



УДК 543.544-414.6:543.544.5

Оценка свойств сорбентов концентрирующих патронов для твердофазной очистки: роль «галерейных» пор

Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Сидоров А.Н., Саенко И.И., Костенко О.М.

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

Поступила в редакцию 13.02.2016 г.

В работе сопоставлены сорбционные свойства ряда сорбентов, используемых для заполнения концентрирующих патронов для твердофазной очистки: некоторых химически модифицированных силикагелей (С18 и С16). Предложены методы стандартизации, включающие тест на проскок и контроль параметров элюиционной кривой с использованием окрашенных природных соединений. Показано, что одним из свойств, существенно влияющим на эффективность сорбентов, является наличие в поровом пространстве сорбентов «галерейных» пор: системы последовательных широких пор с узкими транспортными порами между ними.

Ключевые слова: твердофазная экстракция, концентрирующие патроны, сорбенты, «галерейные» поры, антоцианы, бетацианины.

The evaluation of the properties of the solid-phase extraction cartridge sorbents: the role of the «gallery» pores

Deineka V.I., Deineka L.A., Sidorov A.N., Saenko I.I., Kostenko M.O.

Belgorod National Research University, Belgorod

Syringe cartridges (SC) filled with different batches of reversed-phase chemically modified (C16 and C18) silica gels were found to have differences in the effectiveness of their application in the solid-phase extraction (SPE) of anthocyanins. The paper includes a discussion of the effects responsible for the discrepancy and shows the need for standardization of SPE SC by sorption capacity before breakthrough of the solutes and by the slope of the desorption curve. To explain the elongation of the desorption volum in some cases the existence of "gallery" pores was proposed. The outer pores according to a fractal approach should resemble the shape of voids between particles in dense spherical packing – the entrance to the wide pore can be narrow. The less is pore entrance area the greater will be solute residence time in the pore. If in an outer pore there is a narrow entrance to the next wide pore, having not another exit pathway, and so on, - such structures can be called «gallery» pores. They are responsible for slow desorption process and for the occurrence of specific artefacts in HPLC, being shown experimentally on the example of anthocyanins.

Keywords: solid phase extraction, concentrating cartridges, sorbents, "gallery" pores, anthocyanins, betacyanins.

Введение

Эффективным вариантом предварительной очистки экстрактов природных материалов является прием, получивший название метода твердофазной экстракции

(solid phase extraction, SPE [1]). По данному методу первичный экстракт пропускают через слой сорбента, заполняющего специальные концентрирующие патроны. При этом сорбент и экстрагент подбирают так, чтобы целевые вещества сорбировались, а сорбция сопутствующих примесей была бы сведена к нулю, и существовала возможность простой десорбции целевых веществ на втором этапе. Ключевым моментом метода является сорбент, который должен обеспечивать возможно большую сорбционную емкость, селективную сорбцию целевых соединений и высокую эффективность, которая позволит получить узкие фракции целевых веществ, увеличивая кратность концентрирования.

Антоцианы (Ац) и бетацианины (Бц) в сильно кислых средах представляют собой вещества катионного типа. Но традиционные ионообменные смолы (например, катионит Ку-2-8) оказываются мало эффективными для очистки Ац и Бц вследствие чрезвычайно медленных внутренних массообменных процессов [2]. С другой стороны, антоцианы и бетацианины, как вещества, содержащие большое количество атомов ряда химических элементов, благодаря возможности возникновения большого числа дисперсионных взаимодействий могут сорбироваться и на обращенно-фазовых сорбентах. Поэтому, патроны, заполненные октадецил-силикагелями, оказываются приемлемыми для предварительной очистки и концентрирования Ац и Бц [3, 4]. Но для обращенных фаз известны проблемы воспроизводимости их сорбционных свойств, даже для различных партий сорбентов одной и той же марки. Еще одна особенность сорбентов такого типа - склонность к коллапсу [5], приводящему к снижению сорбционной емкости.

Работа посвящена исследованию поведения концентрирующих патронов в сорбции антоцианов и бетацианинов и оценке влияния ряда свойств сорбентов на эффективность их использования.

Эксперимент

Экстракты получали из сырья, выращенного в Белгороде. Растительный материал заливали 0.1 М водным раствором HCl (Э1) и настаивали в течение суток (в случае антоцианов) или в течение одного часа (в случае бетацианинов). Экстракт отделяли фильтрованием через бумажный фильтр.

Патроны для концентрирования (КП) ДИАПАК – двух различных партий марки С18: С18(1) и С18(2), марок С16 Плюс, С16М (БиоХимМак СТ, Москва) активировали, пропуская $5\div 7$ см³ ацетона, и кондиционировали, пропуская $15\div 20$ см³ Э1. Экстракт в Э1 пропускали через патроны, используя перистальтический насос LS 301 (ЗАО Лабораторное оборудование и приборы, г. Санкт Петербург, РФ) при скорости потока 0.8 см³·мин⁻¹. Для реэкстракции антоцианов и бетацианинов использовали смесь (1:1 по объему) 0.1 М водного раствора HCl и этанола (Э2), которую пропускали через патроны со скоростью потока 0.2 см³·мин⁻¹.

ВЭЖХ записывали на хроматографе Agilent 1200 с диодно-матричным детектором. Колонка: 4.6×250 Symmetry C18, 5 мкм. Подвижная фаза 1 (А): 8 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде; подвижная фаза 2 (Б): 20 об.% ацетонитрила, 10 об.% муравьиной кислоты в воде. Ступенчатый градиент 0÷20 мин 100% А; 20÷25 мин 100% Б. Градиентное элюирование по программе 0 мин - 0 % Б; 20 мин – 100% Б; 25 мин – 100% Б. Скорость подачи подвижной фазы 1 мл/мин. Запись хроматограмм при 515 нм. Концентрацию сорбатов в растворах определяли спектрофотометрическим методом [2, 4].

Обсуждение результатов

Эффективность КП во многом определяется их емкостью по целевым веществам до проскока первых порций этих веществ (тест на проскок). Только при таком использовании КП можно в дальнейшем получить репрезентативные данные по составу исследуемых сложных композиций. Это свойство определяется не только сорбционной емкостью, но и качеством набивки КП, включающим диапазон диаметров частиц сорбента и отклонение их формы от шаровой, что определяет один из вкладов в уширение пиков, получивший название «вихревая диффузия» [6]. Эти параметры не стандартизируются производителями сорбентов с нерегулярным строением, что может стать одной из причин невоспроизводимости свойств концентрирующих патронов, ими заполненных.

КП, заполненные частицами несферической формы, при сорбции экстрактов цветков петунии до появления окрашенных фракций элюата сорбировали $(1.2 \pm 0.3) \cdot 10^{-5}$ моль антоцианов КП С18(1), в то время как для КП С18(2) проскок наблюдался уже после сорбции $1.6 \cdot 10^{-6}$ моль антоцианов. При этом предельная сорбция антоцианов на этих сорбентах была сопоставимой $(3.5 \div 4.5) \cdot 10^{-5}$ моль.

Еще одной из причин невоспроизводимости свойств С18-стационарных фаз считается возможная неодинаковая активность остаточных силанольных групп [7]. Для антоцианов, обладающих не только остаточной гидрофобностью, но и гидроксильными группами, суперпозиция гидрофобных взаимодействий остова сорбатов с С18-радикалами и водородных связей гидроксильных групп с остаточными силанольными представляется благоприятствующей для сорбции. Известно, что при средней поверхностной концентрации силанольных групп около 4.8 штук на 1 nm^2 в реакцию с алкилдиметилхлорсиланом (I) по стерическим причинам может вступить только примерно половина из них [8]. Поэтому для уменьшения роли остаточных силанольных групп разработана технология дополнительного силилирования сорбентов триметилхлорсиланом (II) (неполярный эндкеппинг) [9]. Однако, проекции I и II на плоскость сорбента одинаковы, если алкильная группа направлена от сорбента. Следовательно, скорее всего, дополнительному силилированию подвергаются силанольные группы не между привитыми углеводородными радикалами, а силанольные группы в узких местах пор, доступ к которым более крупным молекулам затруднен. Поэтому морфология пор сорбентов может иметь принципиально важное значение для воспроизводимости свойств сорбентов.

Принципиально важно также и то, что в настоящей работе исследовали сорбцию антоцианов из экстрактов в Э1 без добавок органического модификатора, но для таких растворов в ряде обращенно-фазовых сорбентов наблюдается коллапс фаз [5]. Причем, под механизмом коллапса фазы следует понимать не столько конформационные перестройки в привитых углеводородных радикалах, сколько вытеснение водных растворов из пор сорбентов с гидрофобными стенками. В таком случае заполнение пор воздухом начнется в самых узких местах порового пространства - для этого сорбенты с неполярным эндкеппингом (хуже – без эндкеппинга) являются идеальными образцами. Это подтверждается сопоставлением сорбционных свойств КП с сорбентом марки С16М - химически модифицированный силикагель с порами среднего размера 110 \AA , без эндкеппинга, и сорбентом марки С16 PLUS с порами с диаметром 60 \AA с неполярным эндкеппингом. В первом случае была найдена неплохая сорбция антоцианов (хотя и примерно вдвое уступающая по емкости сорбции на КП С18), тогда как на сорбентах второго типа антоцианы практически не сорбировались при прочих равных условиях. Факт большей предельной сорбции антоцианов на КП С18 не удивителен, поскольку (по нашим данным) сорбция антоцианов на та-

ких фазах включает проникновение части молекул в привитой слой. Поэтому сорбенты с октадецил-силикагелями обладают большей предельной сорбцией по сравнению с C8-фазой [2].

Для концентрирования веществ, отделенных от исходной матрицы при помощи сорбции на КП, большое значение имеет также и характер элюиционной кривой при последующей десорбции целевых соединений. При этом также обнаружилось большое различие в поведении сорбентов C18(1) и C18(2). Антоцианы в данном случае особенно удобны, поскольку контроль полноты десорбции этих соединений может быть осуществлен и по ослаблению окраски элюата, и по обесцвечиванию сорбента. Для сорбентов C18(1) реэкстракция до обесцвечивания сорбента проходила достаточно быстро (требовалось не более 3÷4 см³ Э2). Для сорбентов C18(2) основная порция антоцианов элюировалась примерно в том же объеме Э2, но окраска слоя сорбента сохранялась. Если такой патрон оставляли заполненным Э2 на 1 ч, то затем удавалось элюировать еще около 5 % антоцианов. При повторной выдержке в течение того же времени извлекали еще 1-2 %, причем и эта стадия не позволяла обесцветить сорбент полностью.

Для объяснения этого явления следует рассмотреть физическую сущность одного из хроматографических артефактов. Суть явления:

1) записываем несколько хроматограмм экстракта плодов черной смородины в изократических условиях в слабом элюенте А. Затем записываем еще одну хроматограмму, но в ступенчатом градиенте: вначале в слабом (А), а затем (после выхода всех антоцианов) - в сильном (Б) элюенте. При этом через 2.0÷2.5 мин после подачи сильного элюента появляется узкий интенсивный артефактный пик, рис.1.

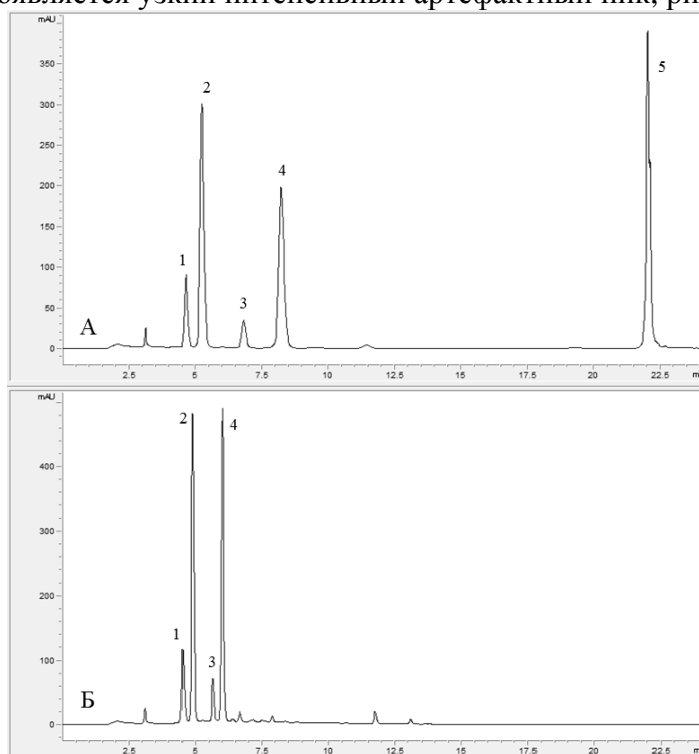


Рис. 1. Хроматограммы экстракта плодов черной смородины. Записаны в условиях А – ступенчатого градиента, Б – линейного градиента.
1 – дельфинидин-3-глюкозид; 2 – дельфинидин-3-рутинозид;
3 – цианидин-3-глюкозид; 4 – цианидин-3-рутинозид; 5 – артефактный пик.

2) записываем хроматограмму антоцианов плодов черной смородины в условиях градиента от слабого (А) к сильному (Б) с некоторой дополнительной выдержкой в нем (не менее времени его использования в первом случае). При этом получаем хроматограмму с характерным для этого растения набором антоцианов без каких бы то ни было нюансов, рис.1Б. Вывод - нет сильно удерживаемых компонентов, которые могли появиться на фронте сильного элюента в первом случае.

Для объяснения данного артефакта мы предлагаем ввести понятие «галерейных» пор. Понятно, что в сорбентах набивных колонок основная сорбция происходит в порах, которые должны быть открытыми. Их изображение в виде цилиндров [10] удобно, просто, но излишне упрощено. Поры по фрактальному подходу должны напоминать по форме пустоты между частицами в плотнейшей шаровой упаковке – вход в широкую пору может быть узким, рис. 2. Чем уже этот вход, тем меньше вероятность выхода из него молекул сорбата и тем больше время их резиденции в поре. Определяющими свойствами сорбентов являются открытые поры, рис.2, поры 1. В поре, в принципе может быть несколько входов, обращенных наружу, и это хорошо, но хуже, если из первой поры существует узкий вход в другую широкую пору, из которой нет другого выхода наружу; аналогично может быть еще один узкий вход в третью пору и т.д. Такие структуры можно назвать «галерейными», рис.2, поры 2. Предложенная структура является прототипом «связанных пор» [11], сквозной характер которых имеет принципиальное значение, например, в монолитных стационарных фазах. Но при наличии только одного выхода из серии галерейных пор время элюирования сорбата из дальних пор может оказаться очень большим, обеспечивая остаточную окраску сорбента после удаления сорбата из внешней поры. В рассмотренном выше артефакте происходит постепенное высвобождение молекул сорбата по всей длине колонки; фронт сильного элюента «собирает» такие молекулы в один артефактный пик, проинтегрированный по всей длине колонки. В обычных режимах сорбаты из галерейных пор высвобождаются постепенно, создавая постоянный фон. После остановки потока при последующем запуске режима перемывки для консервации колонки всегда наблюдается такой артефактный пик, как, впрочем, и при возобновлении работы на следующий день – до ввода первых образцов пробы.

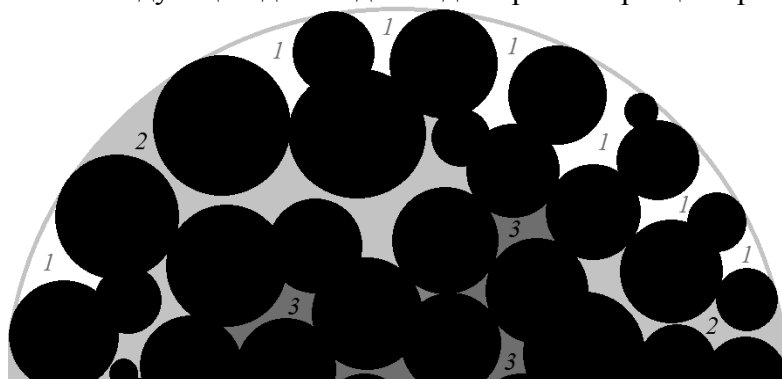


Рис. 2. Схематическое изображение частицы сорбента с порами различного типа: 1 – открытые поры, 2 – галерейные поры, 3 – закрытые поры

В работе [12] было установлено, что сумма каротиноидов (по сумме площадей пиков), элюирующихся из хроматографических колонок, заполненных рядом известнейших в то время марок коммерческих стационарных фаз, была неодинаковой для одних и тех же объемов одной и той же смеси, и была меньше ожидаемой суммы площадей. На основании полученных результатов был сделан вывод о каталитической активности некоторых марок сорбентов по отношению к каротиноидам. И, несмотря на то, что по нашему опыту, некоторые марки коммерческих силикагелей не-

приемлемы для сорбционной очистки каротиноидов именно из-за их разрушения в сорбционном слое, для С18-сорбентов вмешательство «галерейных пор» в конечный результат кажется не менее вероятным.

Заключение

Таким образом, работу КП, заполненных некоторым сорбентом, можно стандартизировать, используя:

1) тест на проскок (в этом случае удобнее использовать окрашенные сорбаты) – по объему экстракта с полной сорбцией определяемого сорбата;

2) характер элюционной кривой (по узости пика сорбата и по отсутствию затянутости тыла пика);

3) тест на «галерейные» поры – по десорбции сорбатов после последовательных выдержек патрона в неподвижном экстрагенте – по концентрации таких элюатов и по числу экстракций, необходимых для полного удаления сорбата из патрона.

Список литературы

1. Żwir-Ferenc A., Biziuk M. // *Polish J. Environ. Stud.* 2006. Vol. 15. pp. 677-690.
2. Чулков А.Н., Болдин А.Б., Дейнека В.И., Дейнека Л.А. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2012. Т. 12. Вып. 6. С. 922-9283.
3. Kraemer-Schafhalter A., Fuchs H., Pfannhauser W. // *J. Sci. Food Agric.* 1998. Vol. 78. pp. 435-440.
4. Саенко И.И., Дейнека Л.А., Дейнека В.И. // *Известия Вузов. Прикладная химия и биотехнология.* 2012. № 2(3). С. 177-179.
5. Przybyciel M., Majors R.E. // *LC • GC Europe.* 2002. pp. 2-5.
6. Яшин Я.И. Физико-химические основы хроматографического разделения. М: Химия. 1976. 216 с.
7. Nawrocki J. // *J. Chromatogr. A.* 1997. Vol. 779. pp. 29-71.
8. Химия привитых поверхностных соединений / Под ред. Лисичкина Г.В. М.: ФИЗМАТЛИТ. 2003. 592 с.
9. Саенко И.И., Дейнека В.И., Дейнека Л.А., Карпеева И.Э. // *Сорбционные и хроматографические процессы.* 2013. Т. 13. Вып. 4. С. 492-499
10. Vasconcelos W.L. // *Quimica Nova.* 1998. Vol. 21, pp. 514-516.
11. Meyers J.J., Nahar S., Ludlow D.K., Liapis A.I. // *J. Chromatogr. A.* 2001. Vol. 907. pp. 57-71.
12. Epler K.S., Sander L.C., Ziegler R.G. Wise S.A. et al. // *J. Chromatogr.* 1992. Vol. 595. pp. 89-101.

References

1. Żwir-Ferenc A., Biziuk M., *Polish J. Environ. Stud.*, 2006, Vol. 15, pp. 677-690.
2. Chulkov A.N., Boldin A.B., Deineka V.I., Deineka L.A., *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy*, 2012, Vol. 12, No 6, pp. 922-9283.
3. Kraemer-Schafhalter A., Fuchs H., Pfannhauser W., *J. Sci. Food Agric.*, 1998, Vol. 78, pp. 435-440.
4. Saenko I.I., Deineka L.A., Deineka V.I., *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Himiya i Biotekhnologiya*, 2012, No 2(3), pp. 177-179.
5. Przybyciel M., Majors R.E., *LC • GC Europe*, 2002, pp. 2-5.
6. Yashin Ya.I. *Fiziko-himicheskie Osnovy Hromatograficheskogo Razdeleniya.* M., Himiya Publ., 1976, 216 p.
7. Nawrocki J., *J. Chromatogr. A.*, 1997, Vol. 779, pp. 29-71.
8. Himiya Privityh Poverhnostnyh Soedinenij. Pod red. Lisichkina G.V. M., Fizmatlit Publ., 2003, 592 p.
9. Saenko I.I., Deineka V.I., Deineka L.A., Karpeeva I.E., *Sorbtsionnye i*

khromatograficheskie protsessy, 2013, Vol. 13, No. 4, pp. 492-499.

10. Vasconcelos W.L., *Quimica Nova*, 1998, Vol. 21, pp. 514-516.

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

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

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

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

Костенко Михаил Олегович - студент Института инженерных технологий и естественных наук Белгородского государственного национального исследовательского университета, Белгород

11. Meyers J.J., Nahar S., Ludlow D.K., Liapis A.I., *J. Chromatogr. A*, 2001, Vol. 907, pp. 57-71.

12. Epler K.S., Sander L.C., Ziegler R.G. Wise S.A., Craft N.E., *J. Chromatogr.*, 1992, Vol. 595, pp. 89-101.

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

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

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

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

Kostenko Michail O. - student of Common Chemistry Chair of Institute of Engineering Technologies and Natural Sciences of Belgorod National Research University, Belgorod