности сорбатов.

Для ионизируемых соединений НА время удерживания зависит от удерживания обеих форм, - незаряженной (НА) и заряженной (А⁻), связанных константой равновесия (при пренебрежении коэффициентами активности):



$$K_a = \frac{[A^-] \cdot [H^+]}{[HA]}.$$

$$[A_{\Sigma}] = [HA] + [A^-].$$

$$k[A_{\Sigma}] = k_{HA} \cdot \alpha[HA] + k_A \cdot \alpha[A^-].$$

$$\alpha[HA] = \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]} = \frac{1}{1 + \frac{[A^-]}{[HA]}} = \frac{1}{1 + \frac{K_a}{[H^+]}} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a}.$$

$$\alpha[A^-] = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} = \frac{K_a}{[H^+] + K_a}$$

$$k[A_\Sigma] = k_{HA} \cdot \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} + k_A \cdot \frac{K_a}{[H^+] + K_a} = \frac{k_{HA} \cdot [H^+] + k_A \cdot K_a}{[H^+] + K_a}$$

Определив для каждого из изомеров факторы удерживания каждой из форм (справа и слева на графиках на рис. 3.60), можно подобрать константы диссоциации. K_a для каждой из трех кислот, которые в данном случае оказываются примерно одинаковыми: $K_a = (2.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$.

Для объяснения порядка элюирования изомерных монокофеилхинных кислот и специфики изменения удерживания при изменении рН рассмотрим их строение (оптимизированное программой AM1 в ПО HyperChem 8.0), рис. 3.61.

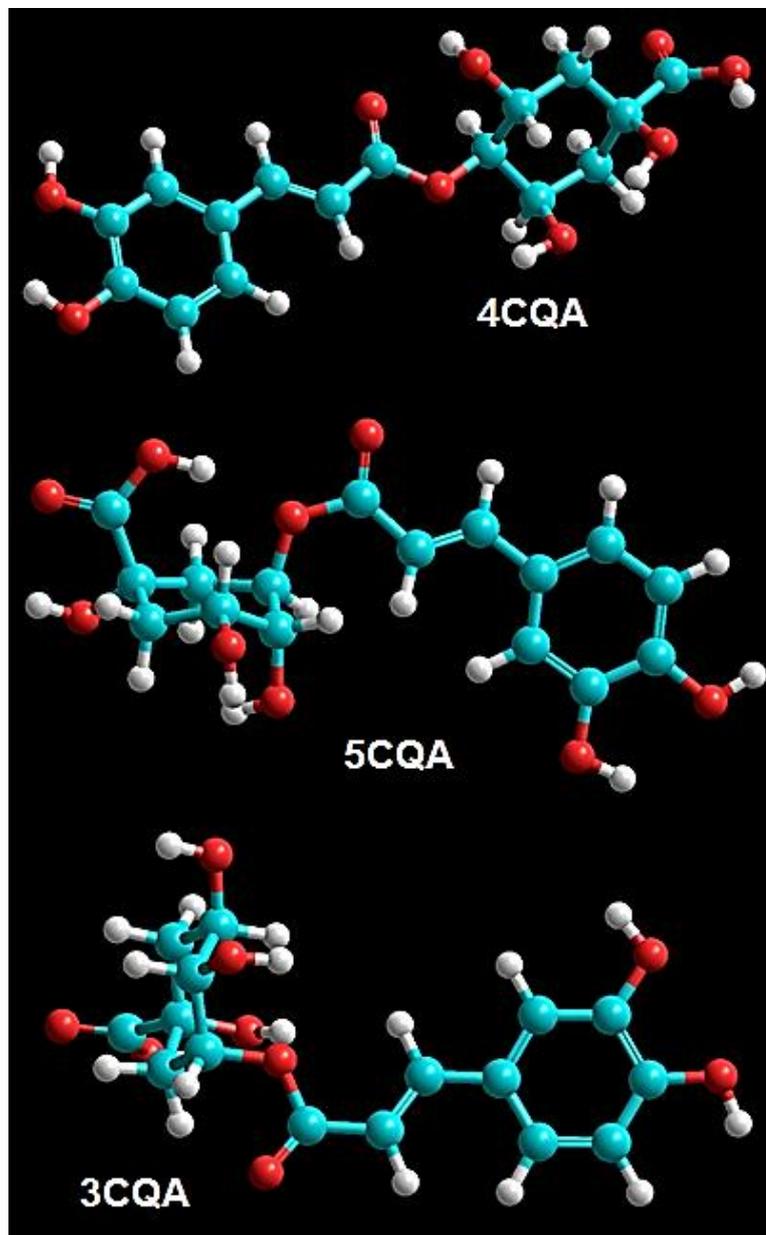


Рисунок 3.61 – Структуры некоторых конформеров монокофеилхинных кислот

Так, оптимизированная структура 4CQA соответствует наибольшему удалению карбоксильной группы от радикала кофейной кислоты, обеспечивая молекуле структуру, наиболее приближенную к плоской, что позволяет молекуле более проникать в привитой слой по сравнению с другими изомерами. Для 5CQA карбоксильная группа направлена в сторону радикала кофейной кислоты, поэтому именно для 5CQA наблюдается наибольшее падение удерживания при повышении pH вследствие ионизации (и роста гидрофильности). Для 3CQA проникновение в привитой слой затруднено практически перпендикулярной ориентацией радикала хинной кислоты по отношению к радикалу кофейной кислоты. Следствие этого – существенно более слабое удерживание именно данного изомера.

3.4.2 Влияние изменения pH на удерживание дикофеоилхинных кислот

Изменение времен удерживания дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Kromasil 300-5-C4 в подвижных фазах, содержащих 15 об.% ацетонитрила при различных pH (фосфатного буфера) представлено в табл. А.30.

Из представленных данных следует, что:

- во-первых, времена удерживания изменяются для всех изомеров;
- во-вторых, для перехода от pH 2.34 до pH 5.90 уменьшение времен различно для всех изомеров: для 3,4diCQA падение удерживания уменьшилось в 2.05 раза, для 3,5diCQA – в 2.34, для 1,5diCQA – в 2.28, для 4,5diCQA – в 5.53.
- в-третьих, наибольшее падение удерживания наблюдается у изомеров, у которых один из радикалов кофейной кислоты находится в положении 5 хинной кислоты, а самое большое падение удерживания получено для изомера 4,5diCQA, что находится в полном соответствии результатами, которые можно было бы предсказать в предположении аддитивности вкладов радикалов кофейной кислоты в зависимости от их нахождения в молекуле.

При этом изомеры, содержащие один из радикалов в положении 1 могут быть обнаружены при подборе константы диссоциации по предложенным выше уравнениям. Так для изомеров 1,5diCQA (и 1,3CQA) лучшее приближение к экспериментальным данным получено при $K_a = (5.0 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$, тогда как для остальных изомеров эта константа оказывается примерно вдвое ниже $K_a = (2.5 \pm 0.5) \cdot 10^{-4}$, рис. 3.62.

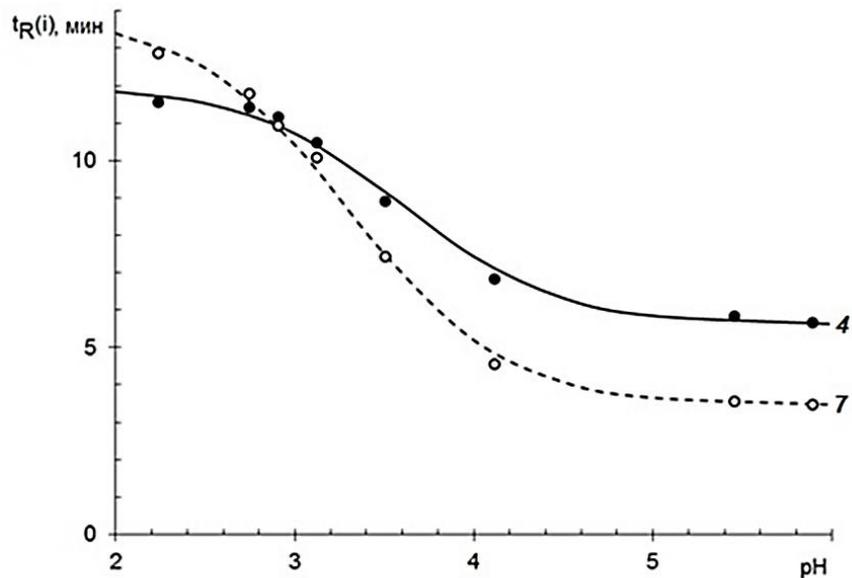


Рисунок 3.62 – Зависимость удерживания двух дикофеоилхинных кислот от pH подвижной фазы.

Вещества: 4 – 1,3diCQA; 7 – 1,5diCQA

Это объясняется повышением кислотности карбоксильной группы молекулы хинной кислоты при ацилировании OH-группы в положении 1 кофейной кислотой.

3.5 Зависимость удерживания и разделение сорбатов от изменения температуры

Влияние температуры на разделение соединений удобно рассматривать, анализируя графики Вант Гоффа, т.е. зависимость натурального логарифма фактора удерживания сорбата от обратной абсолютной температуры по уравнению:

$$\ln k(i) = -\frac{\Delta H(i)}{R} \cdot \frac{1}{T} + \frac{\Delta S(i)}{R} + \ln \Phi, \quad (3.12)$$

где $\Delta H(i)$ – изменение энтальпии переноса сорбата i с подвижной фазы на стационарную (в предположении независимости этого параметра от температуры), $\Delta S(i)$ – изменение энтропии в этих же условиях, Φ – фазовое соотношение колонки.

Если энтальпии переносов для любой пары веществ сильно различаются, то возможно изменение в их разделения при изменении температуры разделения.

3.5.1 Разделение антоцианов плодов черники и голубики

Контроль антоцианового состава черники (как и голубики) осложнен многокомпонентностью: в плодах синтезируются по три моногликозида: 3-галактозиды

(3Gala), 3-глюкозиды (3Glu) и 3-арабинозиды (3Ara) пяти агликонов (антоцианидинов): трех основ дельфинидинового ряда – дельфинидина (Dp), петунидина (Pt) и мальвидина (Mv) и двух производных цианидинового ряда - цианидина (Cy) и пеонидина (Pn).

При этом удерживание (t_R) однотипных гликозидов (3Gly) производных этих антоцианидинов существенно различается, возрастая в ряду:

$$t_R \text{ Dp3Gly} < t_R \text{ Cy3Gly} < t_R \text{ Pt3Gly} < t_R \text{ Pn3Gly} < t_R \text{ Mv3Gly}.$$

Однако разделения всех 15 компонентов добиться не просто, рис.3.63.

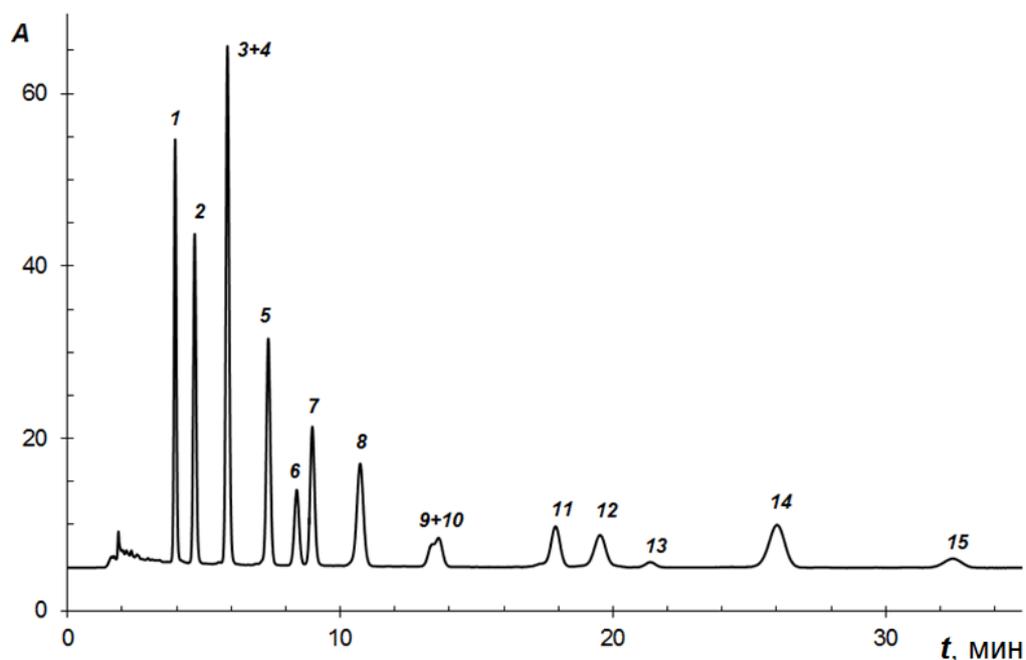


Рисунок 3.63 – Разделение 15 антоцианов экстракта плодов черники в изократических условиях. Антоцианы: 1 – Dp3Gala; 2 – Dp3Glu; 3 – Dp3Ara; 4 – Cy3Gala; 5 – Cy3Glu; 6 – Pt3Gala; 7 – Cy3Ara; 8 – Pt3Glu; 9 – Pn3Gala; 10 – Pt3Ara; 11 – Pn3Glu; 12 – Mv3Gala; 13 – Pn3Ara; 14 – Mv3Glu; 15 – Mv3Ara. Элюент: 6 об.% CH₃CN, 10 об.% HCOOH в воде; расход элюента 0.8 мл/мин, 40°C. Длина волны детектора 515 нм.

Так в большинстве опубликованных работ удерживание некоторых компонентов совпадает. Разделение отдельных смесей 3-галактозидов, 3-глюкозидов или 3-арабинозидов осуществляется легко при любых концентрациях ацетонитрила в подвижной фазе в указанном выше порядке. Однако разделение всех пятнадцати компонентов антоцианового комплекса плодов черники проблематично. Так, например, при содержании CH₃CN 6 об.% на хроматограмме удается обнаружить 13 пиков вместо пятнадцати – Dp3Ara и Cy3Gala, как и пара Pn3Gala и Pt3Ara не разделяются, рис. 3.63.

Для отыскания возможности разделения всех 15 гликозидов следует проанализировать карту разделения в варианте относительного удерживания, рис. 3.64).

Для ее построения использовали несколько различных составов подвижной фазы (по содержанию CH_3CN) в изократическом режиме, выбрав в качестве реперного соединения цианидин-3-глюкозид.

Очевидно, что для разделения первой из выше указанных пар антоцианов необходимо использовать подвижные фазы с небольшим содержанием ацетонитрила, но при этом появляются новые проблемные пары вследствие множественных сближений и пересечений линий трендов на рис. 3.64. Следовательно, для разделения следует подобрать градиентный режим с низким содержанием ацетонитрила в стартовом составе

Выбор градиентного режима. Можно предложить несколько различных режимов градиентного элюирования, обеспечивающих разделение всех 15 компонентов, начиная с подвижных фаз с относительно небольшой элюирующей способностью (с содержанием 4 об.% ацетонитрила и даже без него в стартовом элюенте), рис. 3. 64.

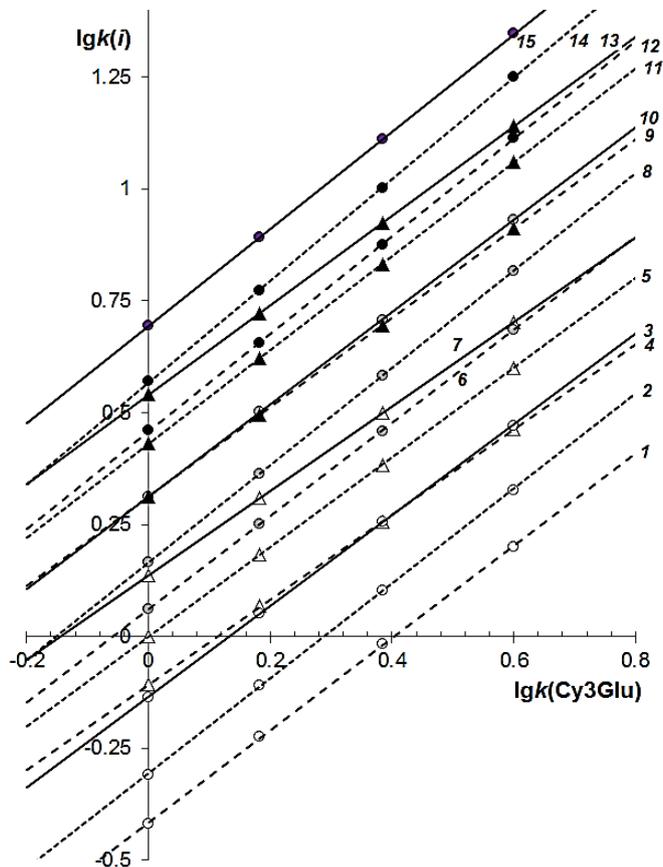


Рисунок 3.64 – Карта разделения антоцианов экстракта плодов черники при использовании системы CH_3CN – HCOOH (10 об.%)– H_2O в качестве элюента. Обозначения 1–15 см. в подписи к рис. 3.63.

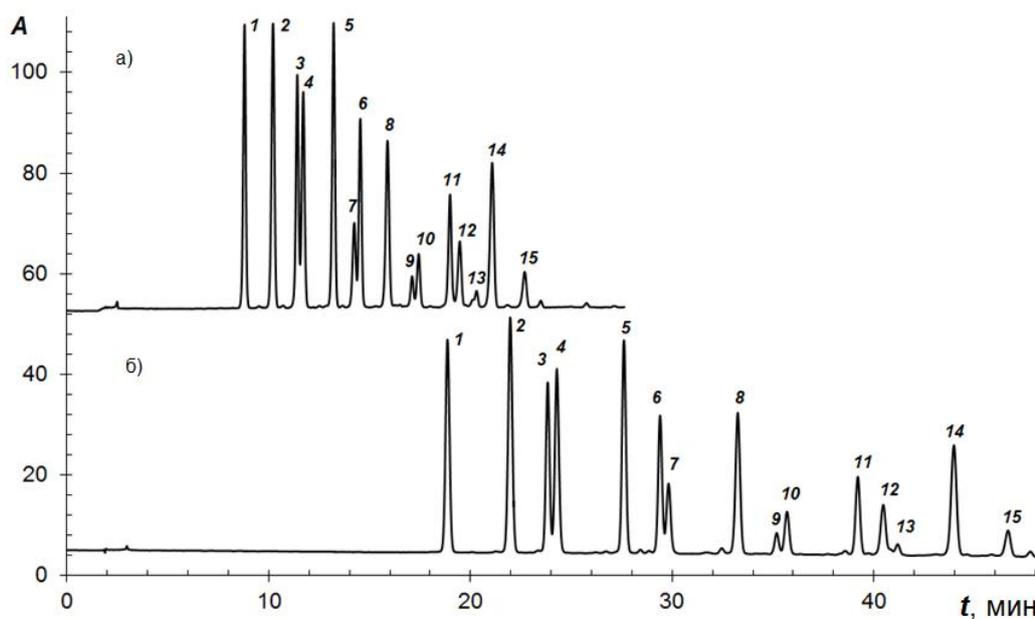


Рисунок 3.65 – Разделение антоцианов плодов черники в градиентных режимах Г1 (а) и Г2 (б) при 40°C. Обозначения 1–15 см. в подписи к рис. 3.63.

Влияние температуры термостата колонок на разделение. В рассмотренных выше изократических и градиентном составах подвижных фаз использовали температуру 40°C, выбор которой никак не обосновывался, хотя температура может быть одной из величин, влияющих на разделение компонентов сложных смесей.

Установлено, что при росте температуры термостата колонки удерживание 3-галактозидов уменьшается в большей степени по сравнению с удерживанием соответствующих 3-арабинозидов, а при уменьшении температуры порядок элюирования должен измениться на противоположный. Это подтверждено экспериментально – при 25°C все 15 компонентов разделяются даже в изократическом режиме, например, в элюенте, содержащем 6 об.% CH_3CN и 10 об.% HCOOH в воде (рис. 3.66). Для уменьшения продолжительности записи хроматограммы можно применять градиентный режим Г3.

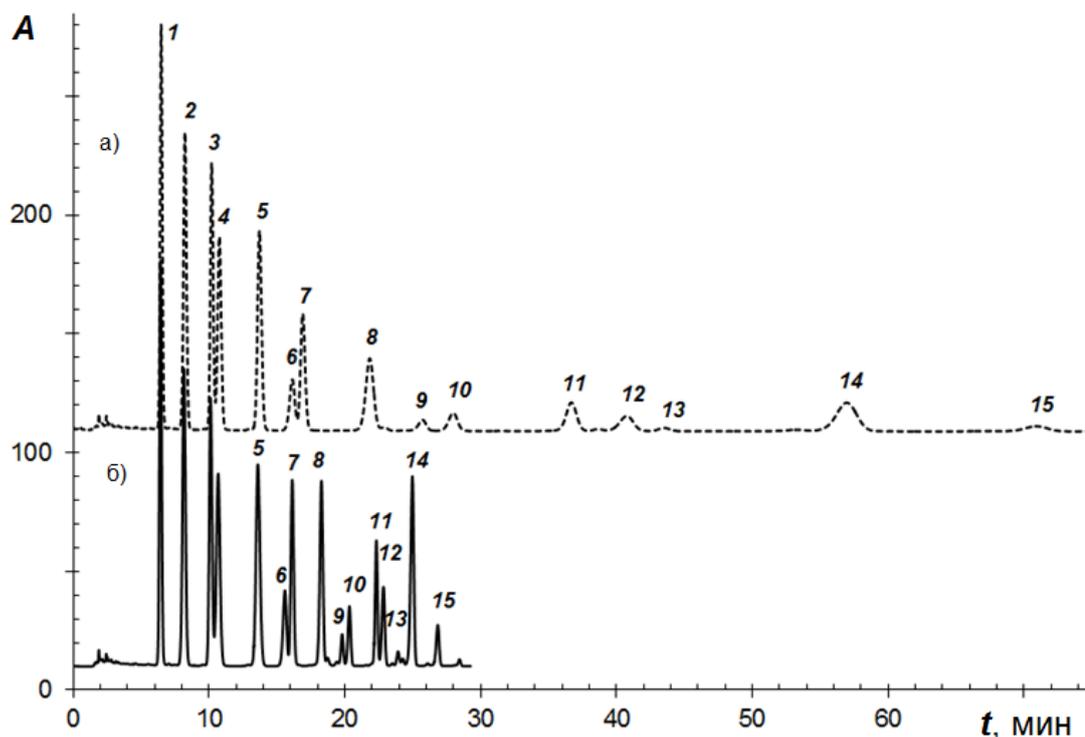


Рисунок 3.66 – Разделение антоцианов плодов черники в изократическом и градиентном режимах при 25°C. (а) – изократический режим, элюент – 6 об.% CH_3CN и 10 об.% HCOOH в воде; (б) – градиентный режим ГЗ. Обозначения 1–15 см. в подписи к рис. 3.63.

Таким образом, разделение всех 15 антоцианов экстракта плодов черники возможно при использовании системы “ $\text{CH}_3\text{CN}-\text{HCOOH}-\text{H}_2\text{O}$ ” в качестве элюента.

3.5.2 Разделение хлорогеновых кислот и кофеина

На фазах Symmetry C18 (рис. 3.67), Kromasil C18 (рис. 3.68) и Reprosil-Pur C18-AQ (рис. 3.69) степень разделения кофеина с хлорогеновыми кислотами существенно различается, но изменение удерживания при изменении температуры имеет одинаковое влияние на относительное удерживание соединений.

В данном случае проблемы могут быть решены изменением температуры, но при строгом контроле состава подвижной фазы, поскольку возможны две инверсии времен удерживания.

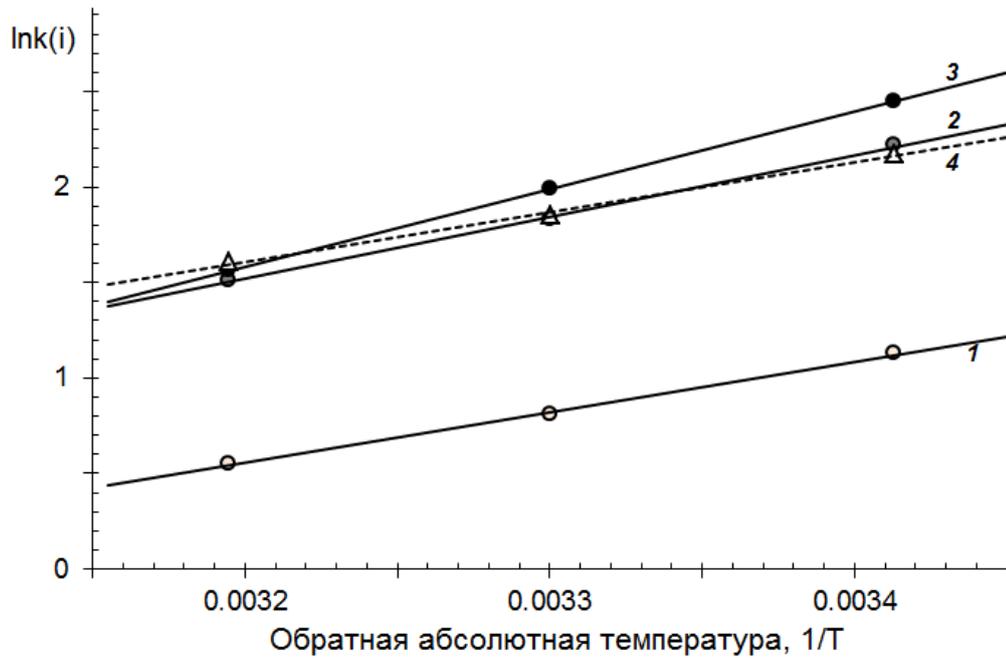


Рисунок 3.67– График Вант Гоффа для разделения хлорогеновых кислот и кофеина в подвижной фазе «6 об. % ацетонитрила – 0.3 об. % ортофосфорной кислоты – вода» на стационарной фазе Symmetry C18

Вещества: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 5 - кофеин

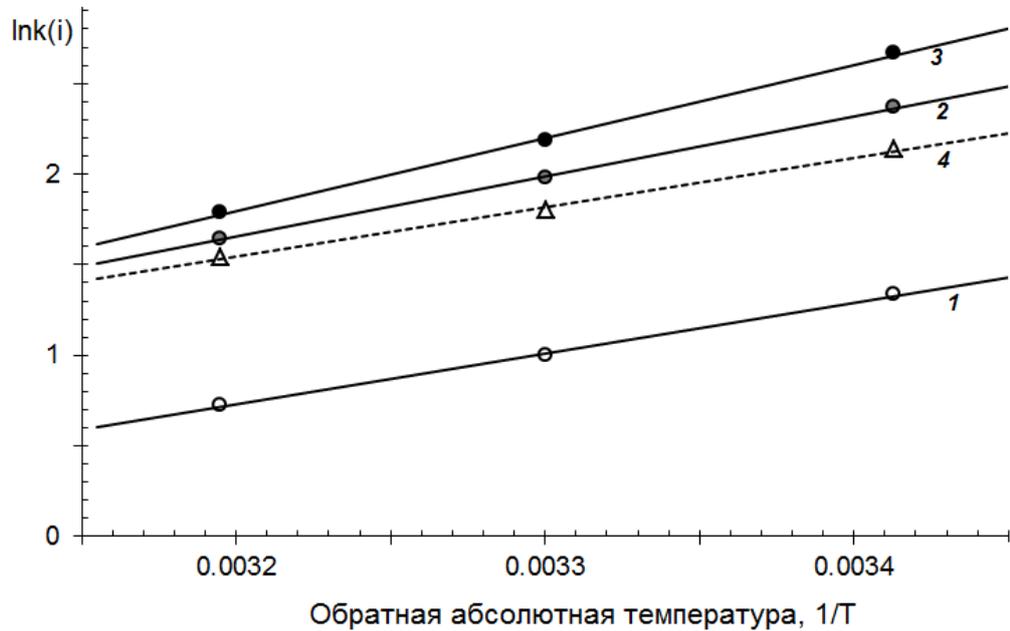


Рисунок 3.68 – График Вант Гоффа для разделения хлорогеновых кислот и кофеина в подвижной фазе «6 об. % ацетонитрила – 0.3 об. % ортофосфорной кислоты – вода» на стационарной фазе Kromasil C18. Вещества: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 5 - кофеин

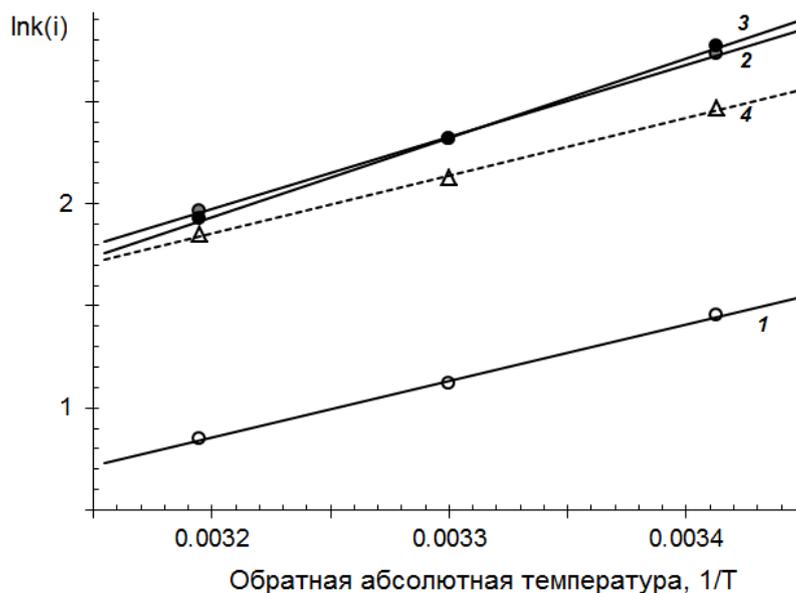


Рисунок 3.69 – График Вант Гоффа для хлорогеновых кислот и кофеина в подвижной фазе «6 об. % ацетонитрила – 0.3 об. % ортофосфорной кислоты – вода» на стационарной фазе Reprosil-Pur C18-AQ.

Соединения: 1 – 3CQA, 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 5 - кофеин

По представленным данным понятно, что изменение энтальпий переноса всех веществ отрицательны, т.е. сорбция экзотермическая - энергия сольватации в сорбированном состоянии выше, чем в фазе раствора. При этом выигрыш энергии при сорбции кофеина ($\Delta H = -19.0$ кДж/моль) меньше, чем при сорбции 5CQA ($\Delta H = -24.7$ кДж/моль). Поэтому повышение температуры до 40 – 50°C (перемещение по рис. 3.69 влево) может позволить разделить эти два соединения. Принципиально разделение возможно и при снижении температуры (перемещение вправо по рис. 3.69), но в этом случае время необходимое для хроматографирования будет большим.

Разделение всех компонентов с наибольшей эффективностью происходит на стационарной фазе Kromasil C18. Следовательно, выбор марки стационарной фазы даже заданного типа может иметь большое значение для оптимизации разделения сложных смесей.

3.6 Контроль разделения дикофеоилхинных кислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ с β -циклодекстрином в подвижной фазе

Добавление циклодекстринов в подвижную фазу, как указывалось в ч.1, может добиться лучшего разделения некоторых целевых компонентов. Но при добавлении циклодекстринов в подвижную фазу возможно *in situ* модифицирование стационарной фазы C18 [138], поэтому нами была использована колонка C4. В настоях кофе [138] и мате

[139, 288] кроме монокофеоилхинных кислот обнаруживаются и дикофеоилхинные кислоты, причем, по нашим данным, в последнем случае содержание дикофеоилхинных кислот больше. Кроме того, использование именно настоев мате для решения поставленной задачи объясняется отсутствием в них производных феруловой кислоты, которые приводят к осложнению хроматографической картины вследствие излишней многокомпонентности.

В листьях растения *Ilex paraguariensis* синтезируются три из четырех монокофеоилхиновых кислот – 3CQA, 4CQA и 5CQA, а также благодаря возможным комбинациям замещения в хинной кислоте – три изомера дикофеоилхинных кислот – 3,5diCQA, 3,4diCQA и 4,5diCQA. Все монокофеоилхинные кислоты разделяются в подвижных фазах, содержащих 0.25 об. % ортофосфорной кислоты и от 12 до 14 об. % ацетонитрила в воде, хотя разделение 4CQA и 5CQA требует улучшения. В то же время среди дикофеоилхинных кислот 4,5diCQA имеет наибольшее удерживание, а 3,4diCQA и 3,5diCQA элюируются близко друг к другу, создавая проблемную пару для разделения, рис. 3.70.

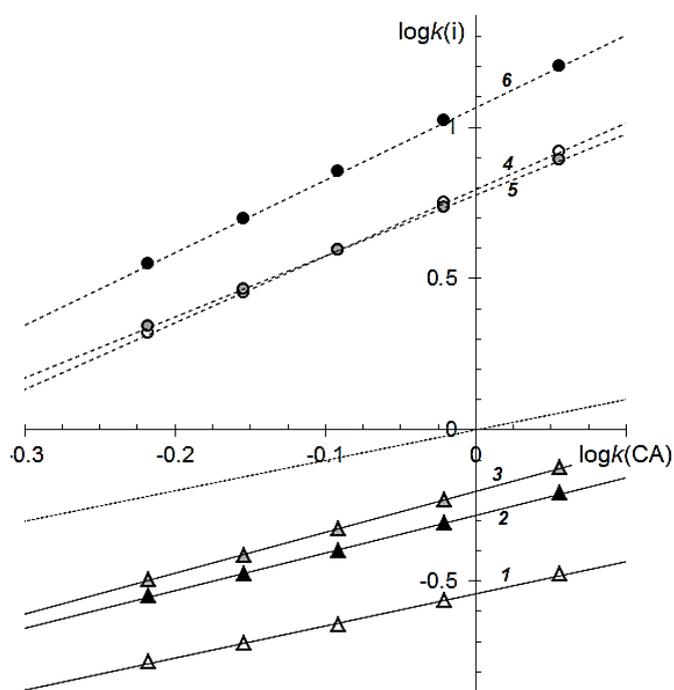


Рисунок 3.70 – Карта разделения моно- и дикофеоилхинных кислот. Колонка 150×4.6 мм

Kromasil 300-5C4, подвижная фаза: 0.25 об.% ортофосфорной кислоты и 12 – 14 об. % ацетонитрила в воде; 30°C. Соединения: 1 – 3CQA; 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 – 3,4diCQA; 5 – 3,5diCQA; 6 – 4,5diCQA; пунктирная линия – для вещества сравнения – кофейная кислота (CA).

При этом при составе подвижной фазы 0.25 об.% ортофосфорной кислоты и 12 об.% ацетонитрила в воде удается разделить и два изомера - 3,4diCQA и 3,5diCQA, но в этом случае время удерживания 4,5diCQA составляет порядка 40 минут, из-за чего данные условия мало пригодны для серийного анализа. При увеличении элюирующей силы растворителя за счет роста концентрации ацетонитрила в подвижной фазе последняя пара изомеров становится проблемной.

Добавление β -ЦД в подвижную фазу, как было экспериментально установлено, заметно изменяет вид хроматограмм за счет улучшения разделения анализируемых веществ благодаря различной склонности изомерных кислот к образованию комплексов включения «гость-хозяин», рис. 3.71. Согласно представленным данным, при повышении концентрации β -циклодекстрина от 0 до 0,01 М наиболее сильно снижается удерживание 4,5diCQA. Уменьшение также велико для 3,5diCQA, в то время как удерживание 3,4diCQA изменяется медленно. Это является следствием уменьшения констант образования комплексов «гость-хозяин» (K) в ряду:

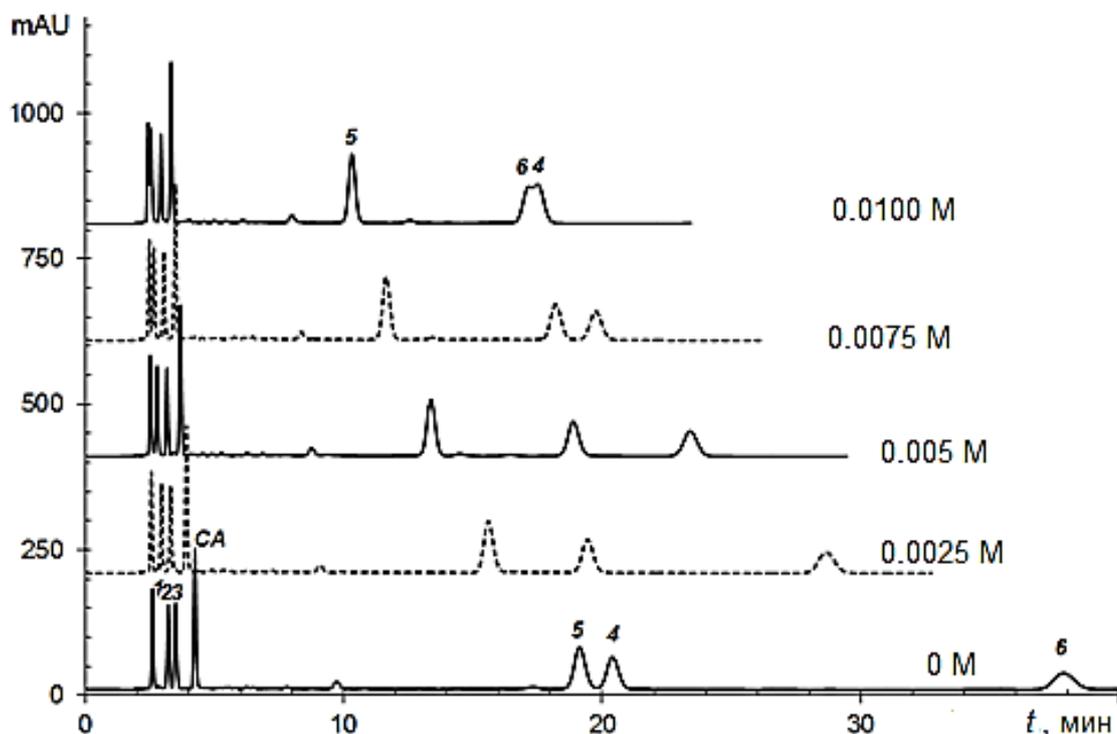


Рисунок 3.71 – Изменения в разделении растворенных веществ в подвижной фазе с добавлением β -ЦД.

Колонка 150×4.6 мм Kromasil 300-5C4, подвижная фаза: 0.25 об.% ортофосфорной кислоты и 12 об. % ацетонитрила в воде; 30°C. Соединения: 1 – 3CQA; 2 – 5CQA; 3 – 4CQA; 4 – 3,4diCQA; 5 – 3,5diCQA; 6 – 4,5diCQA.

Для дикоффеилхинных кислот можно предположить образование комплексов «гость-хозяин» с β -ЦД в соотношении 2:1, если нет стерических ограничений для комплексообразования.

Рассмотрим один из изомеров diCQA, содержащий заместители кофейной кислоты в двух различных положениях хинной кислоты (i и j). Если в подвижной фазе появляется β -ЦД, то могут образовываться два типа комплексов «гость-хозяин» в соотношении 1:1:



а также один комплекс в соотношении 2:1:



Спектрофотометрический детектор в этом случае чувствителен ко всем четырем типам растворенных веществ, в том числе не участвующим в комплексообразовании:

$$\Sigma \text{diCQA}(i,j) = \text{diCQA}(i,j) + \text{ЦД}/\text{diCQA}(i) + \text{ЦД}/\text{diCQA}(j) + 2\text{ЦД}/\text{diCQA}(i,j). \quad (3.16)$$

Тогда общее удерживание будет представлять собой сумму удерживаний каждого типа растворенных веществ, которая может быть рассчитан как сумма произведений долей этих форм в растворе $\alpha(i)$, умноженных на их факторы удерживания:

$$k[\Sigma \text{diCQA}(i,j)] = k_0 \cdot \alpha[\text{diCQA}(i,j)] + k_i \cdot \alpha[\text{ЦД}/\text{diCQA}(i)] + k_j \cdot \alpha[\text{ЦД}/\text{diCQA}(j)] + k_{i,j} \cdot \alpha[2\text{ЦД}/\text{diCQA}(i,j)] \quad (3.17)$$

Константа равновесия для (3.13):

$$K_i = \frac{[\text{ЦД}/\text{diCQA}(i)]}{[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}]}$$

Концентрация комплекса в подвижной фазе выражается как:

$$[\text{ЦД}/\text{diCQA}(i)] = K_i[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}].$$

Аналогично могут быть выражены и другие концентрации:

$$[\text{ЦД}/\text{diCQA}(j)] = K_j[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}],$$

$$[2\text{ЦД}/\text{diCQA}(i,j)] = K_{i,j}[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}]^2$$

Полученные выражения концентраций могут быть подставлены в уравнение (4):

$$\begin{aligned} [\Sigma \text{diCQA}(i,j)] &= [\text{diCQA}(i,j)] + K_i[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}] + K_j[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}] + \\ &\quad K_{i,j}[\text{diCQA}(i,j)][\text{ЦД}]^2 \\ [\Sigma \text{diCQA}(i,j)] &= [\text{diCQA}(i,j)](1 + K_i[\text{ЦД}] + K_j[\text{ЦД}] + K_{i,j}[\text{ЦД}]^2) \quad (3.18) \end{aligned}$$

Тогда молярные доли всех форм кислоты в растворе могут быть определены:

$$\alpha[\text{ЦД}/\text{diCQA}(i)] = K_i[\text{ЦД}]/(1 + K_i[\text{ЦД}] + K_j[\text{ЦД}] + K_{i,j}[\text{ЦД}]^2)$$

$$\alpha([\text{ЦД}/\text{diCQA}(j)]) = K_j[\text{ЦД}]/(1 + K_i[\text{ЦД}] + K_j[\text{ЦД}] + K_{i,j}[\text{ЦД}]^2)$$

$$\alpha[2\text{ЦД}/\text{diCQA}(i,j)] = K_{i,j}[\text{ЦД}]^2/(1 + K_i[\text{ЦД}] + K_j[\text{ЦД}] + K_{i,j}[\text{ЦД}]^2)$$

Используя эти формулы, можно преобразовать уравнение (3.17):

$$k(\Sigma diCQA(i, j)) = (k_0 + K_i k_i [ЦД] + K_j k_j [ЦД] + K_{i,j} k_{i,j} [ЦД]^2) / (1 + K_i [ЦД] + K_j [ЦД] + K_{i,j} [ЦД]^2) \quad (3.19)$$

Полученное уравнение можно переписать следующим образом:

$$\frac{k_0 + k_i K_i [ЦД] + k_j K_j [ЦД] + k_{i,j} K_{i,j} [ЦД]^2}{k(\Sigma diCQA)} = 1 + K_i [ЦД] + K_j [ЦД] + K_{i,j} [ЦД]^2 \quad (3.20)$$

Количественный расчет шести неизвестных констант сложен, однако константы могут быть легко оценены путем упрощения уравнения (8), если предположить, что удерживание всех типов комплексов мало:

$$F(i, j) = \frac{k_0}{k(\Sigma diCQA)} \approx 1 + K_i [ЦД] + K_j [ЦД] + K_{i,j} [ЦД]^2. \quad (3.21)$$

Полученный график по уравнению (9) представлен на рисунке 3.72

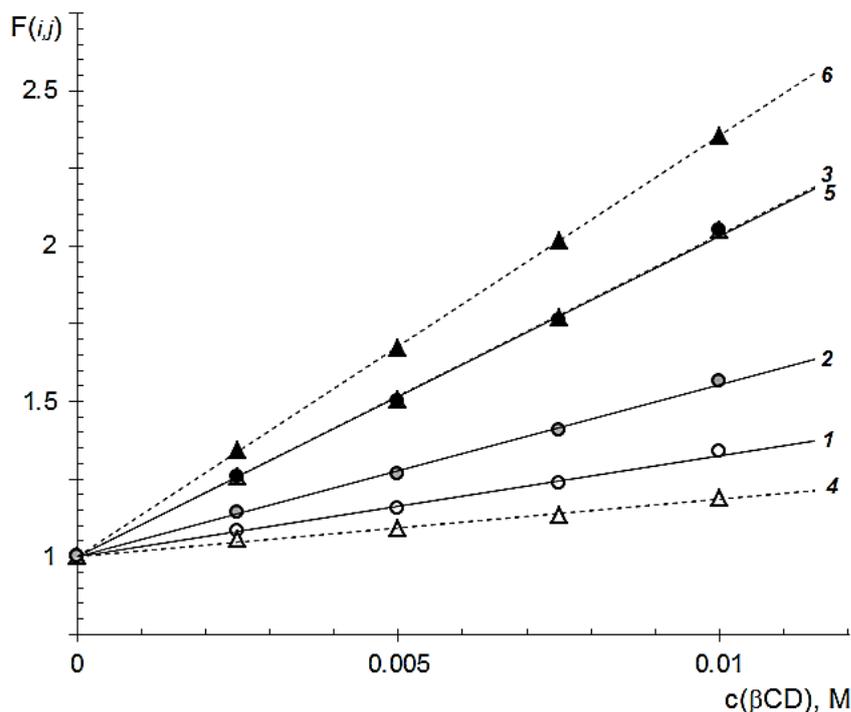


Рисунок 3.72 – Зависимость между функцией по уравнению (3.21) и концентрацией β-ЦД.

Соединения: 1 – 3CQA; 2 – 5CQA, 3 – 4CQA, 4 – 3,4diCQA; 5 – 3,5diCQA; 6 – 4,5diCQA

Специальные расчеты с учетом образования комплексов 1:1 показали, что предложенное упрощение является достаточно обоснованным. При этом наклон для 4,5diCQA наибольший вследствие наибольшей суммы K_i и K_j . Сравнение значения этой суммы для diCQA(i, j) с суммой констант комплексообразования соответствующих монокофеоилхиновых кислот, i CQA и j CQA весьма информативно и может свидетельствовать о стерических ограничениях для комплексообразования. Величина константы комплекса включения для 4,5diCQA (135 моль⁻¹·л) лишь немного меньше, чем сумма постоянных величин для 4CQA (55 моль⁻¹·л) и 5CQA (104 моль⁻¹·л), что указывает

лишь на небольшие стерические ограничения для входа радикалов кофейных кислот в полость β -циклодекстрина.

Объяснение результатов можно получить, рассмотрев некоторые конформации 3,4diCQA и 4,5diCQA, полученные путем оптимизации геометрии методом AM1 в программе HyperChemTM 8.0.8, а также оптимизированную структуру комплекса включения 4CQA в полость β -ЦД, рис. 3.73.

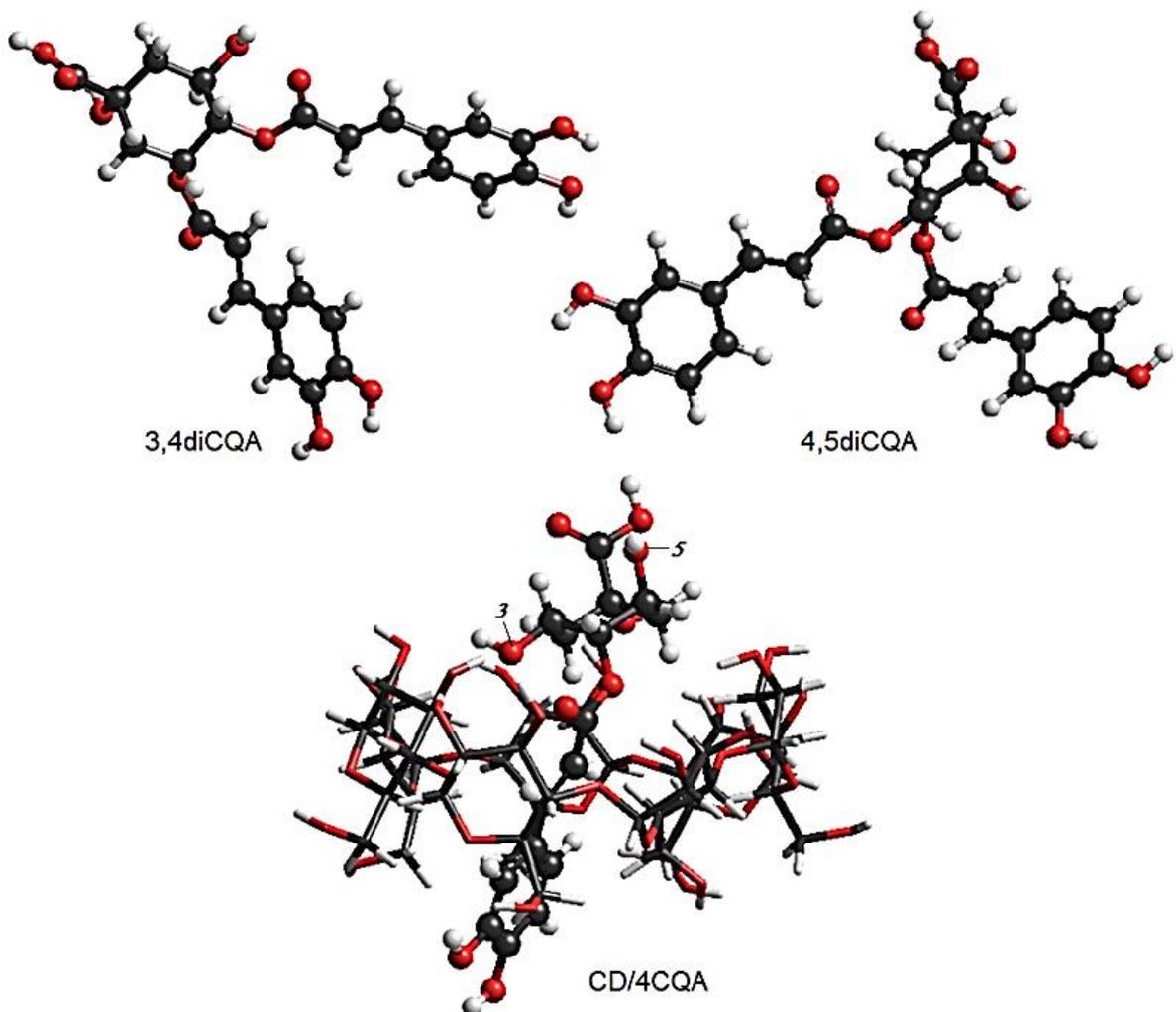


Рисунок 3.73 – Оптимизированные по геометрии конформации 3,4diCQA, 4,5diCQA и комплекса включения 4CQA в полость β -ЦД.

Сравнивая конформацию 3,4diCQA и структуру ЦД/4CQA, можно сделать вывод о том, что введение заместителя кофейной кислоты из положения 4 в полость β -ЦД стерически затруднено из-за наличия заместителя в положении 3 и наоборот. Поэтому, константа комплексообразования для данного изомера самая низкая. Некоторые ограничения возникают в случае 4,5diCQA с наивысшей суммой констант комплексов состава 1:1, поскольку очевидно небольшое стерическое ограничение для образования включения комплекса включения любого из заместителей в полость второй молекулы β -ЦД из-за не столь близкого, как в случае 3,6,4DiCQA, но все-таки относительно близкого расположения второго заместителя при большом размере молекулы β -ЦД. Это объясняет также и отсутствие комплексов включения β -ЦД с diCQAs в соотношении 2:1, что было установлено при анализе графиков на рис. 3.74

Кроме трех изомерных дикофеоилхинных кислот в экстракте мате возможно еще три изомера – в том случае, если в растении функционирует фермент, позволяющий ацилировать положение 1 хинной кислоты. Такой фермент по литературным данным обеспечивает биосинтез 1-кофеоилхинной кислоты, а с ней и двух из трех возможных изомерных дикофеоилхинных кислот: 1,3diCQA и 1,5diCQA. По неизвестным нам причинам изомер 1,4diCQA в природных объектах не найден, хотя и может быть получен синтетическим путем. Нам при работе с хлорогеновыми кислотами был недоступен артишок как исходный растительный материал, но в препарате «Артишока экстракт» ООО «Эвалар» была обнаружена 1,3diCQA – единственная из изомеров, получившая свое собственное название – цинарин. А в экстракте консервированных артишоков присутствовала 1,5diCQA. При этом 1CQA не была обнаружена. Из этих кислот полностью выпадает 1,3diCQA (см. раздел 3.2.4). Следовательно, к трем изомерным дикофеоилхинным кислотам, рассмотренным выше, следует добавить еще один изомер для оценки возможности разделения уже четырех дикофеоилхинных кислот.

Проблему разделения такой сложной смеси изомеров (напомним, что в общем случае обращенно-фазовая хроматография не чувствительна к изомерам, если не применяются специально разработанные колонки с «полимерной» обращенной фазой) решали в элюенте, содержащем 15 об. % ацетонитрила и 0.25 об. % ортофосфорной кислоты в воде. Зависимость времен удерживания четырех изомерных diCQA от концентрации β -циклодекстрина в подвижной фазе приведена на карте разделения I-го типа, рис.3.74.

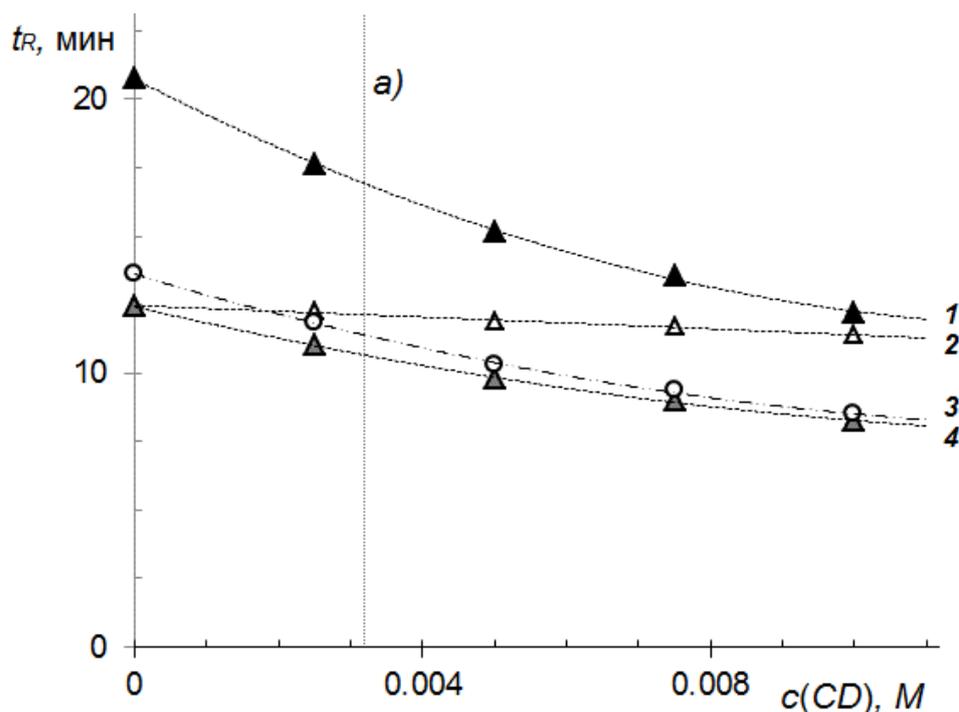
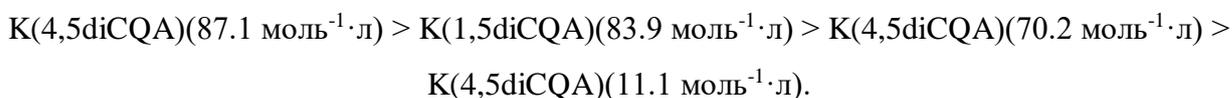


Рисунок 3.74. – Зависимость времен удерживания изомерных дикофеоилхиновых кислот от концентрации β-циклодекстрина в подвижной фазе, содержащей 15 об. % ацетонитрила и 0.25 об. % ортофосфорной кислоты в воде. Вещества: 1 – 4,5diCQA; 2 – 3,4diCQA; 3 – 1,5diCQA; 4 – 3,5diCQA.

Из представленных данных следует, что удерживание 3,4diCQA уменьшается в наименьшей степени с ростом концентрации β-ЦД, удерживание 4,5diCQA, наоборот, при этом резко падает. Разделение 1,5diCQA и 3,4diCQA постепенно ухудшается и полное разделение всех компонентов возможно при концентрации β-ЦД 0.0032 М.

Указанные изменения являются следствием уменьшения суммы констант комплексообразования для комплексов состава 1:1 в ряду:



Очевидно, что константы комплексообразования уменьшились при росте содержания ацетонитрила от 10 до 15 об. %, что указывает на конкуренцию между ацетонитрилом и хлорогеновыми кислотами за место в полости циклодекстрина. При этом в данных условиях образование комплексов состава 2:1 также практически исключено, рис.3.75.

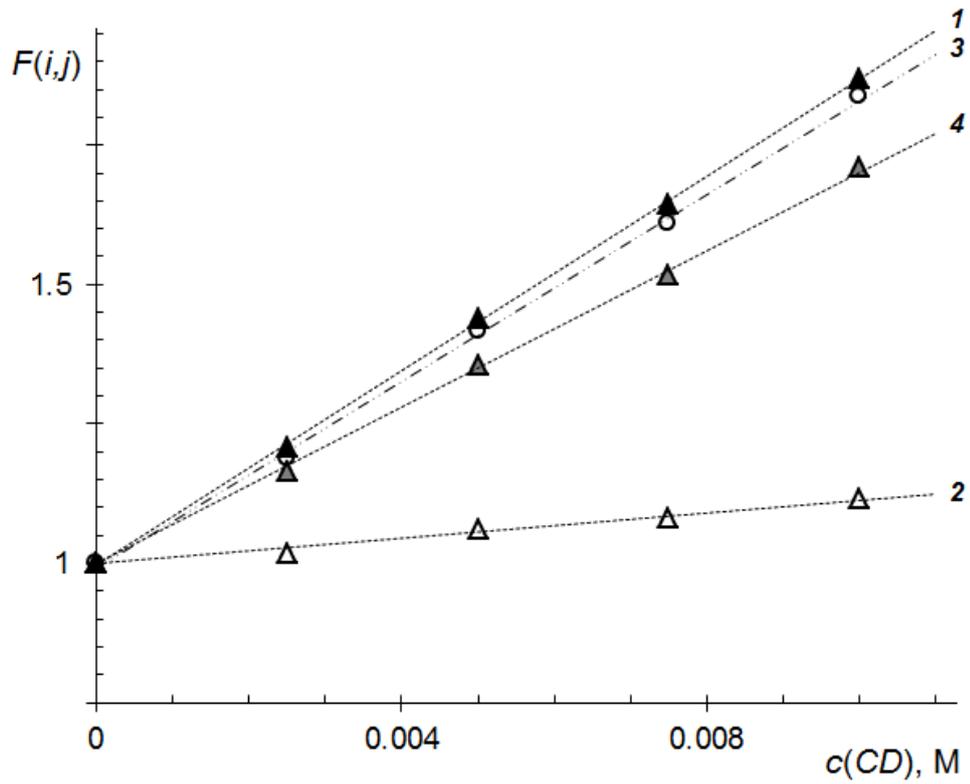


Рисунок 3.75 – Зависимость между функцией по уравнению (9) и концентрацией β -ЦД.

Соединения: 1 – 4,5diCQA; 2 – 3,4diCQA, 3 – 1,5diCQA; 4 – 3,5diCQA.

Таким образом установлены закономерности хроматографического поведения дикофеоилхинных кислот в обращенно-фазовой ВЭЖХ с добавлением β -циклодекстрина в подвижную фазу благодаря различным значениям констант комплексообразования «гость-хозяин».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан универсальный подход к оценке влияния стационарной и подвижных фаз на удерживание аналитов в условиях обращенно-фазовой хроматографии. Подход предполагает совместный анализ двух типов карт разделения. Первый тип предполагает экстраполяцию параметров удерживания на нулевое содержание органического модификатора, что позволяет оценить и сопоставить различные стационарные фазы. Второй тип карт разделения основан на анализе удерживании аналитов относительно вещества сравнения, позволяющий сопоставить сольватационные особенности аналитов в исследуемых подвижных фазах.

2. Разработаны новые условия для определения антоцианов и хлорогеновых кислот, в которых ацетонитрил заменен на метанол, этанол, пропанол-2, этилацетат и ацетон без потери эффективности разделения аналитов.

3. Определены численные параметры линейных зависимостей удерживания антоцианов и хлорогеновых кислот относительно реперных соединений при: а) изменении состава подвижной фазы с различными органическими модификаторами, б) изменении свойств (остаточной активности силанольных групп) стационарной фазы и типа концевых функциональных групп привитых алкильных радикалов. Показано, что изменения температуры разделения может повысить селективность разделения при различии энтальпий переноса для проблемных пар аналитов. Показано, что при изменении рН подвижной фазы и при комплексообразования «гость-хозяин» с β -циклодекстрином в подвижной фазе свойства монокофеоилхинных кислот позволяют предсказать изменение удерживания и строение дикофеоилхинных кислот.

Перспективы дальнейшей разработки темы связаны с расширением практики замены ацетонитрила на более экологически приемлемые растворители при определении пестицидов, гербицидов, лекарственных препаратов и других соединений с использованием разработанных подходов к управлению разделением в условиях ОФ ВЭЖХ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Engelhardt H. The Effect of Modifier on Selectivity in Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography / H. Engelhardt, A. Kilmek-Turek, T.H. Dzido // *LCGC Europe*. – 2008. – V. 21, Issue 1. – P. 33–42.
2. Klimek-Turek A. Comparison of the Retention and Separation Selectivity of Aromatic Hydrocarbons with Polar Groups in RP-HPLC Systems with Different Stationary Phases and Eluents / A. Klimek-Turek, B. Misiołek, T.H. Dzido // *Molecules*. – 2020. – V. 25. – P. 5070.
3. Hanai T. Quantitative Explanation of Retention Mechanisms in Reversed-phase Mode Liquid Chromatography, and Utilization of Typical Reversed-phase Liquid Chromatography for Drug Discovery / T. Hanai // *Current Chromatography*. – 2019. – V. 6. – P. 52-64.
4. Karch K. Preparation and properties of reversed phases / K. Karch, I. Sebastian, I. Halasz // *Journal of Chromatography*. – 1976. – V. 122. – P. 3-16.
5. Sander L.C. Recent advances in bonded phases for liquid chromatography / L.C. Sander, S.A. Wise // *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 1987. – V. 18, Issue 4. – P. 299-415.
6. Sander L.C. Synthesis and Characterization of Polymeric Phases for Liquid Chromatography / L.C. Sander, S.A. Wise // *Analytical Chemistry*. – 1984. – V. 56. – P.504-510.
7. Engelhardt H. Comparison and Characterization of Reversed Phases / H. Engelhardt, M. Jungheim M // *Chromatographia*. – 1990. – V. 29, No. 1/2. – P. 56-68.
8. Lesellier E. Classification of special octadecyl-bonded phases by the carotenoid test / E. Lesellier, C. West, A. Tchaplal. // *Journal of Chromatography A*. – 2006. – V.1111. – P.62–70.
9. Дейнека В.И. Модель привитой обращенной фазы на основе силикагеля / В.И. Дейнека, В.А. Нгуен, Л.А. Дейнека // *Журнал физической химии*. – 2019. – Т. 93, № 12. – С. 1860–1864.
10. Liu X. Development of a polar-embedded stationary phase with unique properties / X. Liu, A. Bordunov, M. Tracy [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2006 – V. 1119 – P. 120–127.
11. Cledera-Castro M. Comparison of the performance of different reversed-phase columns for liquid chromatography separation of 11 pollutant phenols / M. Cledera-Castro, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos, R. Gonzalo-Lumbreras // *Journal of Separation Science*. – 2007. – V. 30. – P. 69 –707.

12. Claessens H.A. Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography / H.A. Claessens, M.A van Straten, C.A Cramers [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1998 – V.826 – P.135–156.
13. Dill K.A. The mechanism of solute retention in reversed-phase liquid chromatography // *Journal of Physical Chemistry*. – 1987. – V. 91. – P. 1980-1988.
14. Dorsey J.G. The Molecular Mechanism of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography / J.G. Dorsey, K.A. Dill // *Chemical Reviews*. – 1989. – V, 89. – P. 331-346.
15. Molnar I. Searching for Robust HPLC Methods – Csaba Horváth and the Solvophobic Theory / I. Molnar // *Chromatographia*. – 2005. – V. 62. – P.7–17.
16. Dorsey J.G. Retention mechanisms of bonded-phase liquid chromatography / J.G. Dorsey, W.T. Cooper // *Analytical chemistry*. – 1994. – V. 66, No. 17. – P. 857A-867A.
17. Vailaya A. Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption? / A. Vailaya, C. Horváth // *Journal of Chromatography A*. – 1998. – V. 829, No. 1-2. – P. 1-27.
18. Дейнека В.И. «Распределение или адсорбция» как основная дилемма ОФ ВЭЖХ / В.И. Дейнека // *Журнал физической химии*. – 2008. – Т. 82. – С. 1028-1032.
19. Дейнека В.И. «Поплавающий» механизм удерживания в обращенно-фазовой хроматографии / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, И.И. Саенко, А.Н. Чулков // *Журнал физической химии*. – 2015. – Т. 89. – С. 1171-1177.
20. Kaliszan R. Quantitative structure-retention relationships / Kaliszan R. // *Analytical Chemistry*. – 1992. – V 64, No. 11, – P.619A–631A.
21. Kaliszan R. Molecular mechanism of retention in reversed-phase high-performance liquid chromatography and classification of modern stationary phases by using quantitative structure–retention relationships / R. Kaliszan, M.A van Straten, M. Markuszewski [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1999 – (1999) – V. 855 – P.455–486.
22. Du C.M. Characterizing the Selectivity of Stationary Phases and Organic Modifiers in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic Systems by a General Solvation Equation Using Gradient Elution / C.M. Du, K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds, M.H. Abraham M // *Journal of Chromatographic Science*. – 2000. – V. 38. – P. 503-511.
23. Snyder L.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems / L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R. Gant // *Journal of Chromatography A*. – 1979. – V. 165. – P. 3-30.
24. Schoenmakers P.J., Billiet H.A.H., Tussen R., De Galan L. Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography / P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, R. Tussen, L. De Galan // *Journal of Chromatography A*. – 1978. – V. 149. – P. 519-537.

25. Murakami F. Retention behaviour of benzene derivatives in bonded reversed-phase columns / F. Murakami // *Journal of Chromatography*. – 1979. – V. 178. – P. 393-395.
26. Шаповалова Е. Н. Хроматографические методы анализа / Е. Н Шаповалова, А.В. Пирогов // *Методическое пособие для специального курса*. М. – 2007.
27. Оптимизация селективности в хроматографии: перевод с англ. / Схунмакерс П.– М., Мир. – 1989. – 399 с.
28. Johnson A.R. Chromatographic selectivity triangles / A.R Johnson, M. F. Vitha // *Journal of Chromatography A*. – 2011. – V. 1218. – P. 556 – 586.
29. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В.И. Дейнека // *Журнал физической химии*. – 2006. – Т.80. №3. – С. 511-516.
30. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживания в ВЭЖХ. Сопоставление инкрементных зависимостей / В.И. Дейнека // *Журнал физической химии*. – 2006. – Т.80, №4. – С. 704-708.
31. Geller R.J. Cyanide toxicity from acetonitrile-containing false nail remover / R.J. Geller, B.R. Ekins, R.C. Iknoian // *The American journal of emergency medicine*. – 1991. – V. 9, No. 3 – P. 268-270.
32. Plotka J. Green chromatography / J. Plotka, M. Tobiszewski, A. M. Sulej, M. Kupska [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 2013 – V. 1307 – P.1–20.
33. Bordonaba J.G. A new acetonitrile free mobile phase for HPLC–DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study / J.G. Bordonaba, P. Crespo, L.A. Terry // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 129. – P. 1265.
34. Bordonaba J.G. Greening reversed-phase liquid chromatography methods using alternative solvents for pharmaceutical analysis / J.G. Bordonaba, P. Crespo, L.A. Terry // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – P. 1065.
35. Pina F. Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations / F. Pina, J. Oliveira, V. de Freitas // *Tetrahedron*. – 2015. – V. 71. – P. 3107.
36. Mozetič B. Determination and quantitation of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia) / B. Mozetič, P. Trebše, J. Hribar // *Food Technology and Biotechnology*. – 2002. – V. 40. – P. 207.
37. Koh K. Identification of anthocyanins in black soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) varieties / K. Koh, J.E. Youn, H.-S. Kim // *Journal of Food Science and Technology*. – 2014. – V. 51. – P. 377.

38. Flamini R. The anthocyanin content in berries of the hybrid grape cultivars Clinton and Isabella / R. Flamini, D. Tomasi // *Vitis*. – 2000. – V. 39. – P. 79.
39. Luczkiewicz M. The RP–HPLC Analysis of anthocyanins / M. Luczkiewicz, W. Cisowski // *Chromatographia*. – 1998. – V. 48. – P. 360.
40. Valls J. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols / J. Valls, S. Millan, M.P. Marti, E. Borrás, L. Arola // *Journal of Chromatography A*. – 2009. – V. 1216. – P. 7143.
41. Revilla I. Identification of anthocyanin derivatives in grape skin extracts and red wines by liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection / I. Revilla, S. Perez-Magarino, M.L. Gonzalez-SanJose, S. Beltran // *Journal of Chromatography A* – 1999. – V. 847. – P. 83.
42. Comandini P. Cabon CZE separation of strawberry anthocyanins with acidic buffer and comparison with HPLC / P. Comandini, G. Blanda, A. Cardinali [et al.] // *Journal of Separation Science*. – 2008. – V. 31. – P. 3257.
43. Albergaria E.T. The effect of water deficit stress on the composition of phenolic compounds in medicinal plants / E.T. Albergaria, A.F. Morais Oliveira, U.P. Albuquerque // *South African Journal of Botany*. – 2020. – V. 131. – P. 12-17.
44. Harborne J.B. Phenolic compounds / J.B. Harborne // *Phytochemical methods*. – Springer, Dordrecht, – 1973. – P. 33-88.
45. Lattanzio V. Phenolic Compounds: Introduction. / V. Lattanzio // *Natural Products*. Springer, Berlin, Heidelberg. – 2013. – P.1543-1580.
46. Дейнека В.И. Определение антоцианов и хлорогеновых кислот в плодах растений рода арония: опыт хемосистематики / В.И. Дейнека, М.Ю. Третьяков, Е.Ю. Олейниц [и др.] // *Химия растительного сырья*. – 2019. – №2. – С. 161-167.
47. Da Silva Port's P. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region / P. Da Silva Port's, R. C. Chisté, H. T. Godoy, M. A. Prado // *Food Research International*. – 2013. – V. 53(2). – P. 875–881.
48. Dias M.I. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review / M.I. Dias, M.J. Sousa, R.C. Alves, I.C. Ferreira // *Industrial Crops and Products*. – 2016. – V. 82. – P. 9–22.
49. Charles W. I. Haminiuk, Phenolic compounds in fruits – an overview / Charles W. I. Haminiuk, Giselle M. Maciel, Manuel S. V. Plata-Oviedo, Rosane M. Peralta. // *International Journal of Food Science and Technology*. – 2012. – V. 47(10). – P. 2023-2044.
50. Wojdylo A. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs / A. Wojdylo, J. Oszmianski, R. Czemerys // *Food Chemistry*. – 2007. – V.105. – P. 940–949.

51. Jimenez-Lopez C. Main bioactive phenolic compounds in marine algae and their mechanisms of action supporting potential health benefits / C. Jimenez-Lopez, A.G. Pereira, C. Lourenço-Lopes [et al.] // *Food Chemistry*. – 2021. – V. 341. – P. 128262.
52. Daigle D.J, Conkerton E.J. High-performance liquid chromatography of 34 selected flavonoids / D.J Daigle, E.J. Conkerton // *Journal of Chromatography A*. – 1982. – V.240. – P. 202-205.
53. Zapadka M. An application of QSRR approach and multiple linear regression method for lipophilicity assessment of flavonoids / M. Zapadka, M. Kaczmarek, B. Kupcewicz [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2019. – V.164. – P. 681-689.
54. Mannino G. Anthocyanins: Biosynthesis, Distribution, Ecological Role, and Use of Biostimulants to Increase Their Content in Plant Foods—A Review / G. Mannino; C. Gentile, A. Ertani [et al.] // *Agriculture*. – 2021. – V. 11. – P. 212.
55. Kong J.M. Analysis and biological activities of anthocyanins / J.M. Kong, L.S Chia, N.K. Goh, T.F Chia, R. Brouillard // *Phytochemistry*. – 2003 – V. 64, Issue 5. – P. 923-933.
56. Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins / R. Brouillard // In: *Anthocyanins as Food Colors*. Pericles Markakis (ed.). – 1982. – P. 1-38.
57. Meiers S. The anthocyanidins cyanidin and delphinidin are potent inhibitors of the epidermal growth-factor receptor / S. Meiers, M. Kemény, U. Weyand [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2001 – V. 49(2) – P. 958-62.
58. Hamdoon A. Anthocyanins: Traditional Uses, Structural and Functional Variations, Approaches to Increase Yields and Products' Quality, Hepatoprotection, Liver Longevity, and Commercial Products Int. / Hamdoon A. Mohammed, Riaz A. Khan // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – P. 2149.
59. Skaar I. New anthocyanidin and anthocyanin pigments from blue plumbago / I. Skaar // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2012. – V. 60, №6. – P. 1510–1515.
60. Wrolstad R.E. Anthocyanin pigments—Bioactivity and coloring properties / R. E. Wrolstad // *Journal of Food Science*. – 2004. – V. 69. №5. – P. 419–421.
61. Mazza G. Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products / G. Mazza // *Food Chemistry*. – 1987 – V. 25, № 3. – P. 207-225.
62. He J. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties / J. He // *Annual Review of Food Science and Technology*. – 2010. – V.1, No. 1. – P. 163–187.
63. Giusti M.M. Molar absorptivity and color characteristics of acylated and non-acylated pelargonidin-based anthocyanins / R. E. Wrolstad, M.M. Giusti // *Journal of Agricultural Food Chemistry*. – 1999. – V. 47. № 11. – P. 4631-4637.

64. Von Elbe J. H. Colorants / J.H. Von Elbe // Food Chemistry. Fennema OR (ed.) 3rd ed. – 1996. – P. 651-723.
65. Ping K. An integrated strategy for production of four anthocyanin compounds from *Ribes nigrum* L. by deep eutectic solvents and flash chromatography / K. Ping, Y.F. Kang, L.T. Wang [et al.] // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. – 2019 – V. 80. – P. 614-625.
66. Chatham L. Unique flavanol-anthocyanin condensed forms in the purple corn landrace Apache Red. / L. Chatham, L. West, M.A. Berhow, K.E. Vermillion, J. Juvik // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2018 – V. 41. – P. 10844–10854.
67. Horiuchi R. Identification of the Biosynthetic Pathway for Anthocyanin Triglycoside, the Precursor of Polyacylated Anthocyanin, in Red Cabbage / R. Horiuchi, Y. Nishizaki, N.Okawa, A. Ogino, N. Sasaki // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2020. – V. 68, № 36. – P. 9750–9758.
68. Куркин В.А. Новые подходы к стандартизации плодов черники обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // Химия растительного сырья. – 2012. – №4 – С.167-173.
69. Зульфугурова М.Б., Новрузов Э.Н. Состав и содержание плодов *Sambucus ebulus* L / М.Б. Зульфугурова, Э.Н. Новрузов // Химия растительного сырья. – 2017. – №1 – С.163-167.
70. Kusznierewicz B. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Polish Blue-Berried Honeysuckle Genotypes by HPLC-DAD-MS, HPLC Postcolumn Derivatization with ABTS or FC, and TLC with DPPH Visualization / B. Kusznierewicz, A. Piekarska, B. Mrugalska [et al.] // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2012. – V. 60(7). – P.1755–1763.
71. Xu L. Simplified Quantification of Representative Bioactives in Food Through TLC Image Analysis / L. Xu, T. Shu, S. Liu // Food Analytical Methods. – 2019. – V.12. – P. 2886–2894.
72. Goiffon J.-P. High-performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins / J.-P. Goiffon, M. Brun, M.-J. Bourrier // Journal of Chromatography A. – 1991 – 537, – P. 101–121.
73. Дейнека В.И. Управление селективностью антоцианов: замена ацетонитрила на метанол в подвижной фазе / В.И. Дейнека, Е.Ю. Олейниц, И.П. Блинова, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2021. – Т.76, №8. – С.701-707.

74. Zhou Y. Optimization and application of HPLC for simultaneous separation of six well-known major anthocyanins in blueberry / Y. Zhou, S. Long, Q. Xu [et al.] // *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. – 2021. – V. 51:10, – P.961-970.
75. Макаревич С.Л. ВЭЖХ в определении антоцианов плодов некоторых видов винограда / С.Л. Макаревич, А.Н. Чулков, В.И. Дейнека [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2014. – Т. 14, Вып. 6. – С. 1024-1031.
76. Дейнека В.И. Исследование антоцианов 11 сортов ремонтантной малины / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов, И.С. Дубцова, Е.Б. Майорова // *Региональные геосистемы*. – 2012. – № 21-1 – С.149-153.
77. Чулков А.Н. Антоцианы плодов шести видов *Amelanchier sp* / А.Н. Чулков, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, А.В. Степанова // *Региональные геосистемы*. – 2011. – №9-2 – С. 209-2015.
78. Дейнека Л. А. Антоцианы плодов черной смородины Москвы и Санкт-Петербурга / Л.А. Дейнека, И.П. Анисимович, Е.И. Шапошник [и др.] // *Региональные геосистемы*. – 2011. – №9-2 – С.271-276.
79. Дейнека В.И. Определение антоцианового состава плодов красной смородины методом обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека, А.Н. Чулков, Л.А. Дейнека, В.Н. Сорокопудов // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2015. – Т. 15, Вып. 4. – С. 280.
80. Дейнека В.И. Определение антоцианов винограда в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека, С.Л. Макаревич, Е.Ю. Олейниц // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2021. – Т. 21, №. 5. – С. 653-660.
81. Deineka V. I. Chromatographic Separation and Determination of Anthocyanins under Conditions of Reversed Phase Chromatography, When Used As Mobile Phases of Acetonitrile–Formic Acid/Phosphoric Acid–Water Systems / V.I. Deineka, E.Yu. Oleinits, Y.Yu. Kulchenko, I.P. Blinova, L.A. Deineka // *Russian Journal of Physical Chemistry A*. – 2021. – V. 95, N. 8, – P. 1729–1734.
82. Дейнека В.И. Определения антоцианов оберток пурпурной кукурузы / В.И. Дейнека, А.Н. Сидоров, Л.А. Дейнека // *Журнал аналитической химии*. – 2016. – Т. 71, №11. – С.1203-1208.
83. Дейнека В.И. Антоцианы листьев базилика: определение и получение сухих инкапсулированных форм / В.И. Дейнека, Я.Ю. Кульченко, И.П. Блинова, А.Н. Чулков, Л.А. Дейнека // *Химия растительного сырья*. – 2018. – №1. – С. 129-135.

84. Олейниц Е. Ю. Антоцианы и другие фенольные соединения напитков иванчая и его антиоксидантная активность / Е.Ю. Олейниц, И. П. Блинова, Л.А. Дейнека [и др.] // Вестник ВГУ. Серия: химия, биология, фармация. – 2018. – №1. – С. 7-14.
85. Дейнека В.И. Определение антоцианов лепестков цветков тюльпанов способом обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека, Я.Ю. Кульченко, Л.А. Дейнека, А.Н. Чулков, В.Ф. Селеменев // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2016. – Т.16, №4. – С. 464-470.
86. Дейнека Л.А. Антоцианы плодов вишни и родственных растений / Л.А. Дейнека, А.Н. Чулков, В.И. Дейнека, В.Н. Сорокопудов, С.М. Шевченко // Научные ведомости БелГУ. Сер. Естественные науки. – 2011. – № 9, Вып. 15/1. – С. 364.
87. Дейнека В.И. Антоцианы плодов некоторых видов боярышника (*Crataegus L.*, rosaceae) / В.И. Дейнека, С.Л. Макаревич, Л.А. Дейнека [и др.] // Химия растительного сырья. – 2014. – №1. – С. 119-124.
88. Полина С.А. Состав антоцианов плодов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и клюквы обыкновенной Краснодарского края по данным ВЭЖХ / С.А. Полина, А.А. Ефремов // Химия растительного сырья. – 2014. – №2. – С. 103-110.
89. David L. Effects of In Vitro Gastrointestinal Digestion on the Antioxidant Capacity and Anthocyanin Content of Cornelian Cherry Fruit Extract / L. David, V. Danciu, B. Moldovan, A. Filip // Antioxidants. – 2019. – V. 8(5) – P.114.
90. Johnson J. Solvent extractions and spectrophotometric protocols for measuring the total anthocyanin, phenols and antioxidant content in plums / J. Johnson, T. Collins, K. Walsh, M. Naiker // Chemical Papers. 2020. – No.74. – P.4481-4492.
91. Nistor, M., Diaconeasa, Z., Frond, A.D. et al. Comparative efficiency of different solvents for the anthocyanins extraction from chokeberries and black carrots, to preserve their antioxidant activity / M. Nistor, Z. Diaconeasa, A.D. Frond [et al] // Chemical Papers. – 2021 – V. 75. – P.813–822.
92. Renee C. Variation in anthocyanin profiles of 27 genotypes of red cabbage over two growing seasons / C. Renee, F. Molla [et al] // Food Chemistry. – 2019. – V. 301. – P. 125289.
93. Wang P.G. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications / Wang P.G., He W. // CRC Press, Taylor & Francis Group. – 2011. – 589 p.
94. Дробь А.А. Оптимизация методов ВЭЖХ контроля антоцианового состава вин и виноматериалов / А.А. Дробь // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2019 – V.19(2). – С.179-186.

95. Дейнека В.И. Гидрофильная хроматография как альтернатива обращенно-фазовой ВЭЖХ для определения антоцианов и бетацианинов / В.И. Дейнека, И.И. Саенко, Л.А. Дейнека, И.П. Блинова // Журнал аналитической химии. – 2016. – Т. 71, №3. – С.310-314.
96. Дейнека В.И. Гидрофильная хроматография на силикагеле: групповой анализ антоцианов плодов винограда / В.И. Дейнека, С.Л. Макаревич, Л. А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2018. – Т. 73, №2. – С.137-140.
97. Запрометов М.Н. Фенольные соединения / М.Н. Запрометов // М.: Наука. – 1993. – 272с.
98. Manach C. Polyphenols: food sources and bioavailability / C. Manach, A. Scalbert, C. Morand [et al] // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2004. – V.79. – P.727–747.
99. Herrmann K. Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods / K. Herrmann // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 1989. – V. 28. – P. 315-347.
100. Clifford M.N. Review Chlorogenic acids and other cinnamates-nature, occurrence and dietary burden / M.N. Clifford // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1999. – V.79. – P. 362-372.
101. Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids / C.D. Stalikas //Journal of Separation Science. – 2007. – V. 30(18). – P. 3268–3295.
102. Тутельян В.А. Биологически активные вещества растительного происхождения. Фенольные кислоты: распространенность, пищевые источники, биодоступность / В.А. Тутельян, Н.В. Лашнева // Вопросы питания. – 2008. – Т.77, №1. – С. 4-19.
103. F.A. Tomas-Barberan. Dietary hydroxybenzoic acid derivatives- nature, occurrence and dietary burden / F.A. Tomas-Barberan, M.N. Clifford // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2000. – V. 80 – P. 1024– 1032.
104. Lafay S. Bioavailability of phenolic acids / S. Lafay, A. Gil-Izquierdo // Phytochem Rev. – 2008. – V.7. – P.301–311.
105. Loader T.B. Chlorogenic acid from coffee beans: Evaluating the evidence for a blood pressure–regulating health claim / T.B. Loader [et al.] // Nutrition Reviews. – 2017. – V. 75, №. 2. – С. 114-133.
106. Alam, M.A. Hydroxycinnamic acid derivatives: a potential class of natural compounds for the management of lipid metabolism and obesity / M.A. Alam, N. Subhan, H. Hossain [et al.] // Nutrition and Metabolism. – 2016. –V.13. – No. 12. – P.1-13.

107. Santana-Gálvez J. Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome / J. Santana-Gálvez, L. Cisneros-Zevallos, D. Jacobo-Velázquez // *Molecules*. – 2017. – V. 22(3). – P. 358.
108. Tajik N. The potential effects of chlorogenic acid, the main phenolic components in coffee, on health: a comprehensive review of the literature / N. Tajik, M. Tajik, I. Mack, P. Enck // *European journal of nutrition*. – 2017. – V. 56. – No. 7. – P. 2215-2244.
109. Upadhyay R. An outlook on chlorogenic acids—occurrence, chemistry, technology, and biological activities / R. Upadhyay, L.J. Mohan Rao // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2013. – V. 53, No. 9. – P. 968-984.
110. Heitman E. Cognitive and neuroprotective effects of chlorogenic acid / E. Heitman, D.K. Ingram // *Nutritional Neuroscience*. – 2017. – V. 20. – No. 1. – P. 32-39.
111. Hoelzl C. Instant coffee with high chlorogenic acid levels protects humans against oxidative damage of macromolecules / C. Hoelzl, S. Knasmüller, K.H. Wagner [et al.] // *Molecular nutrition & food research*. – 2010. – V. 54, No.12. – P. 1722-1733.
112. Nabavi S.F. Chlorogenic acid and mental diseases: from chemistry to medicine / S.F. Nabavi, S. Tejada, W.N. Setzer [et al.] // *Curr Neuropharmacol*. – 2017 – V. 15. – P.471-479.
113. Huang Y. Determination of 13 Phenolic Compounds in Rice Wine by High-Performance Liquid Chromatography / Y. Huang, W. Lu, B. Chen M [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2014. – V. 8(4) – P.825–832.
114. Francisco V. Anti-inflammatory activity of *Cymbopogon citratus* leaves infusion via proteasome and nuclear factor- κ B pathway inhibition: contribution of chlorogenic acid / V. Francisco, G. Costa, A. Figueirinha [et al.] // *J. Ethnopharmacol*. – 2013 – V.148 (1) – P.126–134.
115. Naveed, M. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research / M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2018. – V. 97. – P.67–74.
116. Yuzhen C. Structure-Thermodynamics-Antioxidant Activity Relationships of Selected Natural Phenolic Acids and Derivatives: An Experimental and Theoretical Evaluation / C. Yuzhen, X. Huizhi, Z. Jie // *Chemical and Biomolecular Engineering Faculty Research*. – 2015. – V. 15. – P. 616-618.
117. Marques V., Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions / V. Marques, A. Farah // *Food Chemistry*. – 2009. – V.113. – P.1370–1376.
118. Farah A. Phenolic compounds in coffee / A. Farah, C.M. Donangelo // *Brazilian Journal of Plant Physiol*. – 2006. – V.18 (1). – P.23-36.

119. Kremr D. Unremitting problems with chlorogenic acid nomenclature: a review / D. Kremr, T. Bajer, P. Bajerová, S. Surmová, K. Ventura // *Quim.Nova.* – 2016. – V.39 – P.530-533.
120. Почицкая И.М. Исследование компонентного состава яблок и яблочного сока методами хромато-масс-спектрометрии / И.М. Почицкая, В.П. Субач, В. Л. Рослик // *Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия аграрных наук.* – 2016. – №. 1. – С. 107-113.
121. Создания продуктов с высокой антиоксидантной активностью с помощью полифенольных веществ яблок. Обзор / Л.Ч. Бурак, А.П. Завалей // *The Scientific Heritage.* – 2022. – №84-1. – С.28-40.
122. Soares M. C. Composition of phenolic acids content in apple (*Malus sp*) pomace / M.C. Soares, É.T. Ribeiro, E.M. Kuskoski, L.V. Gonzaga, A. Lima, J.M. Filho, R. Fett // *Semina: Ciências Agrárias, Londrina.* – 2008. – V. 29, No. 2. – P. 339-348.
123. Schütz K. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus L.*) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MSn / K. Schütz, D. Kammerer, R. Carle, A. Schrieber // *Journal of Agricultural Food Chemistry.* – 2004. – V. 52. – P. 4090-4096.
124. Abobatta W.F. Nutritional benefits of citrus fruits / W.F. Abobatta // *American Journal of Biomedical Science & Research.* – 2019. – V. 3(4). – P. 303-306.
125. Navnidhi C. Citrus medica: Nutritional, phytochemical composition and health benefits-a review / C. Navnidhi, K. Ragni, J. Sundeep [et al.] // *Food Function.* – 2018. – V. 9. – P. 1978-1992.
126. Wang S. Kiwifruit (*Actinidia spp.*): A review of chemical diversity and biological activities / S. Wang, Y. Qiu, F. Zhu // *Food Chemistry.* – 2020. – V.350. – P.128469.
127. Shao P. Complexing of chlorogenic acid with β -cyclodextrins: Inclusion effects, antioxidative properties and potential application in grape juice / P. Shao, J. Zhang, Z. Fang, P. Sun // *Food Hydrocolloids.* – 2014. – V.41 – P. 132–139.
128. Kyoung Chun O. Consideration on equivalent chemicals in total phenolic assay of chlorogenic acid-rich plums / O. Kyoung Chun, D.-O. Kim // *Food Research International.* – 2004 – V. 37(4). – P.337–342.
129. DiNardo A. Investigation of Antioxidant Content and Capacity in Yellow European Plums / A. DiNardo, J. Subramanian, A. Singh // *International Journal of Fruit Science.* – 2017 – V.18(1). – P. 99–116.

130. Sun L. Characterization and Quantification of Polyphenols and Triterpenoids in Thinned Young Fruits of Ten Pear Varieties by UPLC-Q TRAP-MS/MS / L. Sun, S. Tao, S. Zhang // *Molecules*. – 2019 – V. 24(1) – P.159.
131. Zhang B. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins / B. Zhang, R. Yang, Y. Zhao, C.-Z. Liu // *Journal of Chromatography B*. – 2008. – V. 867(2). – P. 253–258.
132. Torres-Contreras A.M. Effect of exogenous amylolytic enzymes on the accumulation of chlorogenic acid isomers in wounded potato tubers / A.M. Torres-Contreras, V. Nair, L. Cisneros-Zevallos, D.A. Jacobo-Velázquez // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2014. – V. 62. – P. 7671–7675.
133. Zaro M.J. Chlorogenic acid retention in white and purple eggplant after processing and cooking. *LWT* / M.J. Zaro, L.C. Ortiz, S. Keunchkarian [et al.] // *Food Science and Technology*. – 2015. – V. 64(2). – P. 802–808.
134. Tang G. Determination of phenolic acids in extra virgin olive oil using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry / G. Tang, Y. Huang, T. Zhang [et al.] // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2018. – V. 157. – P. 217–225.
135. Camacho-Cristóbal J.J. Boron deficiency causes accumulation of chlorogenic acid and caffeoyl polyamine conjugates in tobacco leaves / J.J. Camacho-Cristóbal, L. Lunar, F. Lafont [et al.] // *Journal of Plant Physiology*. – 2004. – V. 161(7). – P. 879–881.
136. Shan Y. Simultaneous determination of chlorogenic acids in green coffee bean extracts with effective relative response factors / Y. Shan, X. Jin, Y. Cheng, W. Yan // *International Journal of Food Properties* – 2017. – V. 20. – P. 2028-2040.
137. Köseoğlu Yılmaz P. SPE-HPLC Determination of Chlorogenic and Phenolic Acids in Coffee / P. Köseoğlu Yılmaz, U. Kolak // *Journal of Chromatographic Science*. – 2017. – V. 55. – P. 712–718
138. Craig A.P. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts / A.P. Craig, C. Fields, N. Liang, D. Kitts, A. Erickson // *Talanta*. – 2016. – V. 154. – P. 481–485.
139. de Paula Lima J. Distribution of Major Chlorogenic Acids and Related Compounds in Brazilian Green and Toasted *Ilex paraguariensis* (Maté) Leaves / J. de Paula Lima, A. Farah, B. King [et al.] // *Journal of Agricultural Food Chemistry*. – 2016. – V. 64. – P. 2361–2370.
140. Meinhart A. D. Study of new sources of six chlorogenic acids and caffeic acid / Meinhart A. D. [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019. – V. 82. – P. 103244.

141. Ragazzi E. Quantitative analysis of phenolic compounds after thin-layer chromatographic separation / E. Ragazzi, G. Veronese, // *Journal of Chromatography*. – 1973. – V.77. – P. 369–375.
142. Schulz J.M. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. I. Sample preparation and thin-layer chromatography / J.M. Schulz, K. Herrmann // *Journal of Chromatography*. – 1980. – V. 195. – P. 85–94.
143. Hawryl M.A. Application of normal- and reversed-phase 2D TLC on a cyanopropylbonded polar stationary phase for separation of phenolic compounds from the flowers of *Sambucus nigra* L. / M.A. Hawryl, A. Hawryl, E. Soczewinski // *Journal of Planar Chromatography*. – 2002. – V. 15. – P. 4–10.
144. Schulz J. Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. II. Determination by gas-liquid chromatography / J. Schulz, K. Herrmann // *Journal of Chromatography*. – 1980. – V. 195. – P. 95-104.
145. Oso B.J. Metabolomic profiling of ethanolic extracts of the fruit of *Xylopia aethiopica* (Dunal) a. rich using gas chromatography and high-performance liquid chromatography techniques / B.J. Oso, A.A. Boligon, A.T. Oladiji // *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. – 2018. – V. 7(1). – P. 2083-2090.
146. Kivilompolo M. Comparison of GC-MS and LC-MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs / M. Kivilompolo, V. Obürka, T. Hyötyläinen // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2007. – V. 388. – P. 881-887.
147. Fiamegos Y.C. Analytical procedure for the in-vial derivatization-extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection / Y.C. Fiamegos, C.G. Nanos, J. Vervoot, C.D Stalikas // *Journal of Chromatography A*. 2004. – V. 1041. – P. 11-18.
148. Lu Y. Fast analysis of phenolic acids by electrokinetic supercharging-nonaqueous capillary electrophoresis / Y. Lu, M.C. Breadmore // *J. Sep. Sci.* – 2010. – V. 33. – P. 2140–2144.
149. Kvasnička F. Determination of phenolic acids by capillary zone electrophoresis and HPLC / F. Kvasnička, J. Čopíková, R. Ševčík [et al.] // *Central European Journal of Chemistry*. – 2008. – V.6 (3). – P. 410–418.
150. Конева М.С. Фенольные соединения и антиоксидантная активность сока из ростков пшеницы / М.С. Конева, Н.А. Бугаец, И.А. Бугаец // *Научные труды КубГТУ*. – 2016. – № 14. – С. 847-853.

151. Kamangerpour A. Supercritical fluid chromatography of polyphenolic compounds in grape seed extract / A. Kamangerpour [et al.] // *Chromatographia*. – 2002. – V. 55, No. 7. – P. 417-421.
152. Robbins R.J. Development of a quantitative high-performance liquid chromatography–photodiode array detection measurement system for phenolic acids / R.J. Robbins, S.R. Bean // *Journal of Chromatography A*. – 2004. – V.1038. – P. 97–105.
153. Optimization and validation of reverse phase HPLC method for qualitative and quantitative assessment of polyphenols in seaweed / G. Rajauria // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. – 2008. – V. 148. – P. 230–237.
154. Wen D. A Universal HPLC Method for the Determination of Phenolic Acids in Compound Herbal Medicines / D. Wen, C. Li, H. Di, Y. Liao, H. Liu // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2005. – V. 53. – P. 6624-6629.
155. Mas S. Determination of phenolic acids in strawberry samples by means of fast liquid chromatography and multivariate curve resolution methods / S. Mas, G. Fonrodona, R. Tauler, J. Barbosa // *Talanta*. – 2007. – V.711. – P. 455–1463.
156. Справочник по аналитической химии. – 5-е изд., перераб. и доп. / Лурье Ю.Ю. – М.: Химия. – 1979. – 480 с.
157. Анисимович И. П. Сорбционное разделение фенольных кислот в условиях ион-парной ОФ ВЭЖХ / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, С.В. Симаков, В.Ф. Селеменев // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2010. – Т. 10, №. 4. – С. 572-577.
158. Öztürk N. Determination of Phenolic Acids by a Modified HPLC: Its Application to Various Plant Materials / N. Öztürk, M. Tunçel, N.B. Tunçel // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2007. – V. 30(4). – P. 587–596
159. Дейнека В.И. Селективность разделения изомерных хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека, Е.Ю. Олейниц, И.П. Блинова, Л.А. Дейнека // *Журнал аналитической химии*. – 2019. – Т. 74, № 8. – С. 588–594
160. Weidner S. Phenolic compounds and the antioxidant properties in seeds of green- and yellow podded bean (*Phaseolus vulgaris* L.) varieties. *СyTA* / S. Weidner, A. Król, M. Karamać, R. Amarowicz // *Journal of Food*. – 2018. – V. 16(1) – P. 373–380.
161. Liao X. Characterizing the phenolic constituents and antioxidant capacity of Georgia peaches / X. Liao, P. Greenspan, R. B. Pegg // *Food Chemistry*. – 2019. – V. 271. – P.345–353.
162. Темердашев З.А. Сорбционно-хроматографическое определение галловой, кофейной кислот, рутина и эпикатехина в лекарственных растениях / З.А. Темердашев,

В.В. Милевская, Н.В. Киселева [и др.] // Аналитика и контроль. – 2013. – Т. 17, №. 2. – P. 211-218.

163. Ma Y. Simultaneous and fast separation of three chlorogenic acids and two flavonoids from bamboo leaves extracts using zirconia / Ma Y. [et al] // Food and chemical toxicology. – 2018. – V. 119. – P. 375-379.

164. Lenche V.M. Rapid resolution liquid chromatography method for determination of chlorogenic acid in echinacea extracts / V.M. Lenche, P.I. Biljana, A. Mihajlovski // Journal of Agricultural, Food and Environmental Sciences, JAFES. – 2018. – V. 72, No. 1. – P. 79-85.

165. Determination and Quantification of p-Coumaric Acid in Pineapples (Ananas comosus) Extracts using Gradient Mode RP-HPLC / W. M. M. Saad [et al.] // Pharmacognosy Research. – 2019. – V. 11.No. 1. – P. 67-71.

166. Kosar M. Phenolic composition of strawberry genotypes at different maturation stages / M. Kosar, E. Kafkas, S. Paydas, K. H. C. Baser // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2004. – V. 52, No. 6. – P. 1586–1589.

167. Garcia-Salas P. Phenolic-compound-extraction systems for fruit and vegetable samples / P. Garcia-Salas, A. Morales-Soto, A. Segura-Carretero, and A. Fernandez-Gutierrez // Molecules. – 2010. – V. 15, No. 12. – P. 8813–8826.

168. Silva S. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. / S. Silva, E. M. Costa, C. Calhau, R.M. Morais, M. E. Pintado // Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2015. – V. 57(14). – P.3072–3083.

169. Skrede G. Changes in anthocyanins and polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) / G. Skrede, R.E. Wrolstad, R.W. Durst // Journal of food science. – 2000. – V. 65, No. 2. – P. 357-364.

170. Cacace J.E. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol / J.E. Cacace, G. Mazza // Journal of food science. – 2003. – V. 68, No. 1. – P. 240-248.

171. Mazza G. Methods of Analysis for Anthocyanins in Plants and Biological Fluids / G. Mazza, J.E. Cacace, C.D. Kay // Journal of AOAC INTERNATIONAL. – V. 87(1). – P. 129–145.

172. Fossen T. Anthocyanins from red onion, *Allium cepa*, with novel aglycone / T. Fossen // Phytochemistry. – 2003. – V. 62. № 8. – P. 1217–1220.

173. Delgado-Vargas F. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains—characteristics, biosynthesis, processing, and stability / F. Delgado-Vargas, A.R. Jiménez, O. Paredes-López // Crit. Rev. Food Sci. Nutr. – 2000. – V. 40(3). – P. 173–289.

174. Oancea S. Effects of extraction conditions on bioactive anthocyanin content of *Vaccinium corymbosum* in the perspective of food applications / S. Oancea // *Procedia Engineering*. – 2012. – V. 42. – P. 489–495.
175. Kapasakalidis P. G. Extraction of polyphenols from processed black currant (*Ribes nigrum* L.) residues / P.G. Kapasakalidis // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2006. – V. 54, No 11. – P. 4016–4021.
176. Z. Hua. Extraction and purification of anthocyanins from the fruit residues of *Vaccinium uliginosum* Linn / Z. Hua, D. Yuesheng, X. Ge, L. Menglu, D. Liya, A. LiJia, X. Zhilong // *Journal Chromatogr. Sep.* – 2013. – V.4. Issue 2. P. 100167.
177. Cvjetko Bubalo M. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents / M. Cvjetko Bubalo, N. Curko, M. Tomašević [et al.] // *Food Chemistry*. – 2016, – V.200. – P.159–166.
178. Sang, J. Deep eutectic solvent-based extraction coupled with green two-dimensional HPLC-DAD-ESI-MS/MS for the determination of anthocyanins from: *Lycium ruthenicum* Murr. Fruit / J. Sang, B. Li, Y.Y. Huang [et al.] // *Analytical Methods*. – 2018. – V. 10. – P.1247–1257.
179. Kou P. An integrated strategy for production of four anthocyanin compounds from *Ribes nigrum* L. by deep eutectic solvents and flash chromatography / P. Kou, Y.F. Kang, L.T. Wang [et al.] // *Journal Industrial & Engineering Chemistry Research*. – 2019. – V. 80. – P. 614–625.
180. M.E. Alañón. A novel sustainable approach for the extraction of value-added compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by natural deep eutectic solvents / M.E. Alañón, M. Ivanović, S. Pimentel-Mora [et al.] // *Food Res. Int.* – 2020. – V. 137. – P. 109646.
181. Seabra I.J. Effect of solvent (CO₂/ethanol/H₂O) on the fractionated enhanced solvent extraction of anthocyanins from elderberry pomace / I.J. Seabra, M.E.M. Braga, M.T. Batista, H.C. de Sousa // *Journal Supercritical Fluids*. – 2010. – V. 54(2). – P. 145–152.
182. Babova O. Extraction of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) antioxidants using supercritical/subcritical CO₂ and ethanol as co-solvent / O. Babova, A. Occhipinti, A. Capuzzo, M.E. Mafei // *Journal Supercritical Fluids*. – 2016. – V. 107. – P. 358–363.
183. Laroze L. E. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents / L. E. Laroze // *European Food Research and Technology*. – 2010. – V. 231. – P. 669–677.
184. Oztas E. Determination of natural antioxidant in black-berry fruits (*Rubus fruticosus*) by supercritical fluid extraction / E. Oztas // *Journal of the Faculty Engineering and Architecture of Gazi University*. – 2011. – V. 26, No 4. – P. 801–805.

185. Kagliwal L. D. Antioxidant-rich extract from dehydrated seabuckthorn berries by supercritical carbon dioxide extraction / L.D. Kagliwal // *Food and Bioprocess Technology*. – 2012. – V. 5, No. 7. – P. 2768–2776.
186. Mason J. The extraction of natural products using ultrasound or microwaves / J. Mason, T. Chemat, M. Vinatoru // *Current Organic Chemistry*. – 2011. – V. 15(2). – P. 237–247.
187. Esclapez M.D. Ultrasound-assisted extraction of natural products / M.D. Esclapez, J.V. García-Pérez, A. Mulet, J.A. Cárcel // *Food Engineering. Reviews*. – 2011. – V. 3(2). – P. 108.
188. Pingret D. Degradation during application of ultrasound in food processing: a review / D. Pingret, A.S. Fabiano-Tixier, F. Chemat // *Food Control*. – 2013. – V. 31(2) – P. 593–606.
189. Teng H. Optimization of ultrasonicassisted extraction of polyphenols, anthocyanins, and antioxidants from raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) using response surface methodology / H. Teng, W.Y. Lee, Y.H. Choi // *Food Analytical Methods*. – 2014. – V. 7(7). – P. 1536–1545.
190. Oancea S. Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars / S. Oancea, C. Grosu, O. Ketney, M. Stoia // *Acta Chimica Slovenica*. – 2013. – V. 60(2). – P. 383–389.
191. Katsampa P. A green ultrasound-assisted extraction process for the recovery of antioxidant polyphenols and pigments from onion solid wastes using Box–Behnken experimental design and kinetics / P. Katsampa, E. Valsamedou, S. Grigorakis, D.P. Makris // *Industrial Crops and Products* – 2015. – V. 77. – P. 535–543.
192. Mane S. Effect of ultrasound on the extraction of total anthocyanins from Purple Majesty potato / S. Mane, D.H. Bremner, A. Tziboula-Clarke, M.A. Lemos // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2015. – V. 27. – P 509-514.
193. B.K. Tiwari, A. Patras, N. Brunton, P.J. Cullen, C.P. O'donnell, Effect of ultrasound processing on anthocyanins and color of red grape juice / B.K. Tiwari, A. Patras, N. Brunton, P.J. Cullen, C.P. O'donnell // *Ultrasonics Sonochemistry*. – 2010. – V. 17(3). – P. 598–604.
194. Gilar M. Advances in sample preparation in electromigration, chromatographic and mass spectrometric separation methods / M. Gilar // *Journal of Chromatography A*. – 2001. – V. 909. – P. 111-135.
195. Titato G. Comparison Between Different Extraction (LLE and SPE) and Determination (HPLC and Capillary-LC) Techniques in the Analysis of Selected PAHs in Water

Samples / G. Titato // *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. – 2005. – V. 28. – P. 3045 – 3056.

196. Novakova L. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation / L. Novakova // *Analytical Chemistry Acta*. – 2009. – V. 656. – P. 8 – 35.

197. Wang J. Comparison between HPLC and MALDI-TOF MS analysis of anthocyanins in highbush blueberries / J. Wang // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2000. – V. 48, No. 8. – P. 3330–3335.

198. García-Viguera C. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit / C. García-Viguera // *Phytochemistry*. – 1998. – V. 9. – P. 274–277.

199. Giusti M. M. Electrospray and tandem mass spectroscopy as tools for anthocyanin characterization / M.M. Giusti // *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. – 1999. – V. 47, No. 11. – P. 4657–4664.

200. Huie C.W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants / C.W. Huie // *Analytical and bioanalytical chemistry*. – 2002. – V. 373, No. 1. – P. 23-30.

201. Stalikas C.D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids / C.D. Stalikas // *Journal of separation science*. – 2007. – V. 30, No. 18. – P. 3268-3295.

202. Andreassen M. F. Release of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acids in rye by commercial plant cell wall degrading enzyme preparations / M. F. Andreassen [et al.] // *Journal of the Science of Food and Agriculture*. – 1999. – V. 79, No. 3. – P. 411-413.

203. Yu J. Analysis of phenolic acids in barley by high-performance liquid chromatography / J. Yu, T. Vasanthan, F. Temelli // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2001. – V. 49, No. 9. – P. 4352-4358.

204. Kozłowska H. Phenolic acids in rapeseed and mustard / H. Kozłowska, D.A. Rotkiewicz, R. Zadernowski, F.W. Sosulski // *Journal of the American Oil Chemists' Society*. – 1983 – V. 60(6). – P.1119-1123.

205. Beveridge T. Simple measurement of phenolic esters in plant cell walls / T. Beveridge, E. Loubert, J. E. Harrison // *Food Research International*. – 2000. – V. 33. – P. 775-783.

206. Rommel A. Influence of acid and base hydrolysis on the phenolic composition of red raspberry juice / A. Rommel, R.E. Wrolstad // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1993. – V. 41, No. 8. – P. 1237-1241.

207. Bajkacz S. Determination of flavonoids and phenolic acids in plant materials using SLE-SPE-UHPLC-MS/MS method / S. Bajkacz, I. Baranowska, B. Buszewski, B. Kowalski, M. Ligor // *Food Analytical Methods*. – 2018 – V. 11(12). – P. 3563-3575.
208. Ky C.-L. Comparison of five purification methods for chlorogenic acids in green coffee beans (*Cofea sp.*) / C.-L. Ky, M. Noiro, S. Hamon // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 1997. – V. 45. – P. 786.
209. Zhao W. Separation and purification of chlorogenic acid from tobacco by-products by polyamide and silicagel column chromatography / W. Zhao, Y. Chen, S. Li, K. Dai [et al.] // *African Journal of Biotechnology*. – 2015. – V. 14, No. 20. – P. 1731-1736.
210. Li Z. Study on the determination of polyphenols in tobacco by HPLC coupled with ESI-MS after solid-phase extraction / Z. Li, L. Wang, G. Yang, H. Shi [et al.] // *Journal of Chromatographic Science*. – 2003. – V. 41, No. 1. – P. 36-40.
211. Suárez B. Solid-phase extraction and high-performance liquid chromatographic determination of polyphenols in apple musts and ciders / B. Suárez, A. Picinelli, J.J. Mangas // *Journal of Chromatography A*. – 1996. – V. 727, No. 2. – P. 203-209.
212. Yang W. Effects of co-existing microalgae and grazers on the production of hemolytic toxins in *Karenia mikimotoi* / W. Yang [et al.] // *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*. – 2011. – V. 29, No. 6. – P. 1155-1163.
213. Suárez-Quiroz M.L. Isolation of green coffee chlorogenic acids using activated carbon / M.L. Suárez-Quiroz, A.A. Campos, G.V. Alfaro., O. González-Ríos [et al.] // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2014. – V. 33, No.1 – P. 55–58.
214. Irakli, M.N. Simultaneous determination of phenolics acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection / M.N. Irakli, V.F. Samanidou, C.G. Biliaderis, I.N. Papadoyannis // *Journal of Separation Science*. – 2012. – V. 35 – P. 1603–1611.
215. Caprioli G. Importance of espresso coffee machine parameters on the extraction of chlorogenic acids in a certified Italian espresso by using SPE-HPLC-DAD / G. Caprioli, M. Cortese, L. Odello, M. Ricciutelli, G. Sagratini [et al.] // *Journal of Food Research*. – 2013. – V. 2. – P. 55–64.
216. Rabelo R.S. Ultrasound assisted extraction and nanofiltration of phenolic compounds from artichoke solid wastes / R.S. Rabelo [et al.] // *Journal of food engineering*. – 2016. – V. 178. – P. 170-180.
217. Drosou C. A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts / C. Drosou [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – V. 75. – P. 141-149.

218. Dranca F. Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel / F. Dranca, M. Oroian // *Ultrasonics sonochemistry*. – 2016. – V. 31. – P. 637-646.
219. Nicolai M. Antioxidant activity and rosmarinic acid content of ultrasound-assisted ethanolic extracts of medicinal plants / M. Nicolai, P. Pereira, R. F. Vitor [et al.] // *Measurement*. – 2016. – V. 89 – P. 328-332.
220. Routray W. MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods / W. Routray, V. Orsat // *Industrial Crops and Products*. – 2014. – V. 58 – P. 36–45.
221. Carniel N. Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *Physalis angulata* / N. Carniel [et al.] // *Journal of Food Process Engineering*. – 2017. – V. 40. No. 3. – P. e12433.
222. Milutinović M. Optimisation of microwave-assisted extraction parameters for antioxidants from waste *Achillea millefolium* dust / M. Milutinović [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – V. 77. – P. 333-341.
223. Camel V. Microwave-assisted solvent extraction of environmental samples / V. Camel // *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. – 2000. – V. 19, No. 4. – P. 229-248.
224. Hossain M.B. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology / M.B. Hossain, C. Barry-Ryan, A.B. Martin-Diana, N. P. Brunton // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 126(1). – P. 339-346.
225. Kukula-Koch W. Influence of extraction procedures on phenolic content and antioxidant activity of Cretan barberry herb / W. Kukula-Koch, N. Aligiannis, M. Halabalaki, A.L. Skaltsounis [et al.] // *Food chemistry*. – 2013 – V. 138(1). – P. 406-413.
226. Nayak B. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels / B. Nayak, F. Dahmoune, K. Moussi [et al.] // *Food chemistry*. – 2015. – V. 187 – P. 507-516.
227. Arnáiz, E. Optimisation of the supercritical fluid extraction of antioxidants from broccoli leaves / E. Arnáiz, J. Bernal, M.T. Martín [et al.] // *Food Analytical Methods*. – 2016. – V. 9(8). – P. 2174-2181.
228. Omar J. Optimization of focused ultrasound extraction (FUSE) and supercritical fluid extraction (SFE) of citrus peel volatile oils and antioxidants / J. Omar, I. Alonso, A. Garaikoetxea, N. Etxebarria // *Food Analytical Methods*. – 2013. – V. 6(4). – P. 1244-1252.

229. Santos S. A. Supercritical fluid extraction of phenolic compounds from Eucalyptus globulus Labill bark / S.A. Santos, J.J. Villaverde, C.M. Silva, C. P. Neto A. J. Silvestre // *The Journal of Supercritical Fluids*. – 2012. – V. 71. – P. 71-79.
230. Федорова О.А. Супрамолекулярная химия: учебное пособие / О. Федорова. – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева. – 2010. – 204 с.
231. Дейнека В.И. Супрамолекулярная химия: учебно-методический комплекс для магистров / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека – М.: НОУДПО «Институт АйТи». – 2011. – 158 с.
232. Breslow R. Biomimetic reactions catalysed by cyclodextrins and their derivatives / R. Breslow, S.D. Dong // *Chemical Reviews*. – 1999. – V. 98. – P. 1997-2011.
233. Zhao R. NMR Study on the Inclusion Complexes of β -Cyclodextrin with Isoflavones / R. Zhao, C. Sandström, H. Zhang, T. Tan // *Molecules* – 2016. – V. 21(4). – P. 372.
234. Анисимович И.П. Модулирование селективности разделения сорбатов за счет образования супрамолекулярных комплексов в подвижной фазе / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, В.Ф. Селеменев // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2010. – Т.10, Вып.3. – С. 401-408.
235. Анисимович И.П. Исследование образования комплексов включения β -циклодекстрина с фенольными кислотами методом ВЭЖХ / Анисимович И.П., Лапшова М.С., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. // *Высокие технологии, фонд. исслед., образование: сборник трудов Седьмой междунар. научно-практич. конф. «Исследование, разработка и применение высоких технологий в промышленности»*. – Санкт-Петербург. – 2009. – С. 159—161.
236. Дейнека В.И. Удерживание циклодекстринов в условиях обращенно-фазовой хроматографии и определение констант устойчивости комплексов включения антоцианов в β -циклодекстрин / В.И. Дейнека, А.Г. Доронин, Л.А. Дейнека [и др.] // *Журнал физической химии*. – 2018. – Т. 92. №. 11. – С. 1797-1801.
237. Дейнека В.И. Использование метода обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии для исследования комплексообразования антоцианов циклодекстрином / В.И. Дейнека, М.С. Лапшова, Л.А. Дейнека // *Журнал физической химии*. – 2014. – Т. 88, №. 6. – С. 1079-1081.
238. Анисимович И.П. Исследование супрамолекулярных комплексов хлорогеновых кислот с β -циклодекстрином / И.П. Анисимович, В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека // *Научные ведомости БелГУ. С. Естественные науки*. – 2011. – № 9 (104), Вып. 15/2. – С. 225-232.

239. Mohseni R.M. Retention characteristics of several compound classes in reversed-phase liquid chromatography with β -cyclodextrins as a mobile phase modifier / R.M. Mohseni, R. J. Hurtubise // *Journal of Chromatography*. – 1990. – V. 499. – P. 395-410.
240. Djajić N. Modified aqueous mobile phases: A way to improve retention behavior of active pharmaceutical compounds and their impurities in liquid chromatography / N. Djajić, J. Krmar, M. Rmandić [et al.] // *Journal of Chromatography Open*. – 2022. – V. 2. – P. 100023.
241. Fujimura K. Reversed-Phase Retention Behavior of Aromatic Compounds Involving P-Cyclodextrin Inclusion Complex Formation in the Mobile Phase / K. Fujimura, T. Ueda, M. Kitagawa, H. Takayanagi, T. Ando // *Analytical Chemistry*. – 1986. – V. 58. – P. 2668-2674.
242. Gornas P. Beta-cyclodextrin complexes with chlorogenic and caffeic acids from coffee brew: Spectroscopic, thermodynamic and molecular modelling study / P. Gornas, G. Neunert, K. Baczynski, K. Polewski // *Food Chemistry*. – 2009. – V. 114. – P. 190-196.
243. Alvarez-Parrilla E. Complexation of Apple Antioxidants: Chlorogenic Acid, Quercetin and Rutin by β -Cyclodextrin (β -CD) / E. Alvarez-Parrilla, L.A. de la Rosa, F. Torresrivias, J. Rodrigo-Garcia, G.A. Gonzalez-Aguilar // *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. – 2005. – V. 53. – P. 121-129.
244. Rodrigues E.M.G.M. Inclusion of Polyphenol Oxidase Substrates in β -Cyclodextrin: A ¹H-NMR Study / Rodrigues E., Vazi S., Gil V.M.S.S., Caldeira M.M., da Silva A.M.G.M. // *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. – 2002. – V. 44. – P. 395-397.
245. Alvarez-Parrilla E.R. Formation of Two 1:1 Chlorogenic Acid: β -cyclodextrin Complexes at pH 5: Spectroscopic, Thermodynamic and Voltammetric study / E.R. Alvarez-Parrilla, L.A. de la Rosa, B.A. Frontana-Uribe, G.A. Gonzalez-Aguilar, L. Machi, Ayala-Zavala J.F. // *Journal of Mexical Chemical Society*. – 2010. – V. 54(2). – P. 103-110.
246. Zhao M. Identification of cyclodextrin inclusion complex of chlorogenic acid and its antimicrobial activity / M. Zhao, H. Wang, B. Yang, H. Tao // *Food Chemistry*. – 2010. – V. 120. – P. 1138-1142.
247. Navarro Orcajada S. Study of the fluorescence and interaction between cyclodextrins and neochlorogenic acid, in comparison with chlorogenic acid / S. Navarro Orcajada, A. Matencio, Vicente C. Herrero, F. García Carmona, J.M. López Nicolás // *Scientific Reports*. – 2021. – V.11, No. 1 – P. 3275.
248. Deineka V.I. Peculiarities of the Mass Spectrometric Detection of Anthocyanins in High-Performance Liquid Chromatography / V.I. Deineka, A.N. Sidorov, A.N. Chulkov, L.A. Deineka // *Journal of Analytical Chemistry*. – 2017. – V. 14, No. 2. – P. 119–123.

249. Möller B. Quinic acid esters of hydroxycinnamic acids in stone and pome fruits / B. Möller, K. Herrmann // *Phytochemistry*. – 1983. – V. 22. – P. 477.
250. M.N. Clifford, K.L. Johnston, S. Knight, N. Kuhnert Hierarchical Scheme for LC-MSn Identification of Chlorogenic Acids / M.N. Clifford, K.L. Johnston, S. Knight, N. Kuhnert // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – V. 51. – P. 2900.
251. ОБЩАЯ ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ. Валидация аналитических методик ОФС.1.1.0012.15
252. Дейнека В.И. Роль морфологии пор сорбентов в твердофазной экстракции и в хроматографии: “Галерейные” поры / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, А.Н. Сидоров, И.И. Саенко // *Физикохимия поверхности и защита материалов*. – 2017. – Т. 53, № 3. – С. 262–265.
253. Mónica Giusti M. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy / M. Mónica Giusti, R.E. Wrolstad // *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* – 2001. – No.1.– P.1-2.
254. ГОСТ 32709-2014 Продукция соковая. Методы определения антоцианинов.
255. Žuvela P. Column characterization and selection systems in reversed-phase high-performance liquid chromatography / P. Žuvela, M. Skoczylas, J. Jay Liu [et al.] // *Chem. Rev.* – 2019. – V.119. – P.3674.
256. Ettre L.S. Nomenclature for chromatography (IUPAC Recommendations 1993) / Ettre L.S. // *Pure and Applied Chemistry*. – 1993. – V. 65. – No 4. – P. 819-872.
257. Welch C.R. Recent advances in anthocyanin analysis and characterization / C.R. Welch, Q. Wu, J. E. Simon // *Current analytical chemistry*. – 2008. – V. 4, No. 2. – P. 75-101.
258. Jirkal Š. Application of solvation model to prediction of the solute retention in liquid chromatography over a wide range of mobile-phase compositions / Š. Jirkal, M. Machovcová, J. G. K. Ševčík // *Acta Chromatographica*. – 2016. – V. 28, No. 1. – P. 59-78.
259. Snyder L.R. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems / L.R. Snyder, J.W. Dolan, J.R.J. Gant // *Journal of Chromatography A*. – 1979. – V. 165, No. 1. – P. 3-30.
260. Schoenmakers P.J. Gradient selection in reversed-phase liquid chromatography / Schoenmakers P.J. [et al.] // *Journal of Chromatography A*. – 1978. – V. 149. – P. 519-537.
261. Walter T.H. Mechanism of retention loss when C8 and C18 HPLC columns are used with highly aqueous mobile phases / T. H. Walter, P. Iraneta, M. Capparella // *Journal of Chromatography A*. – 2005. – T. 1075. – No. 1-2. – P. 177-183.
262. Nielsen I. L. F. Quantification of anthocyanins in commercial black currant juices by simple high-performance liquid chromatography. Investigation of their pH stability and

antioxidative potency / I.L.F. Nielsen [et al.] // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – V. 51, No. 20. – P. 5861-5866.

263. Šimerdová B. Evaluation of anthocyanin profiles in various blackcurrant cultivars over a three-year period using a fast HPLC-DAD method / B. Šimerdová [et al.] // *Foods*. – 2021. – V. 10, No 8. – P. 1745.

264. Bordonaba J. G. A new acetonitrile-free mobile phase for HPLC-DAD determination of individual anthocyanins in blackcurrant and strawberry fruits: A comparison and validation study / J. G. Bordonaba, P. Crespo, L. A. Terry // *Food Chemistry*. – 2011. – V. 129, No. 3. – P. 1265-1273.

265. Дейнека Л.А. ВЭЖХ в контроле антоцианового состава плодов черной смородины / Л.А. Дейнека, Е.И. Шапошник, Д.А. Гостищев [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2009. – Т.9. – С. 529

266. Slimestad R. Anthocyanins from black currants (*Ribes nigrum* L.) / R. Slimestad, H. Solheim // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2002. – V. 50, No. 11. – P. 3228-3231.

267. Jakobek L. Anthocyanin content and antioxidant activity of various red fruit juices / L. Jakobek, M. Seruga, M. Medvidović-Kosanović [et al.] // *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. – 2007. – V. 103. – P. 58.

268. Дейнека В.И. Использование ВЭЖХ при определении антоцианов цветков растений семейства Malvaceae / В.И. Дейнека, Я.Ю. Кульченко, Е.Ю. Олейниц [и др.] // *Сорбционные и хроматографические процессы*. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 150.

269. Дейнека В.И. Использование сравнительного метода Карапетьянца в хроматографии / В. И. Дейнека, Я.Ю. Кульченко, А.Н. Чулков [и др.] // *Журнал физической химии*. – 2019. – Т. 93, № 5. – С. 790.

270. Дейнека В.И. Хроматографическое разделение и определение антоцианов в условиях обращенно-фазовой хроматографии при использовании в качестве подвижных фаз систем ацетонитрил–муравьиная кислота/фосфорная кислота–вода / В.И. Дейнека, Е.Ю. Олейниц, Я.Ю. Саласина [и др.] // *Журнал физической химии*. – 2021. – Т. 95. – С. 1278-1283

271. Monica Giusti M. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy / M. Monica Giusti, R.E. Wrolstad // *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.* – 2001. – No. 1. – P.1-13.

272. Дейнека В.И. Управление селективностью разделения и определение антоцианов плодов растений семейства Vaccinium с применением элюентов состава

ацетонитрил–муравьиная кислота–вода / В.И. Дейнека, Е.Ю. Олейниц, Я.Ю. Кульченко, И.П. Блинова, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2020. – Т. 75. – С. 1021.

273. Дейнека В.И. Карта хроматографического разделения и инкрементные зависимости в методе относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Журнал физической химии. – 2006. – Т. 80. – С. 511.

274. Дейнека В.И. Экспериментальное обоснование метода относительного анализа удерживания в ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Журнал физической химии. – 2006. – Т. 80. – С. 507.

275. Дейнека В.И. Метод относительного анализа удерживании: обращенно-фазовая ВЭЖХ триглицеридов / В.И. Дейнека, Л.А. Дейнека, А.В. Туртыгин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2008. – Т. 8, Вып. 3. – С. 465.

276. Дейнека В.И. Определение антоцианов методом ВЭЖХ. Некоторые закономерности удерживания / В.И. Дейнека, А.М. Григорьев // Журнал аналитической химии. – 2004. – Т. 59. – С. 305.

277. Katz E. Peak dispersion and mobile phase velocity in liquid chromatography: the pertinent relationship for porous silica / E. Katz, K.L. Ogan, R.P.W. Scott // Journal of Chromatography. – 1983. – V. 270. – P. 51.

278. Brown P.N. Determination of anthocyanins in cranberry fruit and cranberry fruit products by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection: Single-laboratory validation / P.N. Brown, P.R Shipley. // J. AOAC Int. – 2011. – V. 94. – P. 459.

279. Vorsa N. Alteration of anthocyanin glycosylation in Crabberry through interspecific hybridization / N. Vorsa, J.J. Polashock // Journal of the American Society for Horticultural Science. – 2005. – V. 130. – P. 711.

280. Jurikova T. Bioactive compounds, antioxidant activity, and biological effects of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos*) / T. Jurikova, S. Skrovankova, J. Mlcek, S. Balla, L. Snopek // Molecules. – 2019. – V. 24. – P. 24.

281. Česonienė L. Investigations of anthocyanins, organic acids, and sugars show great variability in nutritional and medicinal value of European cranberry (*Vaccinium oxycoccos*) fruit / L. Česonienė, R. Daubaras, I. Jasutienė, I. Miliauskienė, M. Zych // Journal of Applied Botany and Food Quality – 2015. – V. 88. – P. 295.

282. Huopalahti R. A novel solidphase method for the analysis of anthocyanins and organic acid composition of Finnish cranberry / R. Huopalahti, E.P. Jrvemp, K. Katina // Journal of liquid chromatography and related technologies – 2000. – V. 23. – P. 2695.

283. Properties of solvents used in HPLC. Practical HPLC Method Development, Second Edition / Lloyd R. Snyder, Joseph J. Kirkland and Joseph L. Glajch. – John Wiley & Sons, Inc. – 1997. – ISBN 0-471-00703-X.

284. Meinhart A.D. Multivariate optimization of chlorogenic acid extraction from brazilian coffee / A.D. T.F.F. Meinhart da Silveira, R.A. Silva, F.M. Damin, R.E. Bruns, H.T. Godoy // Food Analytical Methods. – 2017. – V. 10. – P. 2943.

285. Schrader K. Determination of chlorogenic acids with lactones in roasted coffee / K. Schrader, A. Kiehne, U.H. Engelhardt, H.G. Maier // Journal of the Science of Food and Agriculture. – 1996. – V. 71. – P. 392.

286. Guerrero G. Chlorogenic acids as a potential criterion in coffee genotype selections / G. Guerrero, M. Suárez // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2001. – V. 49. – P. 2454.

287. Дейнека В.И. Новый метод оценки влияния остаточных силанольных групп на суммарное удерживание в обращено-фазовой ВЭЖХ / В.И. Дейнека // Журнал аналитической химии – 2007. – Т.62, №7. – С. 740-744.

288. Peres R.G. HPLC-DAD-ESI/MS Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Ilex paraguariensis Beverages and On-Line Evaluation of Individual Antioxidant Activity / R.G. Peres, F.G. Tonin, M.F.M. Tavares, Rodriguez-Amaya D.B. // Molecules. – 2013. – V. 18. – P. 3859-3871.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблицы

Таблица А.1 – Зависимость удерживания четырех антоцианов от состава подвижной фазы системы $\text{CH}_3\text{CN} - \text{HCOOH}$ (10 об.%) – вода

Сорбат	Параметры уравнения (3.3)			R^2
	a_0	a_1	a_2	
Dp3G	1.3628	-0.1878	0.0028	0.99995
Dp3R	1.6524	-0.2169	0.0035	0.99996
Cy3G	1.6365	-0.1942	0.0036	0.99995
Cy3R	1.9659	-0.2258	0.0044	0.99996

Таблица А.2 – Относительное удерживание трех антоцианов от удерживания цианидин-3-глюкозида в подвижной фазы системы $\text{CH}_3\text{CN} - \text{HCOOH}$ (10 об.%) – вода

Сорбат	Параметры уравнения (3.7)			a_0^*/a_0^{**}
	a_0	a_1	R^2	
Dp3Glu	-0.294	1.017	0.99996	1.363/1.419
Dp3Rut	-0.229	1.175	0.99998	1.652/1.694
Cy3Glu	0	1	-	1.637/1.637
Cy3Rut	0.081	1.144	1.00000	1.966/1.953

Примечания: a_0^* - из уравнения (2); a_0^{**} - рассчитано по уравнениям (3)

Таблица А.3 – Параметры уравнения относительного удерживания некоторых антоцианов для двух элюентных систем: системы I: метанол–10 об. % муравьиной кислоты–вода в сравнении с картой разделения антоцианов для системы II: ацетонитрил–10 об. % муравьиной кислоты–вода.

Антоциан	Система I		Система II	
	a_1	a_0	a_1	a_0
Cy3Sam	1.104 ± 0.008	-0.062 ± 0.003	1.092 ± 0.007	-0.053 ± 0.004
Cy3Sopho	1.083 ± 0.006	-0.230 ± 0.002	1.089 ± 0.007	-0.238 ± 0.004
Cy3R	1.146 ± 0.008	0.080 ± 0.004	1.127 ± 0.006	0.094 ± 0.003
Cy3XR	1.263 ± 0.007	-0.029 ± 0.003	1.232 ± 0.005	0.003 ± 0.002
Cy3GR	1.267 ± 0.009	-0.198 ± 0.004	1.254 ± 0.005	-0.192 ± 0.004

Таблица А.4 – Антоцианы плодов клюквы окраски разной интенсивности

Антоцианы	Окраска плодов		
	светло-красная	красная	Темно-красная
Cy3Gala	18.8	19.4	19.8*
Cy3G	0.5	1.0	4.1
Cy3Ara	25.6	19.2	15.5
Pn3Gala	26.1	30.9	30.2
Pn3G	1.8	5.4	12.5
Pn3Ara	21.2	19.2	14.7
Остальные	5.9	4.9	3.3
Сумма антоцианов**	0.017	0.029	0.065

* Приведены доли по площадям пиков, мол. %; ** г/100 г свежих плодов в пересчете на Cy3Glu хлорид.

Таблица А.5 – Параметры квадратичной зависимости для двух элюентных систем. Система I – «ацетонитрил–муравьиная кислота–вода»; система II – «ацетон–муравьиная кислота–вода»

Антоциан	Параметры квадратичного уравнения					
	Система I			Система II		
	a_0	a_1	$a_2 \cdot 1000$	a_0	a_1	$a_2 \cdot 1000$
Dp3G	1.368	-0.185	2.03	1.356	-0.277	9.39
Cy3G	1.673	-0.199	3.46	1.589	-0.277	10.03
Pt3G	2.024	-0.230	4.54	1.89	-0.311	11.23
Pg3G	1.916	-0.203	3.99	1.786	-0.271	9.93
Pn3G	2.229	-0.221	4.46	2.082	-0.306	11.32
Mv3G	2.516	-0.240	4.38	2.334	-0.331	11.69

Таблица А.6 – Параметры уравнения относительного удерживания некоторых антоцианов для двух элюентных систем. Система I – «ацетонитрил–муравьиная кислота–вода»; система II – «ацетон–муравьиная кислота–вода»

Антоциан	a_0		a_1	
	Система I	Система II	Система I	Система II
Dp3Glu	-0,583	-0,519	1,088	1,068
Cy3Glu	-0,266	-0,237	1,032	1,025
Pt3Glu	-0,124	-0,171	1,12	1,158
Pg3Glu	0	0	1	1
Pn3Glu	0,152	0,081	1,080	1,117
Mv3Glu	0,264	0,125	1,171	1,247

Таблица А.7 – Параметры уравнения относительного удерживания различных гликозидов цианидина для двух элюентных систем. Система I – «ацетонитрил–муравьиная кислота–вода»; Система II – «ацетон–муравьиная кислота–вода»

Антоциан	Система I		Система II	
	a_0	a_1	a_0	a_1
Cy3R	0.077	1.144	0.050	1.164
Cy3GRut	-0.203	1.272	-0.256	1.316
Cy3XRut	-0.035	1.263	-0.085	1.129
Cy3Sopho	-0.235	1.090	-0.251	1.105
Cy3Sam	-0.067	1.107	-0.084	1.119

Таблица А.8 – Параметры уравнения относительного удерживания антоцианов в системе «этилацетат–10 об.% муравьиной кислоты–вода»

Антоциан	Параметры уравнения (3.7)	
	a_0	a_1
Dp3G	-0.504	1.068
Cy3G	0.113	0.848
Pt3G	-0.191	1.181
Pg3G	0	1
Pn3G	0.059	1.156
Mv3G	0.061	1.340
Cy3Rut	0.001	1.232
Cy3GRut	-0.335	1.465
Cy3XRut	-0.137	1.341
Cy3Sopho	-0.306	1.254
Cy3Sam	-0.119	1.170

Таблица А.9 – Параметры уравнений относительного удерживания (3.9) антоцианов для подвижных фаз на основе ацетонитрила, подкисленных двумя типами кислот

№	Антоциан	НСООН		H ₃ PO ₄	
		a	b	a	b
1	Dp3G	1.072	-0.566	1.139	-0.585
2	Cy3G	1.028	-0.260	1.053	-0.262
3	Pt3G	1.134	-0.126	1.129	-0.141
4	Pn3G	1	0	1	0
5	Pn3G	1.089	0.148	1.072	0.128
6	Mv3G	1.188	0.258	1.152	0.225

Таблица А.10 – Зависимость эффективности хроматографических систем (по числу теоретических тарелок) от концентрации кислот в подвижной фазе

№	Антоциан	Эффективность при указанной концентрации муравьиной кислоты, об. %				
		10	7.75	5.5	3.25	1
1	Dp3G	4134	3648	2825	1817	737
2	Cy3G	6493	5802	4779	3361	1505
3	Pt3G	5685	4473	3070	1752	641
4	Pn3G	8048	6686	5054	3249	1300
5	Mv3G	5834	4337	2816	1652	572
№	Антоциан	Эффективность при указанной концентрации фосфорной кислоты, об. %				
		2	1.5	1	0.5	0.25
1	Dp3G	4450	3926	3465	2494	1719
2	Cy3G	6920	6243	5712	4577	3248
3	Pt3G	6462	5490	4476	2814	1691
4	Pn3G	9010	7979	6807	4639	2967
5	Mv3G	6696	5188	3964	2141	1360

Таблица А.11 – Параметры уравнений относительного удерживания по уравнению (3.7) антоцианов для подвижных фаз на основе метанола и ацетонитрила, подкисленных орто-фосфорной кислотой

№	Антоциан	CH ₃ OH		CH ₃ CN	
		a_0	a_1	a_0	a_1
1	Dp3G	-0.474	1.094	-0.585	1.139
2	Cy3G	-0.222	1.042	-0.262	1.053
3	Pt3G	-0.119	1.124	-0.141	1.129
4	Pg3G	0	1	0	1
5	Pn3G	0.084	1.088	0.128	1.072
6	Mv3G	0.143	1.183	0.225	1.152

Таблица А.12 – Параметры уравнения относительного удерживания различных гликозидов цианидина для двух элюентных систем. Система I – «метанол–ортофосфорная кислота–вода»; система II – «ацетонитрил– ортофосфорная кислота–вода»

№	Антоциан	Система I		Система II	
		a_0	a_1	a_0	a_1
1	Cy3Rut	0.091	1.118	0.074	1.121
2	Cy3Sopho	-0.243	1.099	-0.225	1.082
3	Cy3Sam	-0.046	1.091	-0.056	1.090
4	Cy3GRut	-0.196	1.243	-0.212	1.261
5	Cy3XRut	0.002	1.214	-0.042	1.246

Таблица А.13.- Параметры уравнения (3.3) для удерживания соединений в подвижных фазах «ацетонитрил – 1 об.% муравьиной кислоты – вода»

Вещество	a_0	a_1	a_2	R^2
3CQA	1.428	-0.162	$4.38 \cdot 10^{-3}$	0.99997
5CQA	1.933	-0.183	$4.77 \cdot 10^{-3}$	0.99994
4CQA	2.187	-0.211	$5.83 \cdot 10^{-3}$	0.99987
кофеин	1.928	-0.171	$4.53 \cdot 10^{-3}$	0.99990

Таблица А.14 – Параметры уравнения (3.7) для удерживания трех изомерных монокофеоилхинных относительно кофеина в подвижных фазах «ацетонитрил – 1 об.% муравьиной кислоты – вода»

Вещество	a_0	a_1	R^2
3CQA	-0.386	0.935	0.99989
5CQA	-0.148	1.085	0.99991
4CQA	-0.141	1.190	0.99979

Таблица А.15 – Параметры уравнения (3.2) для удерживания соединений в подвижных фазах «6 об. % ацетонитрила – муравьиная кислота – вода»

Вещество	a_0	a_1	a_2	R^2
3CQA	0.709	-0.100	$2.50 \cdot 10^{-3}$	0.99998
5CQA	1.107	-0.100	$2.52 \cdot 10^{-3}$	1.00000
4CQA	1.238	-0.109	$2.88 \cdot 10^{-3}$	0.99999
кофеин	1.122	-0.055	$1.34 \cdot 10^{-3}$	1.00000

Таблица А.16 – Параметры уравнения (3.7) для удерживания трех изомерных монокофеоилхинных относительно кофеина в подвижных фазах «6 об.% ацетонитрила – муравьиная кислота – вода»

Вещество	a_0	a_1	R^2
3CQA	-1.326	1.812	0.99995
5CQA	-0.934	1.817	0.99998
4CQA	-0.938	1.934	0.99989

Таблица А.17 – Параметры уравнения (3.2) для удерживания изомерных монокофеоилхинных кислот относительно кофеина в подвижных фазах «ацетонитрил – 0.3 об.% ортофосфорной кислоты – вода»

Вещество	a_0	a_1	R^2
3CQA	-0.303	0.950	0.9999
5CQA	-0.068	1.104	0.9997
4CQA	-0.047	1.212	0.9998

Таблица А.18 – Параметры уравнения (3.3) для удерживания соединений в подвижных фазах «ацетон – 0.5 об.% ортофосфорной кислоты – вода»

Вещество	a_0	a_1	a_2	R^2
3CQA	1.715	-0.150	$3.75 \cdot 10^{-3}$	0.99994
5CQA	1.931	-0.170	$4.29 \cdot 10^{-3}$	0.99996
4CQA	2.100	-0.180	$4.49 \cdot 10^{-3}$	0.99996

Таблица А.19 – Параметры уравнения (3.3) для удерживания соединений в подвижных фазах «пропанол-2–0.3 об.% ортофосфорной кислоты–вода»

Вещество	a_0	a_1	a_2	R^2
3CQA	1.358	-0.307	$1.79 \cdot 10^{-2}$	0.99996
5CQA	1.898	-0.328	$1.83 \cdot 10^{-2}$	0.99994
4CQA	2.116	-0.373	$2.10 \cdot 10^{-2}$	0.99992
кофеин	1.909	-0.339	$1.95 \cdot 10^{-2}$	1.00000

Таблица А.20 – Параметры уравнения (3.7) для удерживания соединений в подвижных фазах «пропанол-2–0.3 об.% ортофосфорной кислоты–вода»

Вещество	a_0	a_1	R^2
3CQA	-0.351	0.891	0.99996
5CQA	0.018	0.994	0.99993
4CQA	-0.006	1.119	0.99992

Таблица А.21 – Параметры уравнения (3.2) для удерживания соединений в подвижных фазах «этилацетат–0.6 об.% ортофосфорной кислоты–вода»

Вещество	a_0	a_1	R^2
3CQA	0.217	0.698	0.998
5CQA	0.481	0.829	0.998
4CQA	0.465	0.967	0.998

Таблица А.22 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеилхинных кислот в системе «ацетонитрил – 0.25 об.% фосфорной кислоты – вода»

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0
CH ₃ CN	1,3diCQA	1.281	0.301
	1,5diCQA	1.601	0.963
	3,4diCQA	1.628	0.881
	3,5diCQA	1.509	0.953
	4,5diCQA	1.786	1.130

Таблица А.23 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеилхинных кислот в системе «метанол-ортофосфорная кислота-вода»

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0
Метанол	1,3diCQA	1.621	-0.405
	1,5diCQA	1.971	0.249
	3,4diCQA	1.889	0.177
	3,5diCQA	1.883	0.207
	4,5diCQA	2.021	0.505

Таблица А.24 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеoilхинных кислот в системе «пропанол-2-ортофосфорная кислота-вода»

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0
ИПС	1,3diCQA	1.263	0.165
	1,5diCQA	1.803	0.942
	3,4diCQA	1.746	1.768
	3,5diCQA	1.555	0.836
	4,5diCQA	2.060	1.213

Таблица А.25 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеoilхинных кислот в системе «этанол-2-ортофосфорная кислота-вода»

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0
Этанол	1,3diCQA	1.679	-0.537
	1,5diCQA	2.040	0.145
	3,4diCQA	1.998	-0.021
	3,5diCQA	1.883	0.084
	4,5diCQA	2.019	0.151

Таблица А.26 – Предельное удерживание (величина коэффициента a_0 в уравнении 3.3) дикофеoilхинных кислот на различных стационарных фазах в двух элюентных системах

Элюентные системы	Вид diCQA	lgk(i) diCQA по данным для двух элюентных систем			
		K4	K18	C6Ph	C10CN
CH ₃ CN– 0.25 об.% H ₃ PO ₄ – вода	3,4diCQA	3.345	3.770	2.251	2.665
	3.5diCQA	3.109	3.611	2.230	2.563
	4.5diCQA	3.696	4.322	2.726	3.129
ИПС– 0.25 об.% H ₃ PO ₄ – вода	3,4diCQA	-	2.631	2.558	2.396
	3.5diCQA	-	2.523	2.531	2.294
	4.5diCQA	-	3.323	2.902	2.896

Стационарные фазы: K4 – Kromasil 300-5C4; K18 - Kromasil 100-5C18;

C6Ph – Gemini C6Ph; Диасфер C10CN.

Таблица А.27 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхинных кислот на фенилгексильной фазе

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0	R^2
CH ₃ CN	1,3diCQA	1.119 ± 0.028	0.358 ± 0.012	0.9999
	1,5diCQA	1.242 ± 0.370	1.029 ± 0.159	0.9994
	3,4diCQA	1.268 ± 0.133	0.923 ± 0.058	0.9998
	3,5diCQA	1.195 ± 0.112	1.007 ± 0.047	0.9999
	4,5diCQA	1.371 ± 0.206	1.175 ± 0.088	0.9998
ИПС	1,3diCQA	1.153 ± 0.241	0.252 ± 0.106	0.9993
	1,5diCQA	1.309 ± 0.503	0.858 ± 0.220	0.9991
	3,4diCQA	1.334 ± 0.538	0.839 ± 0.236	0.9989
	3,5diCQA	1.214 ± 0.459	0.924 ± 0.202	0.9991
	4,5diCQA	1.460 ± 0.119	1.221 ± 0.052	0.9999

Таблица А.28 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Диасфер С10СN

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0	R^2
CH ₃ CN	1,3diCQA	1.253 ± 0.142	0.378 ± 0.045	0.9999
	1,5diCQA	1.569 ± 0.056	1.054 ± 0.018	0.9999
	3,4diCQA	1.509 ± 0.012	0.944 ± 0.003	0.9999
	3,5diCQA	1.443 ± 0.036	0.949 ± 0.012	0.9999
	4,5diCQA	1.701 ± 0.063	1.241 ± 0.020	0.9999
ИПС	1,3diCQA	1.233 ± 0.163	0.326 ± 0.040	0.9998
	1,5diCQA	1.451 ± 0.118	0.897 ± 0.029	0.9999
	3,4diCQA	1.499 ± 0.118	0.909 ± 0.029	0.9999
	3,5diCQA	1.363 ± 0.110	0.939 ± 0.028	0.9999
	4,5diCQA	1.722 ± 0.028	1.271 ± 0.006	0.9999

Таблица А.29 – Параметры уравнений относительного удерживания изомерных дикофеоилхинных кислот на стационарной фазе Reprosil-Pur C18AQ

Органический модификатор	Вещество	a_1	a_0	R^2
CH ₃ CN	1,3diCQA	1.276 ± 0.006	0.292 ± 0.001	0.9999
	1,5diCQA	1.647 ± 0.015	0.952 ± 0.002	0.9999
	3,4diCQA	1.613 ± 0.134	0.857 ± 0.018	0.9999
	3,5diCQA	1.577 ± 0.182	0.937 ± 0.026	0.9999
	4,5diCQA	1.766 ± 0.126	1.116 ± 0.018	0.9999

Таблица А.30 – Времена удерживания дикофеоилхинных кислот при различных pH подвижной фазы

	pH	2.24	2.75	2.91	3.13	3.51	4.12	5.46	5.90
1	1,3diCQA	4.55	4.27	4.11	3.85	3.32	2.84	н/о	н/о
2	3,4diCQA	11.53	11.38	11.12	10.46	8.88	6.63	5.81	5.63
3	3,5diCQA	11.82	11.45	11.00	10.62	9.06	6.37	5.22	5.06
4	1,5diCQA	12.86	11.76	10.90	10.04	7.40	4.42	5.81	5.64
5	4,5diCQA	19.09	18.32	17.63	16.23	12.58	7.61	3.52	3.46