



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 543.544:543.63:615.322

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10568

Разделение каротиноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ: механизм удерживания и метиленовая селективность на «мономерной» стационарной фазе

Виктор Иванович Дейнека^{1✉},

Таисия Григорьевна Буржинская¹, Людмила Александровна Дейнека¹

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

Аннотация. Выделенные методом нормально-фазовой ТСХ фракции каротиноидов плодов болгарских перцев (*Capsicum annuum*) использованы для исследования некоторых свойств хроматографического удерживания каротиноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ на традиционной «мономерной» стационарной фазе. Различие в удерживании α - и β -каротинов на стационарных фазах одной марки (*Kromasil*) с различной длиной привитых радикалов (C18, C8 и C4) в одном и том же составе подвижной фазы свидетельствует о распределительном механизме сорбции каротиноидов на «мономерной» C18-фазе. Сопоставлены элюирующие способности ацетона, этилацетата и пропанола-2 как добавок к ацетонитрилу по отношению к каротиноидам. Установлено, что наибольшей элюирующей силой обладает этилацетат, особенности аналогичного свойства пропанола-2 объяснены известными по литературным данным самоассоциацией этого соединения и его ассоциацией с ацетонитрилом. Для определения метиленовой селективности использовали фракцию диэфиров зеаксантина. При этом дано обоснование ошибочного использования всех членов гомологического ряда для определения метиленовой селективности на основе представлений В.М. Татевского об атомах одинакового вида. Рассмотрен вариант расчета количественных характеристик удерживания членов гомологического ряда с использованием «мертвого» времени, определенного по удерживанию урацила и по удерживанию гомологов. Показано, что полученные величины инкрементов (вкладов в удерживание пары метиленовых групп) заметно различаются. Приведено обсуждение полученных результатов. Сопоставлено поведение гомологических рядов на основе зеаксантина и на основе более гидрофильного капсантина. Показано преимущество определения «мертвого» времени, рассчитанного по удерживанию гомологических рядов. При этом обнаруживается предсказанная ранее зависимость инкрементов (или метиленовой селективности) от строения основы ряда – при идеальном совпадении инкрементов для всех переходов между диэфирами (от дилаурата до дипальмитата) инкременты для слабее удерживаемых диэфиров капсантина на 0.002 логарифмических единиц меньше, чем для диэфиров зеаксантина.

Ключевые слова: удерживание, ТСХ, ОФ ВЭЖХ, распределительный механизм сорбции, каротиноиды, диэфиры ксантофиллов, метиленовая селективность.

Для цитирования: Дейнека В.И., Буржинская Т.Г., Дейнека Л.А. Разделение каротиноидов в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ: механизм удерживания и метиленовая селективность на «мономерной» стационарной фазе // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22, № 4. С. 393-405. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10568>

Original article

Separation of carotenoids during reversed-phase HPLC: retention mechanism and methylene selectivity on a monomeric stationary phase

Viktor I. Deineka^{1✉},

Taisia G. Burzhinskaya¹, Lyudmila A. Deineka¹

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



Abstract. Fractions of carotenoids of orange bell pepper (*Capsicum annuum*) obtained by means of normal phase thin layer chromatography were used to study certain features of chromatographic retention of carotenoids during reversed-phase HPLC on a traditional monomeric stationary phase. The difference in the retention of α - and β -carotenoids on stationary phases of the same make (Kromasil) with different lengths of implanted radicals (C18, C8, and C4) in the same composition of the mobile phase demonstrates the presence of sorption distribution of carotenoids on the monomeric C18 phase. We compared the eluting ability of acetone, ethyl acetate, and 2-propanol used as additives to acetonitrile towards carotenoids. The study determined that ethyl acetate has the greatest eluting ability. A similar ability demonstrated by 2-propanol is explained by the literature data regarding the self-association of the compound and its association with acetonitrile. To determine the methylene selectivity a fraction of zeaxanthin diesters was used. In the article we also explain why it is not advisable to use all the substances of the homologous series to determine the methylene selectivity based on the concept of atoms of the same type suggested by V.M. Tatevsky. The article describes a method of calculating the quantitative characteristics of retention of the elements of the homologous series using the “dead” time determined based on the retention of uracil and homologues. The obtained increments (contributions to the retention of a pair of methylene groups) varied significantly. The article presents the discussion of the obtained results. It compares the behaviour of homologous series based on zeaxanthin and capsanthin, the latter being more hydrophilic. The article demonstrates the advantages of determining the “dead” time based on the retention of homologous series. We also observed a predicted earlier dependence of the increments (or methylene selectivity) on the structure of the homologous series: while for all the transitions between diesters (from dilaurate to dipalmitate) the increments are the same, the increments of capsanthin diesters retained less strongly are by 0.002 logarithmic units lower than those of zeaxanthin diesters.

Keywords: retention, TLC, RP-HPLC, sorption distribution mechanism, carotenoids, xanthophyll diesters, methylene selectivity.

For citation: Deineka V.I., Burzhinskaya T.G., Deineka L.A. Separation of carotenoids during reversed-phase HPLC: retention mechanism and methylene selectivity on a monomeric stationary phase. *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*. 2022. 22(4): 393-405. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10568>

Введение

Каротиноиды являются важнейшими жирорастворимыми биологически активными веществами, синтезируемыми в основном в растениях, суммарный уровень биосинтеза которых на Земле оценивается в 100 млн. тонн за год [1]. Каротиноиды относятся к тетратерпенам (содержат 40 атомов углерода). Молекулы обычных каротиноидов могут быть условно разделены на две части по двадцать атомов углерода, внутри которых изопреноидные фрагменты связаны по типу «голова – хвост», а эти два C_{20} -фрагмента соединены связью «хвост–хвост» [2]. Большое разнообразие строения природных каротиноидов, – к настоящему времени известно 1204 типов структур (<http://carotenoiddb.jp/>), – во-первых, обеспечивается различием структур двух концевых групп при одинаковой (за небольшим исключением) средней части, рис. 1. При этом каротиноиды, не содержащие атомы кислорода, называются ка-

ротиноами, а с кислородом – ксантофиллами. Во-вторых, разнообразие связано с появлением (обычно) в концевых структурах атомов кислорода в виде кето- и гидроксо-групп, при этом эпокси-соединения формально можно также отнести к ксантофиллам [3], хотя чаще говорят о эпокси-каротинах и эпокси-ксантофиллах [4], а карбокси- группы присутствуют в апокаротиноидах.

Каротиноиды являются соединениями с высокой липофильностью [5], для экстракции или растворения которых используются органические растворители, такие как пентан, гексан, петролейный эфир, дихлорметан, хлороформ, тетрагидрофуран, ацетон, этилацетат, метанол, этанол, бутанол [6] и др. Для разделения каротиноидов, содержащих кислородсодержащие функциональные группы можно использовать нормально-фазовую хроматографию (ТСХ на силикагелевых пластинах), но обращенно-фазовая ВЭЖХ (ОФ ВЭЖХ) чувствительна не

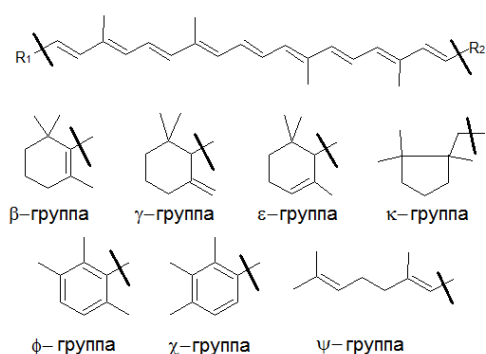


Рис. 1. Элементы строения каротиноидов
 Fig. 1. Elements of the structure of carotenoids

только к гидрофильности, но и к липофильности сорбатов, поэтому используется чаще [7]. Для разделения чаще всего в прежние годы использовали C18 привитые стационарные фазы, а в последние годы предпочтение отдается «полимерным» C30 стационарным фазам [7-22], с различными ингредиентами подвижных фаз, табл. 1.

Тест на метиленовую селективность входит во все известные системы характеристики обращенных фаз [23]. Исследованию зависимости удерживания сорбатов гомологических рядов от длины алкильного радикала (нормального строения) посвящено большое количество опубликованных ранее исследований [24]. Основная идея относительно удерживания таких соединений – последовательное увеличение логарифма фактора удерживания членов гомологического ряда на постоянную величину (инкремент):

$$\lg k(n+1) = \lg k(n) + \Delta(CH_2) \quad (1)$$

Но в обстоятельном исследовании [25] на основе оптимизации установлено, что первые два-три члена гомологических рядов должны быть исключены из списка, как выпадающие из общей зависимости.

Цель настоящей работы – определение механизма сорбции и установление закономерностей удерживания, связанных с метиленовой селективностью при разделении гомологов в условиях ОФ ВЭЖХ на «мономерной» C18 стационарной фазе.

Экспериментальная часть

Каротиноиды, необходимые для исследования, выделяли из природных материалов: корнеплодов моркови (α- и β-каротины), из плодов томатов (ликопин), из плодов перцев болгарских (*Capsicum annuum*), и из цветков бархатцев (*Tagetes patula* и *T. erecta*) и коробочек физалиса декоративного (*Physalis alkekengi*). Плоды измельчали блендером, замораживали в морозильной камере (-40°C), затем удаляли влагу на лиофильной сушилке Labconco FreeZone 2.5. Цветки бархатцев высушивали вне доступа прямого солнечного света. Каротиноиды экстрагировали из полученного материала *n*-гексаном. Узкие фракции необходимого каротиноидного состава препаративно получали разделением на ТСХ-платах Сорбфил при заданном составе подвижной фазы на основе *n*-гексана и ацетона. Зоны каротиноидов соскабливали в бюксы, в которых их реэкстрагировали ацетоном и после отстаивания фильтровали через мембранный насадочный фильтр после разбавления ацетонитрилом для последующего ВЭЖХ определения.

Разделение каротиноидов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ осуществляли на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором на колонках: 1) 100×4.6 мм Kromasil 100-5-C18; 2) 100×4.6 мм Kromasil 100-5-C8; 3) 100×4.6 мм Kromasil 100-5-C4; 4) 250×4.6 мм Kromasil 100-5-C18. Разделение проводили

Таблица 1. Условия для ОФ ВЭЖХ разделения каротиноидов
 Table 1. Conditions for the separation of carotenoids by means of RP-HPLC

| № | Подвижная фаза | Стационарная фаза | Ссылка |
|----|--|--|--------|
| 1 | Ацетонитрил, метанол, вода, градиентный режим | Acquity UPLC® BEH 130Å C18, Waters | [4] |
| 2 | Метанол – метил-трет-бутиловый эфир – вода, градиентный режим | C30 (YMC Co., Kyoto, Japan) | [8] |
| 3 | Ацетонитрил, метанол, этилацетат, градиентный режим | 15 стационарных фаз | [9] |
| 4 | Метил-трет-бутиловый эфир – метанол - вода, градиентный режим | C30 (YMC™, Waters) | [10] |
| 5 | Метил-трет-бутиловый эфир – метанол – 10 г/дм ³ ацетата аммония в воде, градиентный режим | C30 (YMC, Dinslaken, Germany) | [11] |
| 6 | Метанол – метил-трет-бутиловый эфир – 3.9 ммоль/дм ³ ацетата аммония, градиентный режим | C30 (YMC Co., Kyoto, Japan) | [12] |
| 7 | Метанол – метил-трет-бутиловый эфир, градиентный режим | Intersil C30 S-Select (Shanghai, China) | [13] |
| 8 | Ацетонитрил, метанол, тетрагидрофуран, диизопропиловый эфир, хлороформ, дихлорметан, этилацетат, изократический режим | Zorbax ODS (Du Pont, Wilmington, DE), Ultrasphere ODS (Altex, Berkeley, CA). | [14] |
| 9 | Ацетонитрил, ацетон, метанол, 2-пропанол, этилацетат, тетрагидрофуран, дихлорметан, водный раствор ацетата аммония (1 масса/объем %), 0.1% бутилгидрокситолуол, 0.05% триэтиламина, градиентный и изократический режимы | Spherisorb ODS-1 | [15] |
| 10 | Ацетон, вода, градиентный режим | Zorbax SB-C18 (Agilent, USA) | [16] |
| 11 | Ацетонитрил, метанол, дихлорметан, 0.1% ВНТ, 0.05% триэтиламин, изократический режим; метанол, тетрагидрофуран, 0.1% триэтиламин, изократический режим; ацетонитрил, ВНТ, триэтиламин, ацетат аммония, метанол, дихлорметан, | Waters Spherisorb ODS2 (Alltech), Vydac (polymerically modified C18), | [17] |
| 12 | Ацетонитрил, хлороформ, изократический режим | C18 Bondapak | [18] |
| 13 | Ацетонитрил, пропанол-2, 10 мМ водный раствор ацетата аммония, градиентное элюирование | Synchroneis C18 | [19] |
| 14 | Ацетонитрил, дихлорметан, изократический режим | YMC J'Sphere ODS H80. | [20] |
| 15 | Ацетонитрил, метанол, тетрагидрофуран, изократический режим | A Novapak C18 (Waters, Milford, USA) | [21] |
| 16 | Ацетонитрил, метанол, вода, этилацетат, градиентное элюирование | Waters Novapak C18 radial compression column | [22] |

при температуре 30°C. Хроматограммы регистрировали при длине волны детектора 450 нм, хранили и обрабатывали в программе Agilent ChemStation.

Идентификацию каротиноидов осуществляли по электронным спектрам поглощения [26] в комбинации с хроматографической подвижностью, а также с

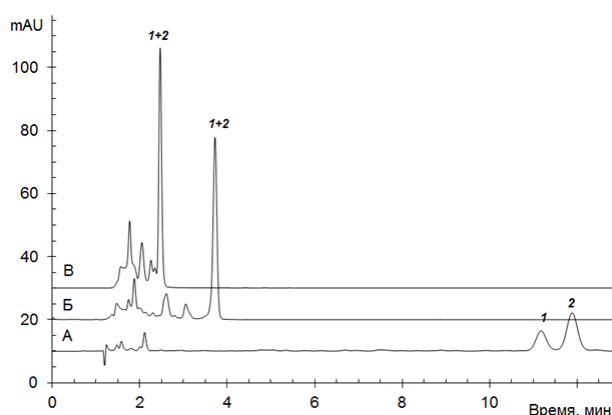


Рис. 2. Разделение экстракта моркови на трех стационарных фазах марки Kromasil: А – 100-5С18; Б – 100-5С8 и В – 100-5С4. Подвижная фаза: 60 об. % ацетона и 40 об.% ацетонитрила, 0,8 см³/мин. Длина волны детектора 450 нм. Каротиноиды; 1 – α-каротин, 2 – β-каротин.

Fig. 2. Separation of the orange carrot extract on three stationary Kromasil phases: А – 100-5С18; В – 100-5С8; С – 100-5С4. Mobile phase: 60 vol.% of acetone and 40 vol.% of acetonitrile, 0.8 ml/min. The detector wavelength is 450 nm. Carotenoids; 1 – α-carotene. 2 – β-carotene.

учетом ранее найденного состава каротиноидов цветков бархатцев [27] и коробочек декоративного физалиса [28]. Отметим, что высушенные цветки бархатцев и коробочки физалиса прекрасно сохраняются вне доступа прямого солнечного света, по крайней мер, от урожая до урожая.

Обсуждение результатов

При определении механизма удерживания необходимо дифференцировать два варианта – адсорбцию (на поверхности стационарной фазы) или абсорбцию (проникновение в привитую фазу). Эта проблема легко решается [29] сопоставлением удерживания сорбатов при одних и тех же подвижных фазах на стационарных фазах, синтезированных на одинаковых силикагелях (по площади поверхности и параметрам пор), но с различной длиной привитых алкильных радикалов, например, С4, С8 и С18 стационарные фазы марки Kromasil. На рис. 2 представлены хроматограммы экстракта моркови на этих стационарных фазах в одной и той же подвижной фазе (60 об.% ацетона и 40 об.% ацетонитрила). Из представленных данных следует, что при сокращении

длины привитого радикала немногим более чем в 2 раза (переход от С18 к С8 фазе) фактор удерживания β-каротина уменьшается в пять раз в элюенте, содержащем 60 об.% ацетона и 40 об.% ацетонитрила, а при переходе к фазе С4 – в тринадцать раз, что может быть объяснено только при распределительном механизме удерживания. В то же время, для хлорогеновой кислоты, как вещества, не способного проникать в привитую фазу из-за наличия сильно гидрофильной части (радикала хинной кислоты) [30], рост фактора удерживания при переходе от фазы С18 к фазе С4 находился в пределах 1.3±0.1 раза для подвижных фаз, содержащих от 12.5 до 20 об.% метанола в воде.

Для выбора компонентов подвижной фазы учтем, что кроме ацетона из легкодоступных компонентов с высокой элюирующей способностью нами были использованы пропанол-2 и этилацетат, рис. 3.

Оказалось, что элюирующая способность этилацетата примерно в 1.5 раза больше, чем ацетона. При этом элюирующая способность пропанола-2 при концентрациях ниже 40 об.% почти такая же,

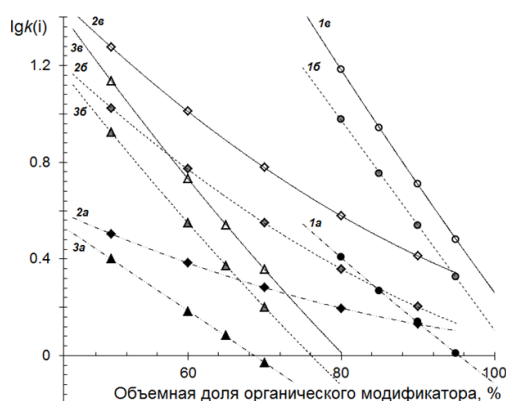


Рис. 3. Зависимость удерживания каротиноидов от содержания модификатора в смеси с ацетонитрилом. Модификаторы: 1 – ацетон, 2 – пропанол-2, 3 – этилацетат. Каротиноиды: а – β -каротин, б – дипальмитат капсантина, в – дипальмитат зеаксантина. Стационарная фаза Kromasil 100-5C18.

Fig. 3. Dependence of the retention of carotenoids on the concentration of the modifier in the acetonitrile mixture. Modifiers: 1 – acetone, 2 – 2-propanol, 3 – ethyl acetate. Carotenoids: a – β -carotene, b – capsanthin dipalmitate, c – zeaxanthin dipalmitate. Kromasil 100-5C18 stationary phase.

как этилацетата, а с ростом концентрации существенно снижается, практически сравниваясь с элюирующей способностью ацетона. Вероятно, это связано с процессами ассоциации спирта с ацетонитрилом и самоассоциации спирта при росте содержания пропанола-2 [31].

Эфиры ксантофиллов являются удобными и легко доступными сорбатами для исследования удерживания членов гомологических рядов, поскольку обычно эфиры образованы насыщенными жирными кислотами. При этом в природных источниках синтезируются эфиры кислот с четным числом атомов углерода – от лауриновой до стеариновой [32]. Следовательно, природные диэфиры ксантофиллов образуют гомологические ряды, с интервалом не в одну, а в две метиленовые группы. Усложнение хроматограмм за счет присутствия (и образования при хранении растворов) *цис*-изомеров не мешает определению удерживания только полностью *транс*-изомеров благодаря легкой дифференциации *цис*-изомеров по электронным спектрам поглощения.

Необходимость исключения первых членов гомологических рядов для выполнения соотношения (1), показанная оптимизацией удерживания в работе [33], не

является неожиданной. Так, по исследованиям В.М. Татевского [34] переносимость свойств атомов наблюдается с высокой точностью только в том случае, если эти атомы являются атомами одинакового вида. По предложению Владимира Михайловича атомы химических элементов могут быть разделены на различные роды по ковалентности (т.е. по числу образованных ковалентных связей). Затем следует деление атомов по распределению ковалентности на соседние атомы – на типы атомов (например, один тип атомов С образует четыре одинарные связи, другой тип – две одинарные и одну двойную связь и т.д.). Два сопоставляемых атома являются атомами одного и того же вида, если они являются атомами одного и того же типа, связанными соседними атомами, которые также являются атомами попарно одинакового типа. Так, при переходе от бензола к толуолу добавляется атом четырех-ковалентного углерода, связанного с тремя атомами водорода и с одним атомом углерода в sp^2 -гибридном состоянии. При переходе от толуола к этилбензолу появляется четырех-ковалентный атом углерода метиленовой группы, связанный с двумя атомами водорода, с одним атомом

углерода в sp^2 -гибридном состоянии и одним атомом углерода в sp^3 -гибридном состоянии. Появление атомов углерода одинакового вида происходит только начиная с перехода от этилбензола к *n*-пропилбензолу (это средний атом углерода). Поэтому из гомологического ряда бензол и толуол в таких случаях исключаются.

Для количественной характеристики удерживания сорбатов в хроматографии используют не экспериментально определяемые времена удерживания, $t_R(i)$, а расчетные значения фактора удерживания, $k(i)$, (или его логарифма), которые могут быть определены только при использовании «мертвого» времени колонки, t_0 :

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

А проблема определения мертвого времени, несмотря на целый ряд предложенных способов [34], должна быть признанной не решенной к настоящему времени [35]. По одному из подходов с «мертвым» временем колонки отождествляют время удерживания сорбата, признаваемого как не сорбируемого в условиях эксперимента, например, урацила, тиомочевина или др. По другому подходу для расчета мертвого времени используется указанная ранее идея о равенстве селективности разделения трех последовательных членов гомологического ряда:

$$\alpha(CH_2) = \frac{t_R(n+2) - t_0}{t_R(n+1) - t_0} = \frac{t_R(n+1) - t_0}{t_R(n) - t_0}. \quad (3)$$

Этот вариант позволяет рассчитать «мертвое» время, которое можно назвать термодинамически обоснованным при идее одинакового роста энергии Гиббса переноса сорбатов из подвижной фазы на стационарную при переходе между последовательными членами гомологического ряда:

$$t_0 = \frac{t_R(n+2) \cdot t_R(n) - [t_R(n+1)]^2}{t_R(n+2) + t_R(n) - 2 \cdot t_R(n+1)}. \quad (4)$$

Однако при наличии более чем трех членов гомологического ряда можно воспользоваться другой процедурой, позволяющей получать усредненное значение «мертвого» времени. Пусть для диэфиров ксантофиллов справедливо соотношение:

$$\lg k(n+2) - \lg k(n) = \Delta(CH_2 - CH_2). \quad (5)$$

В таком случае:

$$\lg \frac{k(n+2)}{k(n)} = \Delta(CH_2 - CH_2),$$

$$\frac{k(n+2)}{k(n)} = 10^\Delta = \frac{t_R(n+2) - t_0}{t_R(n) - t_0},$$

$$t_R(n+2) = 10^\Delta \cdot t_R(n) - (10^\Delta - 1) \cdot t_0. \quad (6)$$

В итоге получаем соотношение типа уравнения Зенкевича [36]:

$$\lg k(n+2) = a \cdot \lg k(n) + b. \quad (7)$$

Коэффициенты уравнения регрессии легко определяются в MS Excel, а мертвое время рассчитывается по формуле:

$$t_0 = \frac{-b}{a-1}. \quad (8)$$

Все приведенные выше расчеты справедливы при линейности зависимости логарифма фактора удерживания от числа атомов углерода, $N(C)$, в алкильных радикалах:

$$\lg k(i) = a \cdot N(C) + b. \quad (9)$$

Времена удерживания диэфиров зеаксантина, выделенных из экстракта болгарских перцев оранжевой окраски, полученные для пяти наблюдений (последовательных хроматографирований) представлены в табл. 2.

Отметим, что, во-первых, «мертвое» время, определенное по урацилу заметно более воспроизводимо по сравнению со временем, рассчитанным по уравнению (8) несмотря на высокие значения R^2 для всех пяти параллельных наблюдений. Во-вторых, значения t_0 оказались заметно больше по первому варианту, чем по второму. Одним из возможных объяснений различных значений t_0 может быть эксклюзивный эффект - невозможность проникновения больших по размеру молекул диэфиров ксантофиллов в мелкие поры, доступные для урацила.

Таблица 2. Времена удерживания диэфиров зеаксантина на стационарной фазе Kromasil 100-5C18 в подвижной фазе 55 об. % этилацетата и 45 об. % ацетонитрила в пяти последовательных наблюдениях

Table 2. Time of retention of zeaxanthin diesters on the Kromasil 100-5C18 stationary phase in the mobile phase of 55 vol.% of ethyl acetate and 45 vol. % of acetonitrile in five subsequent experiments

| Соединения | | Времена удерживания, мин | | | | |
|------------------------|-------|--------------------------|----------|----------|----------|----------|
| Урацил | | 1.830 | 1.830 | 1.829 | 1.829 | 1.829 |
| Расчетный параметр (8) | t_0 | 1.630 | 1.648 | 1.660 | 1.660 | 1.714 |
| | R^2 | 0.999994 | 0.999998 | 0.999999 | 0.999999 | 0.999997 |
| Диэфиры зеаксантина | 12+12 | 7.941 | 7.939 | 7.937 | 7.936 | 7.936 |
| | 12+14 | 9.377 | 9.383 | 9.374 | 9.373 | 9.375 |
| | 14+14 | 11.146 | 11.148 | 11.138 | 11.138 | 11.135 |
| | 14+16 | 13.328 | 13.325 | 13.313 | 13.313 | 13.304 |
| | 16+16 | 15.992 | 15.999 | 15.979 | 15.98 | 15.978 |

Таблица 3. Логарифмы факторов удерживания и инкременты, приходящиеся на две метиленовые группы для удерживания диэфиров зеаксантина (см. Табл. 2) для «мертвого» времени, рассчитанного по уравнению (8).

Table 3. Logarithms of the retention factors and increments of two methylene groups for the retention of zeaxanthin diesters (see Table 2) for the “dead” time calculated using the equation (8).

| № | Тип диэфира зеаксантина | lgk(i) для пяти параллельных наблюдений | | | | |
|------------------|-------------------------|---|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 12+12 | 0.588 | 0.582 | 0.578 | 0.578 | 0.560 |
| 2 | 12+14 | 0.677 | 0.672 | 0.667 | 0.667 | 0.650 |
| 3 | 14+14 | 0.766 | 0.761 | 0.757 | 0.757 | 0.740 |
| 4 | 14+16 | 0.856 | 0.850 | 0.846 | 0.846 | 0.830 |
| 5 | 16+16 | 0.945 | 0.9403 | 0.936 | 0.936 | 0.920 |
| R^2 | | 0.999999 | 1.000000 | 1.000000 | 1.000000 | 0.999999 |
| Переход | | Инкременты $\Delta(CH_2-CH_2)$ | | | | |
| 1→2 | | 0.089 | 0.090 | 0.090 | 0.090 | 0.090 |
| 2→3 | | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.089 | 0.090 |
| 3→4 | | 0.090 | 0.090 | 0.090 | 0.090 | 0.090 |
| 4→5 | | 0.089 | 0.090 | 0.089 | 0.090 | 0.090 |
| Среднее значение | | 0.089 | 0.090 | 0.090 | 0.090 | 0.090 |

Для логарифмов факторов удерживания диэфиров зеаксантина, рассчитанных по уравнению (8), характерна высокая степень линейности в зависимости от числа атомов углерода в алкильных фрагментах радикалов кислот – R^2 не ниже 0.99999, табл. 3. При этом расхождение в величинах инкрементов не превышало 0.001 как для параметров внутри каждого из экспериментов, так и между параллельными наблюдениями. Это указывает

на высокую надежность определения инкрементов по данному методу: $\Delta(CH_2-CH_2)=0.0895\pm 0.0005$.

Для логарифмов факторов удерживания диэфиров зеаксантина, рассчитанных по урацилу, также характерна высокая степень линейности в зависимости от числа атомов углерода в алкильных фрагментах радикалов число – R^2 не ниже 0.999995, табл. 4. При этом, во-первых, воспроизводимость логарифмов факторов удерживания одноптипных диэфиров

Таблица 4. Логарифмы факторов удерживания и инкременты, приходящиеся на две метиленовые группы для удерживания диэфиров зеаксантина (см. Табл. 2) для «мертвого» времени, рассчитанного по урацилу

Table 4. Logarithms of the retention factors and increments of two methylene groups for the retention of zeaxanthin diesters (see Table 2) for the “dead” time calculated for uracil

| № | Тип диэфира зеаксантина | lgk(i) для пяти параллельных наблюдений | | | | |
|------------------|-------------------------|---|----------|----------|----------|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 1 | 12+12 | 0.524 | 0.524 | 0.523 | 0.523 | 0.523 |
| 2 | 12+14 | 0.615 | 0.616 | 0.615 | 0.615 | 0.615 |
| 3 | 14+14 | 0.707 | 0.707 | 0.706 | 0.706 | 0.706 |
| 4 | 14+16 | 0.798 | 0.798 | 0.798 | 0.797 | 0.797 |
| 5 | 16+16 | 0.889 | 0.889 | 0.888 | 0.888 | 0.888 |
| R^2 | | 0.999994 | 0.999993 | 0.999995 | 0.999995 | 0.999996 |
| Переход | | Инкременты $\Delta(CH_2-CH_2)$ | | | | |
| 1→2 | | 0.092 | 0.092 | 0.092 | 0.092 | 0.092 |
| 2→3 | | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 |
| 3→4 | | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 |
| 4→5 | | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 |
| Среднее значение | | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 | 0.091 |

существенно выше, чем в первом случае. Во-вторых, расхождение в величинах инкрементов также не превышало 0.001; среднее значение инкрементов по данному методу более стабильно: $\Delta(CH_2-CH_2)=0.091$, хотя первый инкремент (для перехода от дилаурата к лаурату-мири-стату зеаксантина) всегда немногим больше: $\Delta(CH_2-CH_2)=0.092$. Отметим, что строгое равенство последовательных инкрементов является только гипотезой. Действительно, если одинаковое изменение энтальпии переноса гомологов с подвижной фазы на стационарную вполне допустимо, то относительно изменения энтропийного фактора так сказать нельзя, как было показано в работе [37]. Поэтому обоснование выбора способа определения мертвого времени требует специальных исследований. Неравенство энтропийных составляющих энергии Гиббса перехода каротиноидов из подвижной фазы в стационарную позволяет предположить также и возможность неодинаковых значений инкрементов для различных гомологических рядов.

Рассмотрим два различных гомологических ряда – диэфиров зеаксантина и диэфиров капсантина, построенные на начальных соединениях (зеаксантине и капсантине) с различающейся гидрофильностью – у первого ряда имеется две полярные сложноэфирные функциональные группы, а у второго к ним добавляется еще одна кето-группа, рис. 4.

Для обоих рядов при использовании для расчетов «мертвого времени», рассчитанного по удерживанию урацила, выполняются две закономерности: 1) линейность удерживания относительно числа атомов углерода в радикалах кислот и 2) схождение линий трендов в точках конвергенции [25]. И хотя интерпретация физического смысла точки конвергенции для зависимостей такого типа затруднена, найденное различие в координатах двух точек конвергенции может указывать на некоторые различия в механизме сорбции этих гомологов.

При этом возможно существование различных «мертвых» времен для удерживания этих гомологов. При соответствующем пересчете по временам удерживания по уравнению (8) в координатах

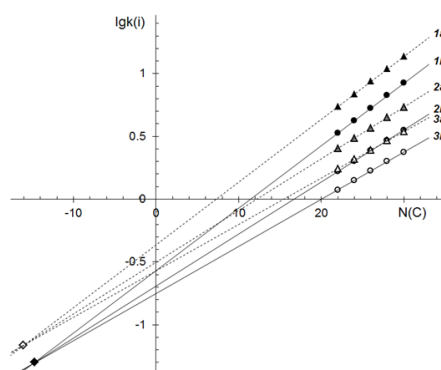


Рис. 4. Зависимость логарифма фактора удерживания двух рядов диэфиров зеаксантина (а) и капсантина (b). Составы подвижных фаз системы «этилацетат–ацетонитрил»: 1 – 50 : 50; 2 – 60 : 40; 3 – 65 : 35 об. %.

Fig. 4. Dependence of the logarithm of the retention factors of two series of diesters of zeaxanthin (a) and capsanthin (b). Compositions of the mobile phases of the “ethyl acetate - acetonitrile” system. 1 – 50 : 50; 2 – 60 : 40; 3 – 65 : 35 vol. %.

относительного удерживания получаем иной график, рис. 5.

В этом случае абсцисса точки конвергенции соответствует гипотетическому составу подвижной фазы, при котором липофильность подвижной и стационарной фаз сравниваются. Абсциссы точек конвергенции должны смещаться вправо при увеличении гидрофильности [40], что соответствует изменению структуры основ гомологических рядов. Очевидно также, что такое смещение должно сопровождаться уменьшением инкрементов для соответствующих рядов. И действительно для подвижной фазы этилацетат – ацетонитрил 60 : 40 об. % для ряда капсантина инкремент на две метиленовые группы составил 0.077 для всех последовательных переходов между гомологами, а для ряда зеаксантина (с таким же точным совпадением) – оказался немногим больше – 0.079. При этом аналогичные различия найдены и для инкрементов при других составах подвижных

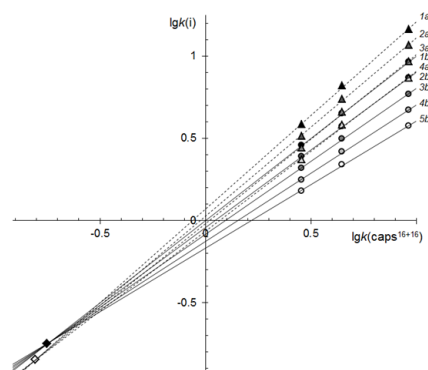


Рис. 5. Удерживание диэфиров зеаксантина (а) и капсантина (b) относительно дипальмитата капсантина (caps¹⁶⁺¹⁶) в элюентной системе «этилацетат–ацетонитрил». Диэфиры: 1 – дипальмитаты; 2 – миристанты-пальмитаты; 3 – димиристанты; 4 – лаураты-миристанты; 5 – дилаурат.
 Fig. 5. Retention of diesters of zeaxanthin (a) and capsanthin (b) with regard to capsanthin dipalmitate (caps¹⁶⁺¹⁶) in the eluent system “ethyl acetate - acetonitrile”. Diesters: 1 – dipalmitates; 2 – myristate palmitates; 3 – dimyristates; 4 – laurate myristates; 5 – dilaurate.

фаз. Таким образом, приведенное сопоставление свидетельствует в пользу определения «мертвого» времени по удерживанию гомологических рядов.

Заключение

Таким образом, для каротиноидов, удерживаемых по распределительному механизму на «мономерных» стационарных фазах, для расчетов параметров удерживания предпочтительно использовать мертвое время, рассчитанное по удерживанию диэфиров ксантофиллов, образованных высшими жирными насыщенными кислотами. В таком случае высказанное ранее влияние энтропийной составляющей переноса вещества с подвижной фазы на стационарную подтверждается результатами определения инкремента (вклада двух метиленовых групп) на удерживание гомологов.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет из-



вестных финансовых конфликтов интересов или личных отношений, которые

Список литературы/References

1. Fraser P.D., Bramley P.M. The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*. 2004; 43(3): 228-265. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2003.10.002>
2. Gómez-García M.R., Ochoa-Alejo N. Biochemistry and Molecular Biology of Carotenoid Biosynthesis in Chili Peppers (*Capsicum spp.*) *International Journal of Molecular Sciences*. 2013; 14(9): 19025-19053. <https://doi.org/10.3390/ijms140919025>
3. Kotake-Nara E., Nagao A. Absorption and Metabolism of Xanthophylls. *Marine Drugs*. 2011; 9(6): 1024-1037. <https://doi.org/10.3390/md9061024>
4. Valadon L.R.G., Mummery R.S. Carotenoids of certain compositae flowers. *Phytochemistry*. 1967; 6(7): 983-988. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86050-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86050-1)
5. Brichu R.D., Kot-Wasik A., Namieśnik J. et al. A comparative study of the molecular lipophilicity indices of vitamins A and E and of some precursors of vitamin A, estimated by HPLC and by different computation methods. *Acta Chromatographica*. 2009; 21: 237-250. <https://doi.org/10.1556/achrom.21.2009.2.4>
6. Rivera S., Canela R. Influence of Sample Processing on the Analysis of Carotenoids in Maize. *Molecules*. 2012; 17(9): 11255-11268. <https://doi.org/10.3390/molecules170911255>
7. Khachik F., Beecher G.R., Goli M.B. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*. 1991; 63(1): 71-80. <http://dx.doi.org/10.1351/pac199163010071>
8. Gupta P., Sreelakshmi Y., Sharma R. A rapid and sensitive method for determination of carotenoids in plant tissues by high performance liquid chromatography. *Plant*

могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье.

- Methods*. 2015; 11: 5. <https://doi.org/10.1186/s13007-015-0051-0>
9. Ligor M., Kováčová J., Gadzała Kopicuch R.M. et al. Study of RP HPLC Retention Behaviours in Analysis of Carotenoids. *Chromatographia*. 2014; 77(15): 1047-1057. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2657-1>
10. Vallverdú-Queralt A., Martínez-Huélamo M., Arranz-Martinez S. et al. Differences in the carotenoid content of ketchups and gazpachos through HPLC/ESI(Li+))-MS/MS correlated with their antioxidant capacity. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012; 92: 2043-2049. <https://doi.org/10.1002/jsfa.5598>
11. Ziegler J.U., Wahl S., Würschum T. et al. Lutein and Lutein Esters in Whole Grain Flours Made from 75 Genotypes of 5 Triticum Species Grown at Multiple Sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2015; 63(20): 5061-5071. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01477>
12. Nakagawa K., Kiko T., Hatade K. et al. Development of a high-performance liquid chromatography-based assay for carotenoids in human red blood cells: application to clinical studies. *Analytical Biochemistry*. 2008; 381(1): 129-134. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.06.038>
13. Wang Y., Zhang C., Dong B. et al. Carotenoid Accumulation and Its Contribution to Flower Coloration of *Osmanthus fragrans*. *Frontiers in Plant Science*. 2018; 9: 1499.
14. Nells H.J.C.F., De Lenheer A.P. Isocratic nonaqueous reversed-phase liquid chromatography of carotenoids. *Analytical Chemistry*. 1983; 55(2): 270-275. <https://doi.org/10.1021/ac00253a021>
15. Varzakas T., Kiokias S. HPLC Analysis and Determination of Carotenoid Pigments in Commercially Available Plant Extracts. *Curr Res Nutr Food Sci*. 2016; 4: 01-14. <http://dx.doi.org/10.12944/CRN-FSJ.4.Special-Issue1.01>
16. Podunavac-Kuzmanović S.O., Jevrić L.R., Tepić A.N. et al. Reversed-phase



- HPLC retention data in correlation studies with lipophilicity molecular descriptors of carotenoids. *Hemijaska industrija*. 2013; 67(6): 933-940. <https://doi.org/10.2298/HEMIND121015010P>
17. Dias M.G., Oliveira L., Camões F.G.F.C. et al. Critical assessment of three high performance liquid chromatography analytical methods for food carotenoid quantification. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217(21): 3494-3502. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.03.024>
18. Katrangi N., Kaplan L.A., Stein E.A. Separation and quantitation of serum beta-carotene and other carotenoids by high performance liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 1984; 25(4): 400-406.
19. Li S., Tang X., Lu Y. et al. An improved method for the separation of carotenoids and carotenoid isomers by liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2021; 44: 539-548.
20. Baharin B.S., Abdul Rahman K., Abdul Karim M.I. et al. Separation of palm carotene from crude palm oil by adsorption chromatography with a synthetic polymer adsorbent. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998; 75: 399-404. <https://doi.org/10.1007/s11746-998-0058-z>
21. Takaichi S. Characterization of carotenes in a combination of a C18 HPLC column with isocratic elution and absorption spectra with a photodiode-array detector. *Photosynthesis Research*. 2000; 65: 93-99.
22. de las Rivas J., Abadia A., Abadia J. A New Reversed Phase-HPLC Method Resolving All Major Higher Plant Photosynthetic Pigment. *Plant Physiology*. 1989; 91(1): 190-192. <https://doi.org/10.1104/pp.91.1.190>
23. Claessens H.A., van Straten M.A., Cramers C.A. et al. Comparative study of test methods for reversed-phase columns for high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1998; 826: 135-156.
24. Vyňuchalová K. Selectivity Tests of Stationary Phases for Reversed-Phase HPLC. *Analytical Letters*. 2011; 44(9): 1640-1662. <https://doi.org/10.1080/00032719.2010.520393>
25. Colin H., Krstulović A.M., Gonnord M.-F. et al. Investigation of selectivity in reversed-phase liquid chromatography-effects of stationary and mobile phases on retention of homologous series. *Chromatographia*. 1983; 17: 9-15. <https://doi.org/10.1007/BF02265101>
26. Rodriguez-Amaya D.B. A Guide to Carotenoid Analysis in Foods. ILSI Human Nutrition Institute. One Thomas Circle, NW, Washington DC. 20005-5802. 2001. 64 p.
27. Dejneka V.I., Sorokopudov V.N., Dejneka L.A. et al. Issledovanie cvetkov tagetes sp. kak istochnika lyuteina. *Khimiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2007; 41(10): 30-32.
28. Dejneka V.I., Sorokopudov V.N., Dejneka L.A. et al. Issledovanie plodov physalis *alkekengi l.* kak istochnika ksantofillov. *Khimiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2008; 42(2): 36-37.
29. Dejneka V.I. Distribution or adsorption: the major dilemma in reversed-phase HPLC. *Russ. J. Phys. Chem*. 2008; 82: 902-905. <https://doi.org/10.1134/S003602440806004630>
30. Dejneka, V.I., Oleinits, E.Y., Blinova, I.P. et al. Selectivity of the Separation of Isomeric Chlorogenic Acids under the Conditions of Reversed-Phase HPLC. *J Anal Chem*. 2019; 74: 778-783. <https://doi.org/10.1134/S1061934819080057>
31. Nagata I., Katoh K. Ternary Liquid-Liquid Equilibria for Acetonitrile-Ethanol-Cyclohexane and Acetonitrile-2-Propanol-Cyclohexane. *Thermochimica Acta*. 1980; 39: 45-62.
32. Bunea A., Socaciu C., Pintea A. Xanthophyll Esters in Fruits and Vegetables. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2014; 42(2): 310-324. <https://doi.org/10.15835/nbha4229700>
33. Tatevskij V.M. Stroenie molekul. M., Himiya, 1977. 512 p. (In Russ.)
34. Nowotnik D.P., Narra R.K. A Comparison of Methods for the Determination of



Dead Time in a Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography System Used for the Measurement of Lipophilicity. *Journal of Liquid Chromatography*. 1993; 16(18): 3919-3932.

<https://doi.org/10.1080/10826079308019677>

35. Rimmer C.A., Simmons C.R., Dorsey J.G. The measurement and meaning of void volumes in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2002; 965(1-2): 219-232.

[https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00730-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00730-6)

36. Zenkevich I.G. Using Recurrent Dependences to Control, Adjust, and Recover Values of the Physicochemical Properties of Organic Compounds. *Russ. J. Phys. Chem.* 2021; 95: 894-901.

<https://doi.org/10.1134/S0036024421040294>

37. Dejneka V.I., Dejneka L.A., Turtygin A.V. Method of the relative retention analysis: reversed-phase hplc of triglycerides.

Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy. 2008; 8(3): 465-477.

38. Dejneka V.I., Lapshova M.S., Zaharenko E.V. et al. Features of separation on polymeric reversed phase for two classes of higher saturated fatty acids esters. *Russ. J. Phys. Chem.* 2013; 87: 1912-1915.

<https://doi.org/10.1134/S0036024413110071>

39. Young J.C., Abdel-Aal E.-S.M., Rabalski I. et al. Identification of Synthetic Regioisomeric Lutein Esters and Their Quantification in a Commercial Lutein Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007; 55: 4965-4972.

40. Turtygin A.V., Dejneka V.I., Dejneka L.A. et al. Opređenje monoacetyl-diacetyl-glicerolov masel semyan rastenij semejstva celastraceae, *Analitika i kontrol'*. 2012; 16(1): 91-95.

Информация об авторах / Information about the authors

Т.Г. Буржинская – старший преподаватель кафедры общей химии, Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

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

Л.А. Дейнека – доцент кафедры общей химии, к.х.н., Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Белгород

T.G. Burzhinskaya – Senior Lecturer of the Department of General Chemistry, Belgorod State National Research University, Belgorod

V.I. Dejneka – Professor of the Department of General Chemistry Belgorod state national research University, Belgorod, e-mail dejneka@bsu.edu.ru

L.A. Dejneka – Associate Professor of the Department of General Chemistry Belgorod state national research University, Belgorod, e-mail deyneka@bsu.edu.ru

Статья поступила в редакцию 28.06.2022; одобрена после рецензирования 11.07.2022; принята к публикации 01.08.2022.

The article was submitted 28.06.2022; approved after reviewing 11.07.2022; accepted for publication 01.08.2022.