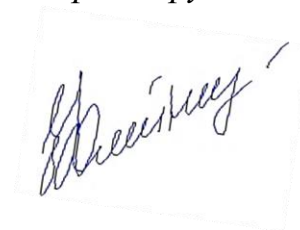


На правах рукописи



Олейниц Елена Юрьевна

**УПРАВЛЕНИЕ РАЗДЕЛЕНИЕМ НЕКОТОРЫХ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ В УСЛОВИЯХ ОБРАЩЕННО-ФАЗОВОЙ ВЭЖХ**

1.4.2. Аналитическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата
химических наук

Воронеж – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Дейнека Виктор Иванович

Официальные оппоненты: **Яшин Яков Иванович**
доктор химических наук, профессор,
ООО «Интерлаб», отдел исследований и разработок, научный консультант

Карпов Сергей Иванович
доктор химических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», химический факультет, кафедра аналитической химии, доцент

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный университет имени академика Н.П. Королева», г. Самара


Защита состоится «05» апреля 2023 г. в 16⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.07 при Воронежском государственном университете по адресу: 394018 г. Воронеж, Университетская пл. 1, химический факультет, ауд.439.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан «15» февраля 2023 г.

Учёный секретарь диссертационного совета 24.2.288.07

кандидат химических наук, доцент



Столповская Надежда Владимировна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 рН 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 монокофеоил- и дикофеоилхинных 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 дикофеоилхинные 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 дикофеоилхинных 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 конференции, 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение посвящено актуальности темы диссертационного исследования и включает в себя цель и задачи, научную новизну, теоретическую и практическую значимость полученных результатов, основные положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена аналитическому обзору литературы по теме диссертационного исследования. Дана краткая информация о факторах, влияющих на удерживание в ОФ ВЭЖХ, включая описание механизмов удерживания, обращенно-фазовых сорбентов, а также зависимость удерживания от состава подвижной фазы. Описаны классификация и биологическая роль некоторых фенольных соединений, а именно: антоцианов и фенольных кислот. Перечислены хроматографические методы исследования данных веществ, а также их источники. Дана краткая информация о методах пробоподготовки некоторых фенольных соединений, а также рассмотрена информация о комплексах включения по типу «гость-хозяин» фенольных соединений с циклодекстринами.

Во второй главе приведены все методы, использованные в ходе выполнения диссертационного исследования. Экстракцию антоцианов проводили настаиванием в солянокислой среде, хлорогеновых кислот – в горячей воде, с последующим фильтрованием. Количественное определение антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид проводили с помощью спектрофотометрирования. Во второй главе также представлены метрологические характеристики спектрофотометрического определения антоцианов. Хроматографическое поведение исследуемых веществ осуществляли на оборудовании Agilent 1200 Infinity с диодно-матричным и масс-спектрометрическим детекторами. Мертвое время, t_0 , определяли по урацилу или щавелевой кислоте. Хроматограммы записывали, хранили и обрабатывали в программном продукте ChemStation 32. Дополнительно программы и весь набор данных обрабатывали в MSExcel.

Третья глава представляет собой результаты и их обсуждения. Предложено совместное изучение карт разделения двух типов.

Первый тип карт разделения основывается на зависимости логарифма фактора удерживания от объемной доли органического модификатора (ОМ). Простейший вариант уравнения Снайдера (1) может быть применен только в ограниченном диапазоне составов подвижных фаз (ПФ):

$$\lg k(i) = a_0(i) - a_1(i) \cdot \varphi(OM) \quad (1),$$

тогда как квадратичное уравнение (2) используется в широком диапазоне составов, включая аппроксимацию удерживания на нулевое содержание ОМ.

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

Именно удерживание в подвижных фазах с нулевым содержанием органического модификатора было предложено в данной работе использовать для оценки энергии взаимодействия веществ с используемой стационарной фазой при корректном сравнении селективности различных СФ. Отметим, что, к сожалению, экспериментальная проверка такой аппроксимации принципиально не всегда возможна вследствие, в первую очередь, коллапса фаз.

По вытеснительной модели Мураками в некотором диапазоне составов ПФ удерживание вещества зависит от концентрации ацетонитрила по уравнению (3), где $n(i)$ рассматривается как количество молей ОМ, вытесняемого при сорбции вещества (i):

$$\lg k(i) = a_i - n(i) \cdot \lg c(OM) \quad (3)$$

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

$$\lg k(rep) = a_{rep} - n(rep) \cdot \lg c(OM) \quad (4)$$

Исключая концентрацию ОМ из уравнений (3) и (4), получаем уравнение относительного удерживания:

$$\lg k(i) = \frac{n(i)}{n(rep)} \cdot \lg k(rep) + a_i - \frac{n(i)}{n(rep)} \cdot a_{rep}, \quad (5)$$

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

В уравнении (6) коэффициент a_1 равен соотношению количества молей органического модификатора, вытесняемого при сорбции вещества (i) относительно вещества сравнения, $n(rep)$. И хотя числа высвобождаемых молекул ОМ не постоянны во всем диапазоне составов подвижных фаз, их соотношение, a_1 , как показывает эксперимент, остается постоянным в широком диапазоне составов. Это позволяет проводить экстраполяцию далеко за пределы составов, используемых в ПФ, и этот параметр является важной характеристикой сольватации аналита молекулами ОМ выбранной элюентной системы.

Обработка экспериментальных данных по уравнению (2) 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. 1.

Доказательством согласованности двух типов карт является то, что точки, соответствующие экстраполяции (по карте первого типа) хорошо укладываются на линии трендов карт второго типа, рис. 2

Однако карты второго типа удобнее, т.к. линейность относительного удерживания позволяет оценивать особенности сольватации различных веществ относительно вещества сравнения. А также на картах второго типа проще (требуется меньший набор экспериментальных данных) обнаружить любые изменения в порядке элюирования во всем диапазоне составов ПФ. Это позволяет сопоставлять различные ОМ, для которых на карте различия будут

состоять только в наклонах линий трендов. Т.о. постоянным остаётся порядок элюирования в чисто водных растворителях (по картам разделения первого типа), а порядок элюирования в реально используемых составах подвижных фаз уже зависит от параметров А разделяемых аналитов.

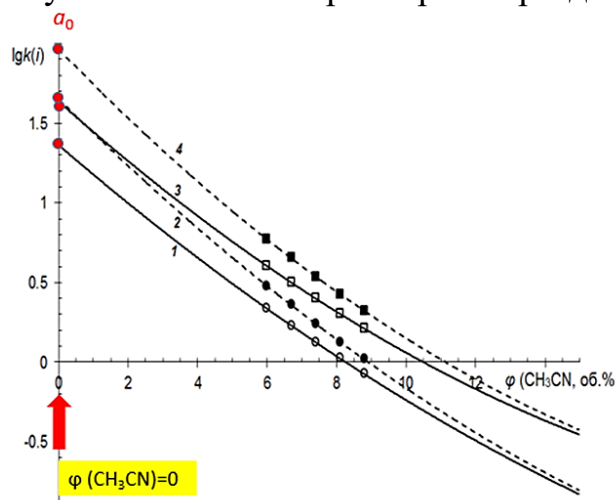


Рис. 1. Карта разделения первого типа, основанная на уравнении (3)

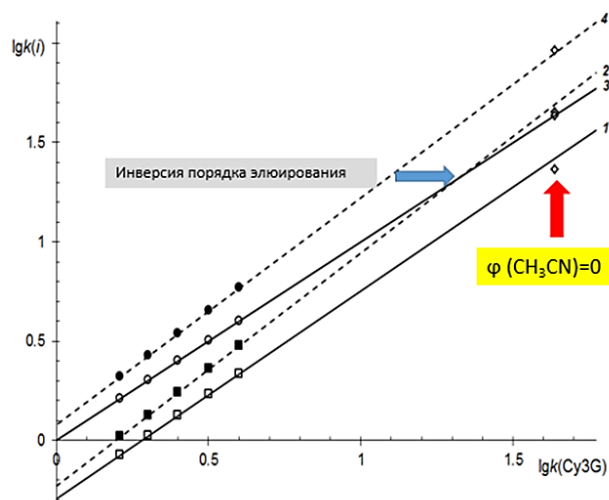


Рис. 2. Карта разделения второго типа, основанная на уравнении относительного удерживания.

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

Для оценки влияния замены ОМ на удерживание антоцианов была построена референтная система для ПФ «ацетонитрил–10% муравьиной кислоты– вода», которая показывает, что также существует соответствие между картами первого и второго типа, рис 3. Здесь учтено изменение времен удерживания при изменении концентрации ОМ, т.е. найдены параметры a_1 уравнения относительного удерживания, а значит можно оценивать изменения сольватационных характеристик при замене ОМ. При этом видно, что порядок, соответствующий прочности взаимодействия веществ со СФ благодаря различной сольватации этих веществ ацетонитрилом меняется на обратный для

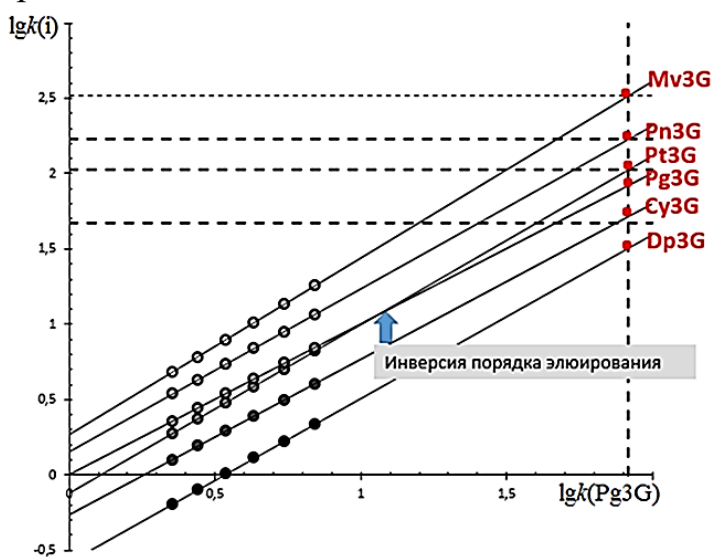


Рис. 3. Карта разделение антоцианов в системе «CH₃CN – 10 об.% HCOOH – вода»

производных P_g и P_t. Для остальных веществ инверсии в реальных составах ПФ не наблюдались.

При смене ацетонитрила на другой органический растворитель порядок элюирования при нулевом содержании любого органического растворителя должен оставаться постоянным, и различия могут возникнуть только при различной сольватации разделяемых компонентов органического растворителя.

Замена ацетонитрила на

метанол давно известна и многократно описана в мировой литературе, однако авторами существующих статей не упоминается возможное протекание реакции этерификации между метанолом и муравьиной кислотой. Наши исследования показали, что действительно наблюдается длительный дрейф удерживания при разделении антоцианов в ПФ, содержащей одновременно муравьиную кислоту и метанол. Этот дрейф может быть объяснен только реакцией этерификации, проходящей в данном элюенте. Поэтому для возможности замены ацетонитрила на метанол нами предложено использовать два компонента ПФ в разных сосудах, один из которых содержит только метанол, другой только кислоту, которые смешиваются в заданном соотношении с помощью градиентного насоса. При этом удастся получить воспроизводимые времена удерживания. Анализ карт разделения второго типа показал, что замена ацетонитрила на метанол приводит к небольшим изменениям в разделении антоцианов, но без существенных ухудшений. Замена ацетонитрила на метанол, как на компонент с большей вязкостью, приводит лишь к небольшому росту давления (на 10–15%) для использованных в работе составов ПФ. При этом происходит более компактное элюирование в неизменном для обоих органических модификаторов подвижной фазы порядке:

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

В поисках возможности управления разделением антоцианов за счет замены модификаторов подвижных фаз и в рамках «зеленой» хроматографии были определены параметры уравнения (6) для подвижных фаз, подкисленных муравьиной кислотой, с менее экологически неблагоприятными этилацетатом и ацетоном. Также исследовали варианты подвижных фаз с заменой муравьиной кислоты на ортофосфорную, что позволило включить в перечень ОМ органические спирты. Полученные при этом результаты показали, что порядок

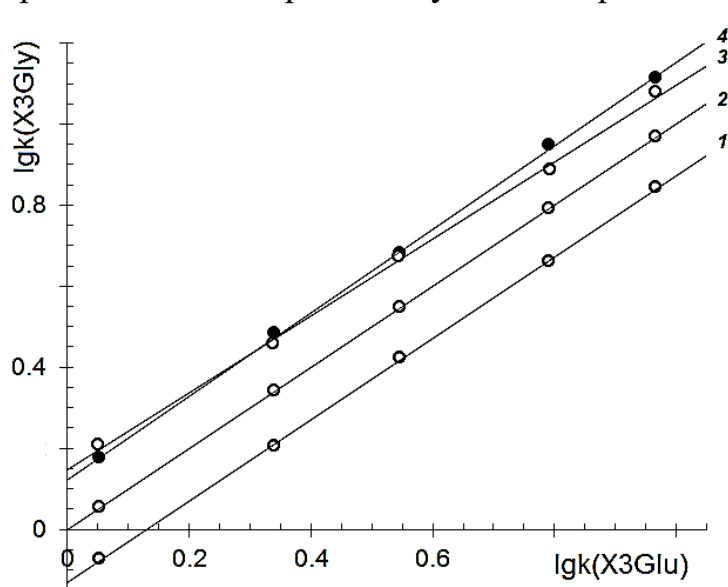


Рис. 4. Удерживание 3-галактозидов (1), 3-арабинозидов (3), 3-рутинозидов (4) относительно 3-глюкозидов (2)

элюирования 3-глюкозидов пяти часто встречающихся в растительных объектах агликонов (Dp, Cy, Pt, Pn и Mv) не изменяется во всех исследованных случаях, но существует возможность замены ацетонитрила на другой более дешевый и менее экологически опасный растворитель, включая этанол. Отметим, что неизменность порядка элюирования указанных пяти 3-глюкозидов, рис. 4, может быть перенесена и на другие одноступенчатые гликозиды, что подтверждается

на примере 3-галактозидов, 3-рутинозидов и 3-арабинозидов.

Еще одной важной задачей является разделение различных гликозидов одного и того же агликона. В мировой литературе сложилось мнение о том, что добавление гликозидного фрагмента к уже существующему приводит к уменьшению удерживания. Однако применение двух типов карт разделения позволяет показать, что это утверждение не совсем корректно. Так карты первого типа по экстраполяционным параметрам на подвижные фазы с нулевым содержанием ОМ показывают, что цианидин-3-самбубиозид (ксилозилгликозид) прочнее взаимодействует со стационарной фазой по сравнению с цианидин-3-глюкозидом, а обратное наблюдается для цианидин-3-софорозида (глюкозилгликозида); для двух же 3-тригликозидов (3-глюкизилрутинозида и 3-ксилозилрутинозида) рост удерживания существенный. При этом по картам разделения второго типа определяется, что наклон линий трендов тригликозидов во всех исследованных случаях больше наклона для дигликозидов, и наименьший – для моногликозидов. Это приводит к инверсиям удерживания гликозидов при изменении состава ПФ, но анализ карт разделения второго типа позволяет определить составы для полного разделения всех компонентов.

Карты разделения первого типа позволяют сопоставлять элюирующую способность ацетонитрила и других органических растворителей, рис. 5.

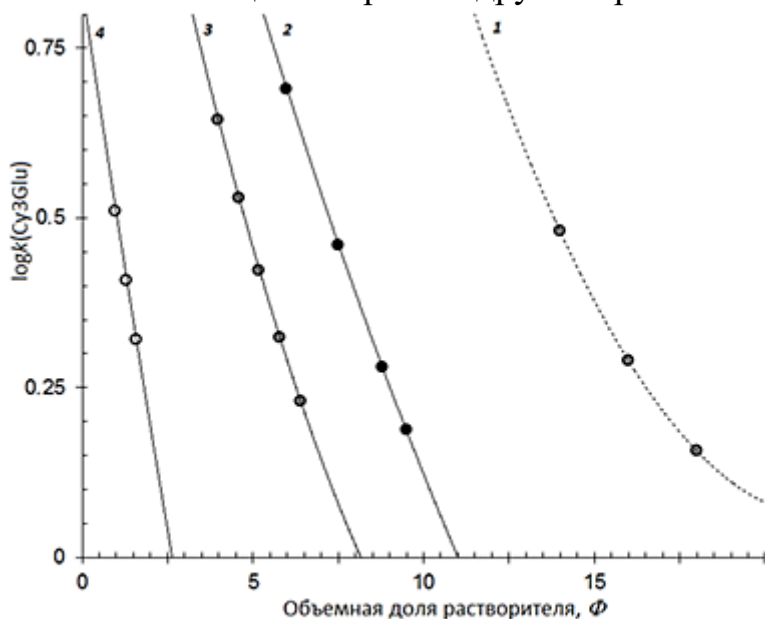


Рис. 5. Зависимость удерживания Cy3Glu от объемной доли ОМ с подвижными фазами, подкисленными HCOOH.
ОМ: этанол (1), ацетонитрил (2), ацетон (3), этилацетат (4)

Замена ацетонитрила на этилацетат приводит не только к дальнейшему сокращению диапазона удерживания, но и к существенному уменьшению расхода ОМ, что также удобно как с экологической точки зрения, так и с экономической. Также принципиально возможна замена ацетонитрила и на ацетон, но наши исследования показали, что ацетон (который предлагается в качестве чуть ли не лучшего органического компонента экстракционных смесей) разрушает антоцианы в кислых средах, что может

стать причиной загрязнения колонки, и на что в известных публикациях нет упоминаний.

Следовательно, возможность замены ацетонитрила на более дешевые и/или экологически более благоприятные ОМ по результатам наших исследований при анализе антоцианов доказана.

Предложено использовать методику спектрофотометрического определения суммы антоцианов в пересчете на цианидин-3-глюкозида хлорид в исследуемых объектах.

Методика характеризуется повторяемостью (сходимостью) с расхождением результатов не более 0.5 %. Однако линейность отклика сигнала от концентрации должна проверяться, поскольку при высоком содержании сопутствующих примесей возможно проявление эффектов межмолекулярной копигментации. Кроме того, перед измерением экстракты должны быть выдержаны не менее 8 ч для перевода *транс*-халконных форм во флавилиевые и должны быть удалены все органические растворители для исключения сольватохромных эффектов.

Для количественного представления состава антоцианов в поликомпонентных смесях предложено использовать нормировку по площадям пиков, полученных в условиях обращенно-фазовой хроматографии с учетом поправочных коэффициентов для производных различных антоцианидинов. При этом повторяемость (сходимость) обычно не ниже 1-2 % вне зависимости от асимметрии пиков при условии $R_s > 1$. Для оценки правильности хроматографического метода предложено 1) использование анализа карт разделения, исключающих потери веществ из-за соэлюирования, и 2) двух-колоночный вариант контроля, исключающий погрешности, связанные с возможными потерями веществ в галерейных порах или вследствие разрушения на колонке.

Еще одним объектом данного исследования стали моно- и дикофеоилхинные кислоты, содержащиеся в таких растительных объектах как кофе, чай мате и др.

Известно, что свойства кофе связаны с наличием хлорогеновых кислот, (ХК - важнейшие антиоксиданты) и кофеина (единственного легального психоактивного стимулянта). При спектрофотометрическом детектировании, кофеин не мешает определению ХК, поскольку при аналитической длине волны 325 нм для определения ХК его абсорбцией можно пренебречь. Однако для определения кофеина, аналитическая длина волны которого порядка 270 нм, поглощением ХК пренебречь нельзя. Поэтому необходимо создать условия, при которых кофеин отделялся бы от монокофеоилхинных кислот (МКХК) (и не только от производных кофейной кислоты), рис. 6-7.

Анализ карт разделения был использован при определении зависимости удерживания МКХК (и кофеина) от типа ОМ (использованы ацетонитрил, изопрпанол, этилацетат и ацетон) и от типа подкислителя (муравьиная и ортофосфорная кислоты).

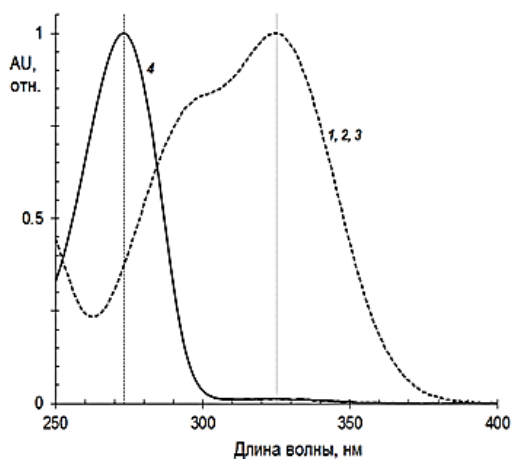


Рис. 6. Электронные спектры поглощения ХК и кофеина

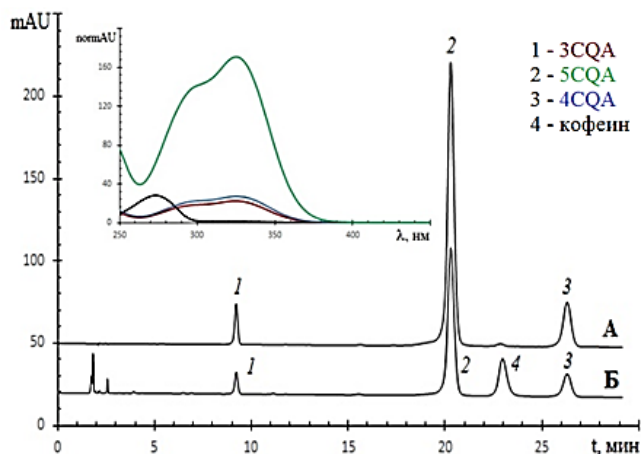


Рис. 7. Хроматограмма разделения смеси ХК и кофеина. А – при длине волны 325 нм; Б – 270 нм

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

Подвижная фаза: 1 об.% HCOOH и 6 об. % CH₃CN в воде

В итоге было установлено, что наиболее эффективным способом изменения разделения кофеина и изомерных ХК является замена ацетонитрила на изопропанол или этилацетат, рис 8. Такая замена существенно уменьшает относительное удерживание кофеина вследствие лучшей сольватации кофеина органическим модификатором. Это позволяет целенаправленно изменять положение элюирования кофеина относительно хлорогеновых кислот, и может быть использовано для исключения его соэлюирования с другими экстрактивными веществами за счет изменения состава подвижной фазы.

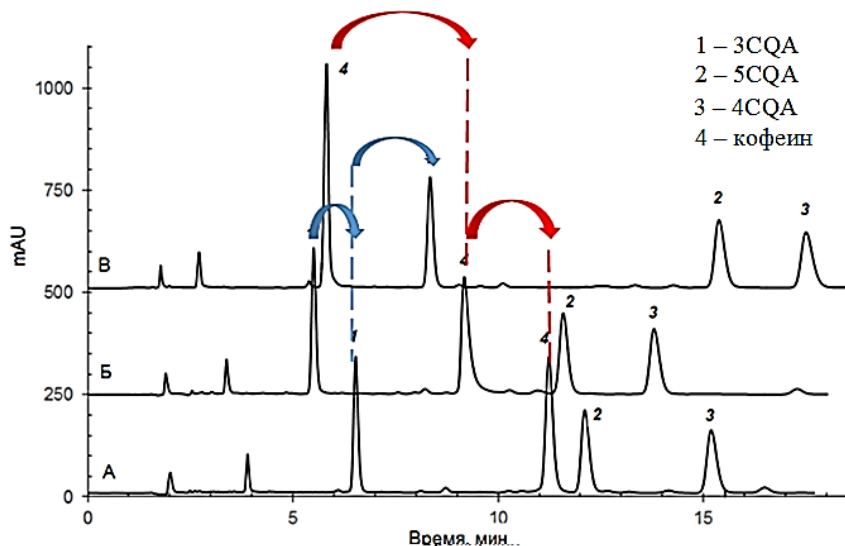


Рис. 8. Разделение кофеина и хлорогеновых кислот в подвижных фазах, подкисленных 0.25 об. % фосфорной кислотой, с использованием в качестве ОМ: А – ацетонитрила, Б – пропанол-2, В – этилацетата.

При этих исследованиях впервые было установлено, что элюенты на основе этилацетата удобны и при пробоподготовке, поскольку позволяют при твердофазной очистке рекстрагировать с концентрирующих патронов (ДИАПАК С18) только кофеин и монокофеоилхинные кислоты; более липофильные экстрактивные вещества при этом не элюируются, что обеспечивает:

а) возможность применения простого изократического режима хроматографирования при одновременном определении кофеина и трех изомерных хлорогеновых кислот, сокращая время анализа и расход органического модификатора подвижной фазы,

б) уменьшение степени загрязнения хроматографической колонки, продлевая срок ее службы.

Благодаря наличию двух *орто*-гидроксильных групп в каждом из радикалов дикофеоилхинные кислоты обладают высокой антиоксидантной активностью. Нами была создана референтная система для разделения изомерных дикофеоилхинных кислот (ДКХК), удерживание которых во многом зависит от положения ацилирования хинной кислоты в условиях ОФ ВЭЖХ в системе ПФ на основе ацетонитрила, рис. 9.

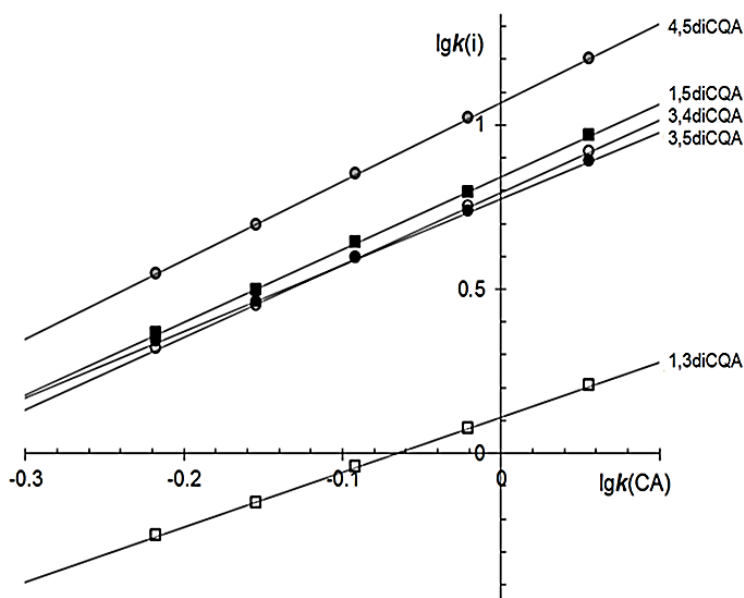


Рис. 9. Карта разделения дикофеоилхинных кислот в системе «ацетонитрил-муравьиная кислота-вода»

Из всех исследованных ДКХК особый интерес вызвала 1,3diCQA, которая выделяется из ряда изомеров уникально слабым удерживанием за счет одной из возможной конформации, которая указывает на существование стекинга между двумя радикалами кофейной кислоты, рис 10, который подтверждается заметным изменением электронного спектра поглощения по сравнению со всеми остальными изомерами, рис 11.

Трудностей не вызывает и отделение 4,5diCQA от 3,4diCQA – 3,5diCQA – 1,5diCQA, однако проблемой остается разделение последних трех изомеров.

Добиться их разделения можно заменой ацетонитрила на этанол и пропанол-2. Все изомеры великолепно разделяются, а удерживание 4,5 diCQA оказывается чуть ближе, что сокращает время анализа, рис. 12.

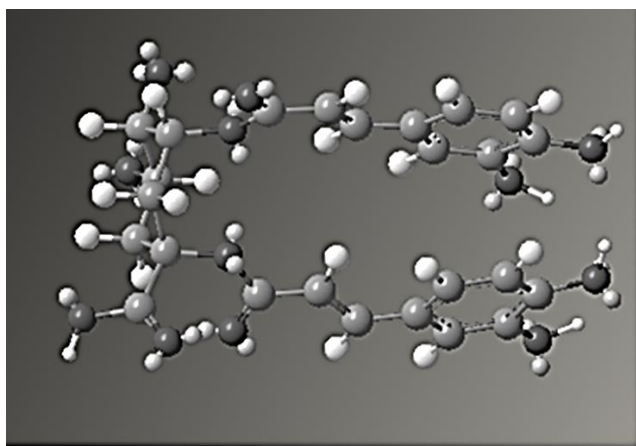


Рис. 10. Стэкинг заместителей хинной кислоты в молекуле 1,3-diCQA

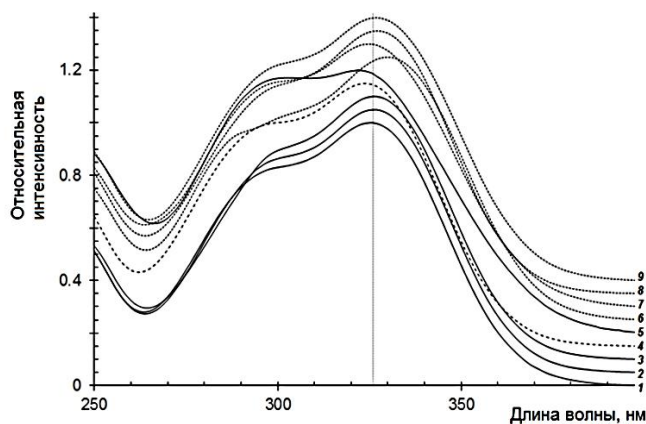


Рис. 11. УФ-спектры веществ, записанные в кювете детектора

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.

Еще одним способом управления разделением является замена стационарной фазы.

На примере моно-кофеилхинных кислот нами было показано, что при переходе к некоторым стационарным фазам (от Symmetry C18 и Kromasil 100-5C18 к Reprosil-Pur C18AQ) происходит изменение разделения 4CQA и 5CQA.

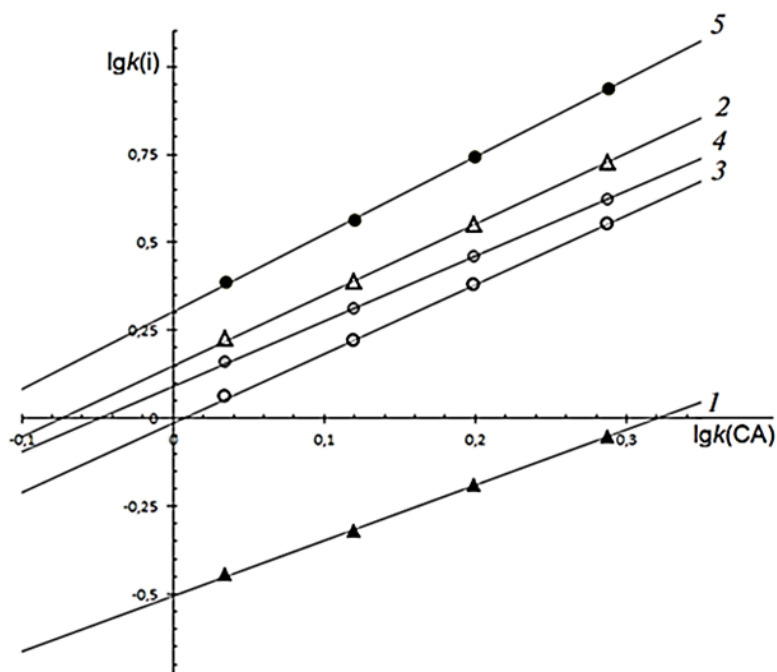


Рис. 12. Карта разделения ДКХ кислот в элюентной системе этанол-0.25 об. % фосфорной кислоты-вода для Kromasil 110-5-C18 при 30°C.

Выполненные нами исследования показали, что данный эффект связан с ростом активности остаточных силанольных групп (анализ был выполнен по пара-толуидин – пара-крезольному тесту) – порядок элюирования обращается с ростом указанной активности. Поэтому, проведя предварительный тест на активность остаточных силанольных групп, можно выбрать колонку,

пригодную для полного разделения всех компонентов анализируемой смеси.

Также была исследована возможность управления разделением за счет изменения температуры разделения. Если существует проблемная пара веществ, имеющие близкие времена удерживания, то анализ энтальпии переноса этих веществ с подвижной фазы на стационарную позволяет определить возможность и направление изменения разделения за счет изменения температуры.

Данный способ был использован нами для решения такой сложной задачи, как разделение пятнадцати антоцианов плодов черники (и голубики), которая не решалась в известных нам работах с использованием ацетонитрила. Нами такая проблема была решена за счет снижения температуры разделения с 40 до 25°C, рис. 13.

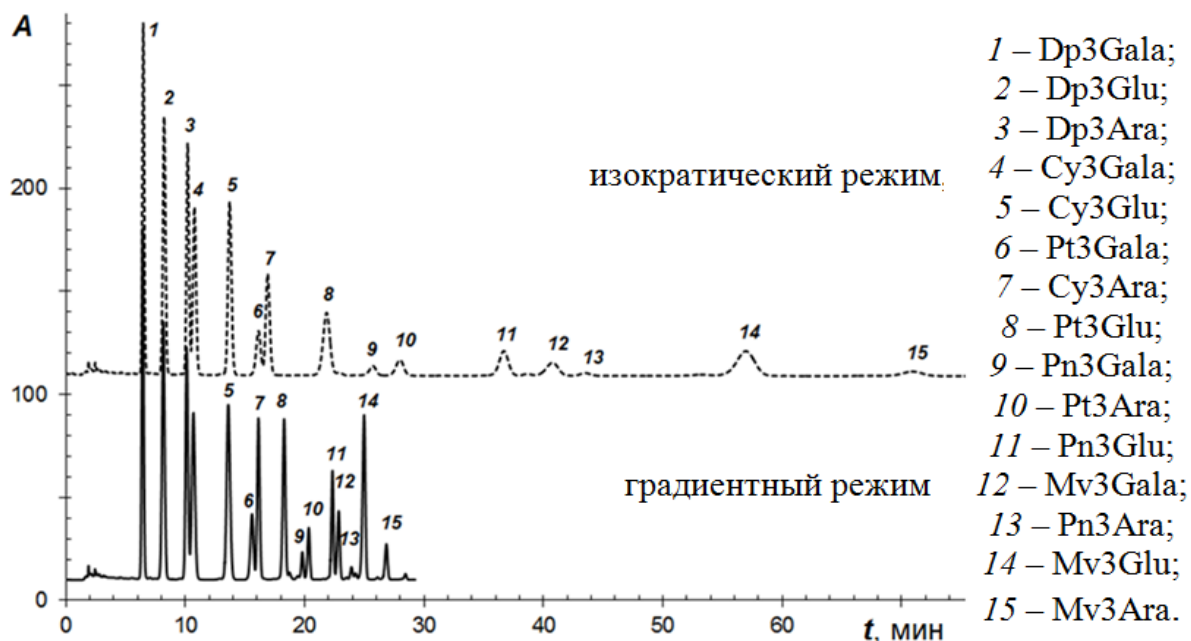


Рис. 13. Разделение антоцианов плодов черники

Влияние изменения рН на удерживание в ОФ ВЭЖХ

Еще одним хорошо известным фактором, влияющим на разделение, является рН ПФ. Изменение рН сказывается на разделении ионизируемых соединений. По литературным данным вместо 10% (рН порядка 1.6) часто используют меньшую концентрацию. Это связано с тем, что реальные хроматографические колонки неустойчивы в диапазонах $pH < 2$, но наши исследования показали, что уменьшение концентрации муравьиной кислоты, практически не сказываясь на разделении однотипных гликозидов различных агликонов, сказывается на равновесии гидратации, которое различно для разных агликонов. Поэтому возникают проблемы с количественным определением при спектрофотометрическом детектировании. Кроме того, снижение рН приводит к заметному уширению пиков, различном для производных различных агликонов.

Три изомерные монокофеоилхинные кислоты (3CQA, 5CQA и 4CQA) имеют близкие значения pK_a , поскольку указанное положение радикалов кофейной кислоты никак не сказывается на диссоциации карбоксильной группы хинной кислоты в положении 1.

Нами было установлено, что найденные закономерности могут быть перенесены на удерживание ДКХК – наиболее сильное падение удерживания изомеров ДКХК при росте рН следует предполагать для изомеров, в которых один из радикалов кофейной кислоты окажется в положении 5, а затем – в положении 4.

При этом с ростом рН сильнее всего удерживание падает в случае 5CQA, приближаясь к удерживанию 3CQA, в то время как для 4CQA удерживание остается более высоким.

Это полностью соответствовало найденным изменениям в удерживании 4,5diCQA, 3,5diCQA и 3,4diCQA. Более того, ацилирование ОН-группы в положении 1 хинной кислоты приводит к росту константы диссоциации и

большому различию во влиянии pH на удерживание ДКХК, содержащих один заместитель в положении 1, т.е. в случае 1,5diCQA, рис. 14.

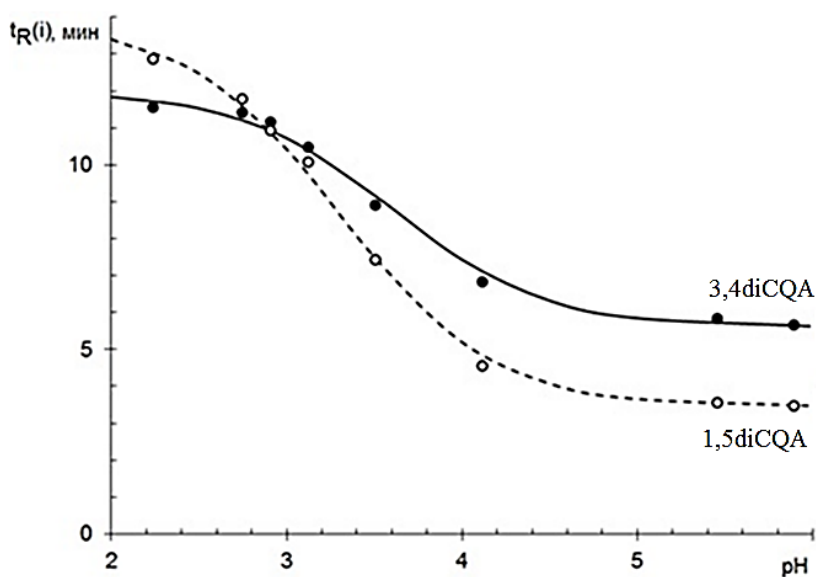


Рис. 14. Зависимость удерживания двух дикофеоилхиновых кислот от pH подвижной фазы.

Это позволяет идентифицировать ДКХК только по специфике изменения удерживания с ростом pH (без масс-спектров, которые были использованы в настоящей работе для подтверждения правильности произведенных отнесений при отсутствии стандартных образцов).

Важным направлением, позволяющим регулировать разделение веществ, является

добавление в ПФ циклодекстринов при условии, что циклодекстрины способны образовывать комплексы включения с компонентами разделяемой смеси с различными константами комплексообразования «гость-хозяин». Выполненная нами работа показала, что использование традиционных стационарных фаз C18 лучше исключить, потому что возможно прочное модифицирование поверхности таких фаз циклодекстринами с изменением разделительных свойств. При этом нами установлено, что замена C18 на C4 позволяет смело работать и в этих условиях. Кроме того, оказалось, что в использованных в работе условиях образовывались только комплексы включения состава 1 : 1. Более того, закономерности образования комплексов включения β -циклодекстрина с МКХК

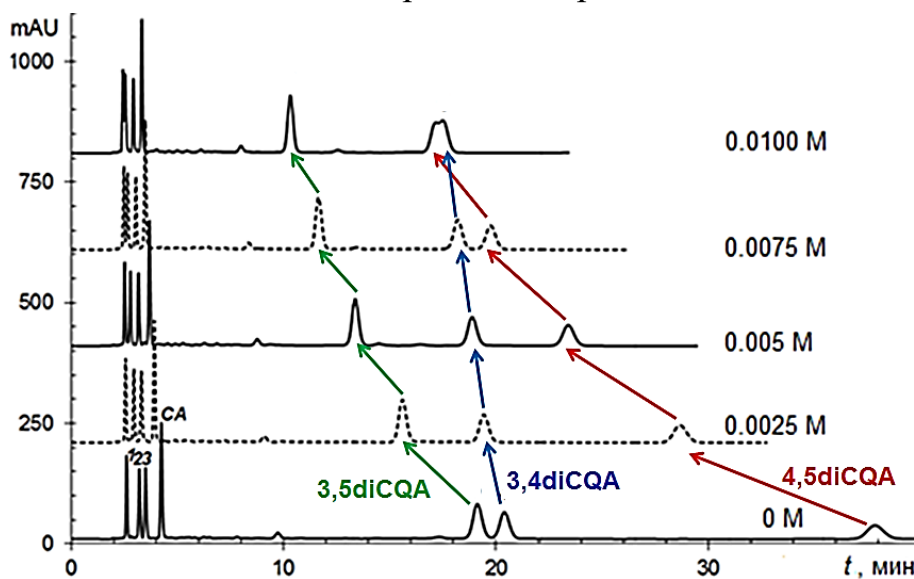


Рис. 15. Изменения селективности разделения дикофеоилхиновых кислот в подвижных фазах с добавками β -CD

могут быть перенесены на комплексообразование с ДКХК, что является еще одним вариантом отнесения ДКХК кислот без использования стандартных веществ.

В подвижных фазах состава 1 об. % муравьиной кислоты и 8 об. % ацетонитрила в воде, константы комплексообразования

равны 154, 86 и 49 моль⁻¹ для 5CQA, 4CQA и 3CQA, соответственно. При сохранении аддитивности самой большой должна быть константа комплексообразования β-циклодекстрина с 4,5diCQA, меньше – с 3,5diCQA, и самой маленькой – для 3,4diCQA, что полностью подтверждается изменением удерживания этих веществ по мере роста концентрации β-циклодекстрина в подвижной фазе, рис. 15.

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 разделение при различии энтальпий переноса для проблемных пар аналитов. Показано, что при изменении pH подвижной фазы и при комплексообразовании «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 основных публикаций по теме диссертации

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus

1. 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, **Е.Ю. Олейниц** // Журнал физической химии. – 2018. – Т. 92, № 11. – С. 1797–1801.

2. Дейнека В.И. Очистка хлорогеновых кислот методом твердофазной экстракции / В.И. Дейнека, А.Ю. Михеев, **Е.Ю. Олейниц**, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2018. – Т. 18, № 4. – С. 488-494.

3. 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.

4. 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, № 11. – С. 1021-1029.

5. Дейнека В.И. Хроматографическое поведение монокофеоилхинных и дикофеоилхинных кислот в условиях ОФ ВЭЖХ: зависимость от строения / В.И. Дейнека, **Е.Ю. Олейниц**, Л.А. Дейнека // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2021. – Т. 21, № 4. – С. 458-465.

6. Дейнека В.И. Управление селективностью разделения 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.

7. 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.П. Блинова, Л.А. Дейнека // Журнал физической химии. – 2021. – Т. 95, № 8. – С. 1278-1283.

8. Дейнека В.И. Управление селективностью разделения дикофеоилхинных кислот в ОФ ВЭЖХ / В.И. Дейнека, **Е.Ю. Олейниц**, А.Н. Чулков, Л.А. Дейнека // Журнал аналитической химии. – 2022. – Т. 77, № 6. – С. 569-575

9. Дейнека В.И. Сопоставление двух вариантов карт разделения в обращенно-фазовой жидкостной хроматографии / В.И. Дейнека, **Е.Ю. Олейниц**, И.П. Блинова, Л.А. Дейнека // Журнал физической химии. – 2022. – Т. 96, № 8. – С. 1195-1200

10. **E.Yu. Oleinits**. Selectivity control of dicaffeoylquinic acids separation in reversed-phase hplc with β -cyclodextrine in a mobile phase / **E.Yu. Oleinits**, V.I. Deineka, I.P. Blinova, L.A. Deineka // ChemChemTech. – 2022. – V. 65, № 7. – С. 54-60.

11. Дейнека В.И. Одновременное определение монокофеоилхинных кислот и кофеина методом обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии с элюентами на основе пропанола-2 и этилацетата /

В.И. Дейнека, **Е.Ю. Олейниц**, Л.А. Дейнека // Заводская лаборатория. Диагностика материалов. – 2022. – Т.12, № 1 (40). – С.121-129.

Тезисы и материалы конференций

12. **Олейниц Е.Ю.** Содержание хлорогеновых кислот зеленого кофе различных производителей / Е.Ю. Олейниц, А.Ю. Базарова, Л.А. Дейнека // Кадры для АПК: сборник материалов международной научно-практической конференции по вопросам подготовки кадров для научного обеспечения развития АПК, включая ветеринарию, г. Белгород, 12-13 ноября 2020 / отв. ред. Спичак И.В. – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2020. – С. 239.

13. **Олейниц Е.Ю.** Обращенно-фазовая ВЭЖХ: замена ацетонитрила на экологически более приемлемые растворители при совместном определении кофеина и хлорогеновых кислот / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Хроматография в химии, медицине и биологии: актуальные вопросы, достижения и инновации: материалы I Международной научно-практической конференции, посвященной памяти профессора П.В. Кузнецова (Кемерово, 26 ноября 2021 г.) / отв. ред. Е. М. Мальцева, А.С. Сухих. – Кемерово: КемГМУ, 2021. – С.131-134.

14. **Олейниц Е.Ю.** «Зеленая» хроматография дикофеоилхинных кислот: замена ацетонитрила на этанол / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Ресурсосберегающие и экологобезопасные процессы в химии и химической технологии [Электронный ресурс]: тезисы докладов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием (г. Пермь, 6–8 декабря 2021 г.) / отв. за вып. А. М. Елохов; Пермский государственный национальный исследовательский университет. – Электронные данные. – Пермь, 2021. – 5,5 Мб; С.54. – Режим доступа:

<http://www.psu.ru/files/docs/science/books/sborniki/resursosberegayushchie-i-ekologobezopasnye-processy-v-himii.pdf>. – Заглавие с экрана.

15. **Олейниц Е.Ю.** Зеленая хроматография для определения антоцианов / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека Физико-химические процессы в конденсированных средах и на межфазных границах (ФАГРАН-2021): материалы IX Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 100-летию со дня рождения Я.А. Угая (г. Воронеж, 4–7 октября 2021 г.) / [отв. ред. О.А. Козадеров и др.]; Воронежский государственный университет; Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН; Институт нефтехимического синтеза им. А.В. Топчиева РАН ; Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН ; Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН. – Воронеж: Издательский дом ВГУ, 2021. – С.505-508.

16. **Олейниц Е.Ю.** Замена ацетонитрила на экологически благоприятные растворители в ОФ ВЭЖХ: совместное определение хлорогеновых кислот и кофеина / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы VI Всероссийского

симпозиума с международным участием (г. Краснодар, 26 сентября – 2 октября 2021) – С.187.

17. **Олейниц Е.Ю.** Дифференциация моно- и дикофеоилхинных кислот по изменению удерживания в ОФ ВЭЖХ при изменении рН подвижной фазы / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Проблемы и достижения химии кислород- и азотсодержащих биологически активных соединений: сборник тезисов V Всероссийской молодежной конференции (г. Уфа, 18 – 19 ноября 2021 г.) / отв. ред. Р.Ф. Талипов. – Уфа: РИЦ БашГУ, 2021. – С.114-115

18. **Олейниц Е.Ю.** Фенольные кислоты кофе и чая мате / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Innovations in life science. Сборник материалов IV международного симпозиума, г. Белгород, 25-27 мая 2022 / отв. ред. Спичак И.В. – Белгород: ИД «БелГУ» НИУ «БелГУ», 2022. – С. 282-283.

19. **Олейниц Е.Ю.** Управление селективностью разделения хлорогеновых кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ / Е.Ю. Олейниц, В.И. Дейнека // Тезисы, представленные на IV Съезде аналитиков России (г. Москва, 26 – 30 сентября 2022 г.) – Москва: ОНТИ ГЕОХИ РАН, 2022 – С.155.