



ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Научная статья

УДК 544-971.62

doi: 10.17308/sorpchrom.2022.22/10565

Особенности определения энтальпии переноса антоцианов с подвижной фазы на стационарную в условиях обращенно-фазовой хроматографии на C18 стационарной фазе

**Виктор Иванович Дейнека¹✉, Сергей Леонидович Макаревич²,
Ирина Петровна Блинова¹, Людмила Александровна Дейнека¹**

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

²Белгородская межобластная ветеринарная лаборатория, Белгород, Россия

Аннотация. В работе исследована зависимость удерживания 3-глюкозидов шести основных антоцианидинов – дельфинидина, петунидина, мальвидина, цианидина, пеонидина и пеларгонидина от давления на входе в колонку, т.е. от скорости подвижной фазы. Установлено, что на хроматографической колонке 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм, в подвижной фазе 10 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде удерживание возрастало с ростом скорости подачи подвижной фазы в диапазоне 0.2-0.8 см³/мин. При этом рост фактора удерживания был наибольшим при наименьшей температуре разделения. Кроме того, рост фактора удерживания оказался пропорциональным мольному объему. Для всех исследованных температур (30, 40 и 50°C) зависимость между натуральным логарифмом фактора удерживания антоцианов от давления на входе в колонку описывалась квадратичным уравнением. Это позволило выполнить расчет энтальпий переноса антоцианов с подвижной фазы на стационарную традиционным методом – по натуральным логарифмам факторов удерживания при постоянных значениях скорости подачи подвижной фазы (т.е. при различных входных давлениях на колонку) и по натуральным логарифмам расчетных значений факторов удерживания антоцианов, найденным по квадратичным уравнениям – для выбранных постоянных давлениях на входе в колонку, т.е. при различных скоростях подачи подвижной фазы. Оказалось, что в первом варианте найденные значения энтальпий для одних и тех же веществ различались для расчетов, выполненных при различных скоростях подвижных фаз, примерно на 10%. Второй вариант расчета привел к практически не зависящим от входного давления значениям энтальпий для всех шести антоцианов. Следовательно, для корректных расчетов термодинамических характеристик сорбатов следует учитывать зависимость их удерживания от скорости подачи подвижной фазы или от входного давления на колонку.

Ключевые слова: обращенно-фазовая хроматография, антоцианы, удерживание, давление на входе в колонку, энтальпия переноса, расчет.

Для цитирования: Дейнека В.И., Макаревич С.Л., Блинова И.П., Дейнека Л.А. Особенности определения энтальпии переноса антоцианов с подвижной фазы на стационарную в условиях обращенно-фазовой хроматографии на C18 стационарной фазе // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2022. Т. 22, № 4. С. 386-392. <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10565>

Original article

Determining the enthalpy of the transfer of anthocyanidins from the mobile phase to the stationary phase during reversed-phase chromatography on a C18 stationary phase

Victor I. Deineka¹✉, Sergey L. Makarevich², Irina P. Blinova¹, Lyudmila A. Deineka¹

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

²Belgorod Interregional Veterinary Laboratory, Belgorod, Russian Federation



Abstract. The article focuses on the dependence of the retention of 3-glucosides of six common anthocyanidins: delphinidin, petunidin, malvidin, cyanidin, peonidin, and pelargonidin, - on the pressure in the column input, i.e. on the mobile phase flow rate. The study determined that on a 150×4.6 mm Symmetry C18 column, 3.5 μm, in the mobile phase of 10 vol.% of acetonitrile and 10 vol.% of formic acid in water, the retention increased with an increase in the mobile phase flow rate within the range of 0.2-0.8 cm³/min. An increase in the retention factor was maximal at the lowest temperature of separation. The increase in the retention factor was also proportional to the molar volume. For all the studied temperatures (30, 40, and 50°C) the dependence of the natural logarithm of the retention factor of anthocyanins on the inlet pressure was described by a quadratic equation. This allowed us to calculate the enthalpy of transfer of anthocyanins from the mobile phase to the stationary phase using a traditional method, i.e. based on the natural logarithms of the retention factors with constant values of the mobile phase flow rate (i.e. different values of the inlet pressure) and natural logarithms of the calculated values of the retention factors of anthocyanins calculated using quadratic equations for the selected constant values of the inlet pressure (i.e. at different mobile phase flow rates). It appeared that in the first case the calculated enthalpy values for the same substances differed from the results of the calculations performed at different rates of mobile phase flow by about 10%. In the second case, the enthalpy values did not depend on the inlet pressure for all of the six anthocyanins. Therefore, to perform accurate calculation of the thermodynamic characteristics of sorbates, it is necessary to take into account the dependence of their retention on the mobile phase flow rate or the inlet pressure in the column.

Keywords: reversed-phase chromatography, anthocyanins, retention, inlet pressure, enthalpy of transfer, calculation.

For citation: Deineka V.I., Makarevich S.L., Blinova I.P., Deineka L.A. Determining the enthalpy of the transfer of anthocyanidins from the mobile phase to the stationary phase during reversed-phase chromatography on a C18 stationary phase. *Sorbtsionnyye i khromatograficheskiye protsessy*. 2022. 22(4): 386-392. (In Russ.). <https://doi.org/10.17308/sorpchrom.2022.22/10565>

Введение

Для термодинамических расчетов во всей хроматографии и в обращенно-фазовой в частности используется уравнение [1-4].

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

В этом уравнении Φ – так называемое фазовое отношение колонки – соотношение объемов сорбционного слоя и подвижной фазы, ΔH^0 и ΔS^0 стандартные изменения энтальпии и энтропии при переносе вещества с подвижной фазы на стационарную, R – газовая постоянная, а T – абсолютная температура. Идеальный вариант использования уравнения (1) – построение графика Вант Гоффа – зависимости натурального логарифма фактора удерживания ($\ln k$) от обратной абсолютной температуры ($1/T$) по уравнению (1). Однако, не всегда такой график линеен, что можно интерпретировать как смену механизма сорбции или определяющих удерживание типов межмолекулярных взаимодействий [5]. Вторая возможная причина нелинейности графика Вант Гоффа – непостоянство Φ при смене тем-

пературы, при котором ΔH^0 может оставаться константой [4]. В цитированных работах обсуждаются серьезные проблемы, отличающие исследование распределения сорбатов в обращенно-фазовой ВЭЖХ по сравнению с распределением веществ между двумя несмешивающимися жидкими фазами. И это не удивительно, поскольку стационарная обращенная фаза содержит привитые алкильные радикалы у поверхности сорбента разряженные примерно в 2 раза по сравнению с твердой фазой алканов [6], пустоты между радикалами могут быть заполненными компонентами из подвижной фазы – по специфике структуры даже вопреки растворимости соответствующих веществ в n -алканах.

С другой стороны, в последнее время появились публикации, в которых указывается, что фактор удерживания может быть не постоянным при смене скорости подачи подвижной фазы, приводящей к изменению давления на входе в колонку [7-9]. При этом и расчетные значения термодинамических параметров могут зависеть от скорости подвижной фазы [10].

Цель настоящей работы – определение зависимости термодинамических параметров переноса антоцианов с подвижной фазы на стационарную от скорости подачи подвижной фазы, т.е. от давления на входе в колонку.

Экспериментальная часть

Антоцианы были экстрагированы из листьев багрянника канадского [11] и плодов барбариса обыкновенного [12] настаиванием растительного материала в 0.1 М водном растворе соляной кислоты. Перед хроматографированием экстракты очищали методом твердофазной экстракции на патронах ДИАПАК С16 (БиоХим-Мак СТ, Москва) [13].

Хроматографическое поведение антоцианов исследовали на хроматографе Agilent 1260 Infinity с диодно-матричным детектором, термостатом колонок и автодозатором. Хроматографическая колонка 150×4.6 мм Symmetry C18, 3.5 мкм. Подвижная фаза 10 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Объем вводимой пробы 5 мкл. Мертвое время определяли по удерживанию урцила.

Хроматограммы записывали при длине волны детектора 515 нм, хранили и обрабатывали в ПО Agilent ChemStation.

Мольные объемы антоцианидинов рассчитывали в программе ACD ChemSketch 12.0.

Обсуждение результатов

Результаты определения факторов удерживания 3-глюкозидов (3G) шести основных природных антоцианидинов (дельфинидина Dp3G, петунидина Pt3G, мальвидина Mv3G, цианидина Cy3G, пеонидина Pn3G и пеларгонидина Pg3G при трех различных скоростях подачи подвижной фазы, содержащей 10 об.% ацетонитрила и 10 об.% муравьиной кислоты в воде при температуре 30 и 50°C представлены в табл. 1 и табл. 2, соответственно.

По данным табл. 1 факторы удерживания всех веществ возрастают с увеличением давления, причем прирост факторов удерживания тем выше, чем больше число как гидроксильных, так и метокси-групп в кольце В агликона, проникающего в привитую фазу. При этом между изменением фактора удерживания (в процентах) и мольными объемами соответствующих агликонов (именно эта часть погружается внутрь привитой фазы по «поплавочному» механизму [14]) обнаруживается связь близкая к прямолинейной, рис. 1.

По данным табл. 2 с ростом температуры изменение фактора удерживания

Таблица 1. Факторы удерживания, k , веществ и их изменения с ростом давления при 30°C ($\pm 0.5\%$)

Table 1. Retention factors, k , of substances and changes caused by the growth of pressure at 30°C ($\pm 0.5\%$)

№	u, см ³ /мин	0.8	0.4	0.2	Максимальное изменение k^{**} , %
	Давление, P, bar	171	86	43	
1	Dp3G	0.784	0.745	0.717	8.6
2	Cy3G	1.502	1.436	1.386	7.7
3	Pt3G	2.234	2.127	2.047	8.4
4	Pg3G	2.666	2.561	2.477	7.1
5	Pn3G	3.991	3.812	3.675	7.9
6	Mv3G	5.575	5.298	5.087	8.8

*скорость подачи подвижной фазы, **рост k при 0.8 см³/мин по сравнению с данными при 0.2 см³/мин.

Таблица 2. Факторы удерживания, k , веществ и их изменения с ростом давления при 50°C ($\pm 0.5\%$)

Table 2. Retention factors, k , of substances and changes caused by the growth of pressure at 50°C ($\pm 0.5\%$)

№	u^* , см ³ /мин	0.8	0.4	0.2	Максимальное изменение k^{**} , %
	Давление, P, bar	152	76	38	
1	Dp3G	0.377	0.377	0.371	1.6
2	Cy3G	0.772	0.771	0.763	1.2
3	Pt3G	1.138	1.133	1.122	1.4
4	Pg3G	1.395	1.397	1.389	0.5
5	Pn3G	2.103	2.098	2.083	0.9
6	Mv3G	2.878	2.866	2.842	1.2

*скорость подачи подвижной фазы, **рост k при 0.8 см³/мин по сравнению с данными при 0.2 см³/мин

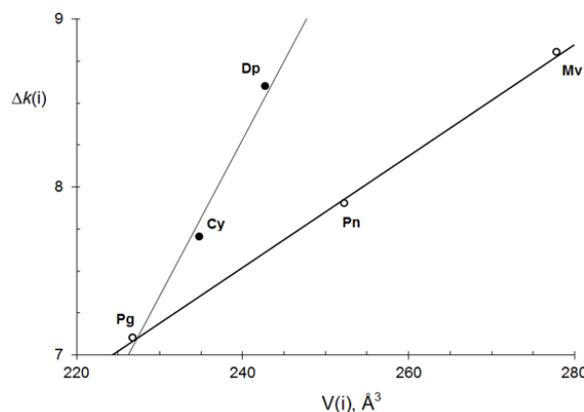


Рис. 1. Зависимость изменения фактора удерживания с ростом давления от мольного объема соответствующего антоцианидина

Fig. 1. Dependence of the change in the retention factor following the increase in pressure on the molar volume of the corresponding anthocyanin

антоцианов при изменении давления на входе в колонку уменьшается.

Определение энтальпии переноса сорбата из подвижной фазы на стационарную осуществляют, измеряя факторы удерживания сорбатов при различных температурах при одном и том же составе подвижной фазы и при одной и той же скорости подачи подвижной фазы. Поскольку фактор удерживания связан с константой распределения через фазовое соотношение колонки, которое в настоящее время не представляется возможным определить, то по экспериментально найденным значениям факторов удерживания можно рассчитать только изменение энтальпии данного переноса по уравнению (1).

Однако вследствие зависимости факторов удерживания от давления при различных скоростях подачи подвижной фазы получают заметно различающиеся значения энтальпий переноса, табл. 3 – энтальпии уменьшаются примерно на 10 % при снижении скорости подачи подвижной фазы.

С другой стороны, выполненные в работе исследования, показали, что между логарифмами факторов удерживания антоцианов и давлением на входе в колонку существует зависимость, хорошо аппроксимируемая квадратичным уравнением (2), рис. 2.

$$\ln k(i) = a_0 + a_1 \cdot P + a_2 \cdot P^2 \quad (2)$$

Используя найденные для всех антоцианов при всех температурах параметры

Таблица 3. Энтальпии переноса антоцианов (кДж/моль) и их изменения относительно величин, определенных при 0.8 см³/мин

Table 3. Enthalpies of transfer of anthocyanins (kJ/mol) and changes in them as compared to the enthalpies at 0.8 cm³/min

№	Антоциан	Энтальпии при скоростях подачи подвижной фазы, см ³ /мин				
		0.8	0.4		0.2	
		ΔH	ΔH	ΔΔH*, %	ΔH	ΔΔH, %
1	Dp3G	-29.8	-27.8	6.73	-26.8	10.0
2	Cy3G	-27.1	-25.3	6.48	-24.3	10.2
3	Pt3G	-27.5	-25.6	6.73	-24.5	10.9
4	Pg3G	-26.4	-24.6	6.5	-23.6	10.7
5	Pn3G	-26.1	-24.3	6.9	-23.1	11.4
6	Mv3G	-26.9	-25.0	7.1	-23.7	12.0

*изменения ΔH относительно величин, определенных при 0.8 см³/мин.

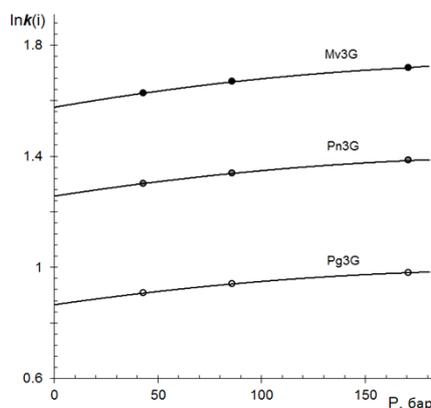


Рис. 2. Зависимость между давлением на входе в колонку и натуральным логарифмом фактора удерживания

Fig. 2. Dependence between the pressure in the inlet of the column and the natural logarithm of the retention factor

Таблица 4. Энтальпии переноса антоцианов, кДж/моль, рассчитанные при постоянных давлениях на входе в колонку

Table 4. Enthalpies of transfer of anthocyanins (kJ/mol) calculated at a constant pressure in the inlet of the column

№	Антоциан	ΔH при давлении, бар			Расхождение, %
		0	50	100	
1	Dp3G	-25.8	-26.1	-26.6	-3.1
2	Cy3G	-23.3	-23.4	-23.6	-1.2
3	Pt3G	-23.3	-23.2	-23.2	0.5
4	Pg3G	-23.4	-23.4	-23.3	0.4
5	Pn3G	-21.8	-21.8	-21.6	1.0
6	Mv3G	-22.3	-22.2	-21.9	1.6

уравнений типа (2), несложно рассчитать логарифмы факторов удерживания не при постоянных скоростях подвижных фаз, а при любом заданном значении входного давления. Только после этого по найденным значениям натуральных

логарифмов факторов удерживания при различных температурах можно воспользоваться уравнением (1). для расчета соответствующих энтальпий. Такой пересчет привел к принципиально иным результатам, табл. 4.



По данным табл. 4 энтальпии, определенные для всех антоцианов при трех значениях (включая экстраполированное на нулевое) давления на входе в колонку, оказались близкими между собой для каждого из антоцианов. Максимальное расхождение только для Др3G (как соединения с самым маленьким удерживанием, т.е. с самой высокой чувствительностью к точности определения мертвого времени колонки) составило более 3%, а в остальных случаях составляло порядка одного процента.

Заключение

Таким образом, перед определением энтальпий сорбционных процессов в обращенно-фазовой ВЭЖХ необходимо

оценить зависимость факторов удерживания от давления на входе в колонку (т.е. от скорости подачи подвижной фазы), определить функциональную зависимость между логарифмом фактора удерживания сорбата при различных температурах. По найденным уравнениям рассчитать логарифмы факторов удерживания при некотором (или некоторых) значении входного давления, используя полученные результаты для расчета энтальпии переноса.

Конфликт интересов

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

Список литературы/References

1. Bocian S., Soukup J., Jandera P. *et al.* Thermodynamics Study of Solvent Adsorption on Octadecyl-Modified Silica. *Chromatographia*. 2015; 78: 21-30. <https://doi.org/10.1007/s10337-014-2788-4>
2. Marchetti N., Giovannini P.P., Catani M. *et al.* Thermodynamic Insights into the Separation of Carotenoids in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Int. J. Anal. Chem.* 2019; 2019, Article ID 7535813. <https://doi.org/10.1155/2019/7535813>
3. Tanase M., Soare A., David V. *et al.* Sources of Nonlinear van't Hoff Temperature Dependence in High-Performance Liquid Chromatography. *ACS Omega*. 2019; 4: 19808-19817. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b02689>
4. Chester T.L., Coym J.W. Effect of phase ratio on van't Hoff analysis in reversed-phase liquid chromatography, and phase-ratio-independent estimation of transfer enthalpy. *J. Chromat. A*. 2003; 1003 (1-2): 101-111. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00846-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00846-X)
5. Cole L.A., Dorsey J.G., Dill K.A. Temperature dependence of retention in reversed-phase liquid chromatography. 1. Stationary-phase considerations. *Anal. Chem.* 1992; 64(13): 1324-1327. <https://doi.org/10.1021/ac00037a004>
6. Deineka V.I., Nguyen Anh Van, Deineka L.A. Model of a Reversed Phase Grafted on Silica Gel. *Russ. J. Phys. Chem. A*. 2019; 93: 2490-2493. <https://doi.org/10.1134/S0036024419120057>
7. Berek D., Macko T. Pressure effects in high performance liquid chromatography. *Pure Appl. Chem.* 1989; 61: 2041-2046. <http://dx.doi.org/10.1351/pac198961112041>
8. Martin M., Guiochon G. Effects of high pressure in liquid chromatography. *J. Chromat. A*. 2005; 1090(1-2): 16-38. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.06.005>
9. Felinger A., Boros B., Ohmacht R. Effect of pressure on retention factors in HPLC using a non-porous stationary phase. *Chromatographia. Suppl.* 2002; 56: S61-S64. <https://doi.org/10.1007/BF02494114>
10. Galaon T., Mihailciuc C., Medvedovici A. *et al.* The influence of mobile-phase flow-rate in RP-LC on thermodynamic parameters studied for polar compounds. *J. Liq. Chromat. RT*. 2011; 34(7): 521-536. <https://doi.org/10.1080/10826076.2011.556974>



11. Doronin A., Tretiakov M., Deineka V. et al. Peculiarities of Use of Bentonite Clay at Solid-Phase Purification of Anthocyanins and Flavonoids from Leaves of Plants. *Adv. Biol. Sci. Res.* 2019; 7: 90-93.

12. Vu Thi Ngok An', Dejneka V.I., Dejneka L.A. et al. Antioksidanty rastitel'nogo proiskhozhdeniya: antociany plodov nekotoryh rastenij semeystva Berberdaceae. *Nauchnye vedomosti BelGU. Ser.*

Medicina. Farmaciya. 2013; 18 (161): 235-239. (in Russ.)

13. Deineka V.I., Solomatin N.M., Dejneka L.A. et al. Yabloki s krasnoj myakot'yu kak istochnik antocianov. *Khimija rastitel'nogo syr'ja.* 2014; 4: 163-168 (in Russ.)

14. Deineka V.I., Dejneka L.A., Saenko I.I. et al. A float mechanism of retention in reversed-phase chromatography. *Russ. J. Phys. Chem. A.* 2015; 89(7): 1300-1304. <https://doi.org/10.1134/S0036024415070079>

Информация об авторах / Information about the authors

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

С.Л. Макаревич – инженер-химик II категории, ФГБУ «Белгородская межобластная ветеринарная лаборатория», Белгород, Россия

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

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

V.I. Deineka – Professor of the Department of General Chemistry Belgorod National Research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail deineka@bsu.edu.ru

S.L. Makarevich – Chemical engineer category II, FSBI "Belgorod Interregional Veterinary Laboratory", Belgorod, Russian Federation, e-mail sergmazay@yandex.ru

I.P. Blinova – Associate Professor of the Department of General Chemistry Belgorod state national research University, Belgorod, Russian Federation, e-mail blinova@bsu.edu.ru

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

Статья поступила в редакцию 08.02.2022; одобрена после рецензирования 06.06.2022; принята к публикации 04.07.2022.

The article was submitted 08.02.2022; approved after reviewing 06.06.2022; accepted for publication 04.07.2022.