

**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
Факультет естественных наук  
Кафедра аналитической химии**

Дипломная работа

**ПРИМЕНЕНИЕ МИКРОПРЕПАРАТИВНОЙ ВЭЖХ В  
СОЧЕТАНИИ СО СПЕКТРАЛЬНЫМИ МЕТОДАМИ  
ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ КОМПОНЕНТОВ В  
СЛОЖНЫХ СМЕСЯХ**

Егорова Таисия Анатольевна

Научный руководитель  
Друганов Александр Георгиевич

Новосибирск – 2005

## 1. Оглавление

2. Введение	3
3. Обзор литературы	5
3.1. Хроматографическое разделение с целью последующей идентификации спектральными методами.	5
3.1.1. Масс-спектрометрия	5
3.1.2. ЯМР - спектроскопия	5
3.1.3. ИК–спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния	6
3.2. Особенности препаративного и аналитического хроматографического разделения	6
3.3. Принципы препаративной ЖХ	7
3.4. Нагрузка на колонку	9
3.5. Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой	9
3.5.1. Нагрузка и коэффициент разделения	9
3.5.2. Нагрузка и эффективность	10
3.5.3. Нагрузка и удерживание	11
3.5.4. Скорость потока подвижной фазы	11
3.5.5. Влияние нагрузки на форму пика	12
4. Экспериментальная часть	14
4.1. Материалы	14
4.2. Оборудование	14
4.2.1. Устройство для сбора элюата	14
4.2.2. Удаление элюента	15
4.3. Расчётные формулы	16
4.4. Эксперименты	17
4.4.1. Оптимизация микропрепаративной хроматографии	17
4.4.2. Оценка количества вещества, необходимого для получения ИК-спектров	20
4.4.3. Выделение фракций компонентов и получение ИК – спектров	21
4.4.4. Получение дополнительной информации о компонентах образца	23
4.4.4.1. Идентификация некоторых компонентов методом стандарта	23
4.4.4.2. УФ - спектроскопия	24
4.4.4.3. Влияние рН элюента на удерживание компонентов	25
4.4.4.4. Превращение свободных кислот в сложные эфиры	27
5. Результаты и обсуждения	29
5.1. Сравнение литературного и экспериментальных ИК - спектров	29
5.2. Зависимость удерживания и поглощения от рН	29
5.3. Подтверждение присутствия карбоновых кислот с помощью реакции дериватизации	31
5. Выводы	32
6. Используемая литература	33

## 2. Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) в последнее время стала одним из ведущих аналитических методов, без которого невозможно развитие таких областей науки, как исследования биохимических препаратов, анализ природных соединений, экологические исследования.

Широкое использование метода ВЭЖХ обусловлено возможностью неdestructивного анализа высокомолекулярных, полярных и термически лабильных веществ. С помощью ВЭЖХ возможно разделение и количественное определение сложных смесей веществ за непродолжительное время.

Наибольшее количество жидкостных хроматографов снабжено УФ-детекторами, которые наряду с массой достоинств (простота конструкции, относительная дешевизна, высокая чувствительность) обладают рядом недостатков. Главным из этих недостатков является недостаточная информативность УФ-спектров для достоверной идентификации веществ. Особенно это относится к веществам, не имеющим в своей структуре сопряженных двойных связей и функциональных групп, являющихся хромофорами.

Сложные смеси природных соединений часто имеют структуры, не содержащие ярко выраженных хромофоров. Это создает трудности при идентификации компонентов, поэтому анализ проводят в 2 стадии: препаративно выделяют фракции из сложных смесей, а выделенные компоненты анализируют с помощью различных спектральных методов.

К основным спектральным методам анализа, позволяющим получить информацию о структуре химического соединения, можно отнести инфракрасную спектроскопию (ИК), масс-спектрометрию и спектроскопию ядерного магнитного резонанса (ЯМР). Эти методы позволяют анализировать достаточно малые количества вещества (таблица 1).

Таблица 1. Количество образца, необходимое для анализа различными спектральными методами.

Метод	Необходимое количество вещества
ИК-спектроскопия	0.1 - 10 мкг
Масс-спектрометрия	0.1 - 1 мкг
ЯМР	0.1 - 10 мг

Для выделения таких количеств возможно применение обычного аналитического хроматографа вместо препаративного, что могло бы позволить сократить затраты элюентов и времени на дополнительную оптимизацию разделения.

Нам представляется актуальной задача адаптирования аналитической хроматографии для микропрепаративных целей. Задачу решали на примере препарата Силк, который широко используется в сельском хозяйстве и является сложной смесью природных соединений [1], с использованием дополнительных веществ, которые выполняли роль модельных.

### **3. Обзор литературы**

#### **3.1. Хроматографическое разделение с целью последующей идентификации спектральными методами.**

Для идентификации органических веществ и установления их структуры применимы спектроскопические методы анализа, такие как: инфракрасная (ИК), ультрафиолетовая (УФ) спектроскопия, спектроскопия комбинационного рассеяния (КР), масс-спектрометрия и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР).

При планировании хроматографического разделения для последующего анализа такими методами необходимо знать, какое минимальное количество вещества можно использовать для получения качественных данных, т.е. чувствительность данного метода.

##### **3.1.1. Масс-спектрометрия**

“Масс-спектрометрия – физический метод исследования и анализа вещества, основанный на измерении числа образовавшихся ионов этого вещества в зависимости от отношения их массы к заряду... Абсолютная чувствительность масс-спектрометров достигает  $10^5$ - $10^7$  атомов” [2], что составляет около  $10^{-18}$  –  $10^{-16}$  г.

По данным фирмы “Thermo Electron Corporation”, типичная чувствительность производимых приборов составляет десятки пикограмм ( $10^{-11}$  г) при хроматографическом вводе пробы в масс-спектрометр [3].

Универсальность метода заключается в том, что анализируемое вещество может находиться в любом агрегатном состоянии (газ, пар, жидкость, твёрдое тело, а также раствор), существует возможность анализировать высококипящие и термолабильные вещества.

##### **3.1.2. ЯМР - спектроскопия**

По данным одного из ведущих производителей ЯМР-спектрометров фирмы “Varian, Inc.” для получения спектра необходимо количество образца около 10 - 0.1 мг, при этом время получения  $^1\text{H}$  спектра составляет секунды, а  $^{13}\text{C}$  до часа. Образец может находиться в любом агрегатном состоянии (газ, жидкость, твёрдое тело), а размер его может составлять менее 1/1000 кубического дюйма, что составляет около 15,5 мкл [4].

### 3.1.3. ИК – спектроскопия и спектроскопия комбинационного рассеяния

Методы анализа по инфракрасным спектрам поглощения и по спектрам комбинационного рассеяния взаимно дополняют друг друга. К преимуществам комбинационной спектроскопии можно отнести простоту интерпретации спектра, нечувствительность оптики и материала кювет к атмосферной влаге и водным растворам. Но инфракрасная спектроскопия позволяет анализировать вещества в любом агрегатном состоянии и обладает более высокой чувствительностью [5].

Производители не приводят чувствительности ИК – спектрометров. Но для прогнозирования возможной чувствительности метода можно воспользоваться традиционными характеристиками спектрофотометрии:

$C_{min}$  – минимальная концентрация определяемого вещества,

$A_{min}$  – минимальная величина оптической плотности,

$\varepsilon$  – коэффициент экстинкции,

$l$  – длина оптического пути.

Эти величины связаны законом Бугера – Ламберта – Бера:

$$A_{min} = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon \times C \times l,$$

Где  $I_0$  – интенсивность падающего света, а  $I$  – интенсивность света после прохождения через поглощающую среду [6, 7].

Величину  $A_{min} = \lg \frac{I_0}{I}$  можно посчитать из соотношения сигнал/шум – паспортной характеристики любого ИК–спектрометра. Зная коэффициент экстинкции основных функциональных групп соединения и длину оптического пути, можно рассчитать чувствительность ИК – спектрометра.

### 3.2. Особенности препаративного и аналитического хроматографического разделения

Аналитическая и препаративная хроматография отличаются по своей сути даже в том случае, если выполняются в одном и том же масштабе. Обычно аналитическую жидкостную хроматографию (ЖХ) используют для получения качественной или количественной информации о данном образце, компоненты которого после разделения

обычно отбрасываются. Препаративная ЖХ ориентирована на выделение, обогащение или очистку одного или большего числа компонентов образца, которые собирают для дальнейшего использования. В этом случае детектор используется для получения информации о том, как фракционировать поток элюента.

Таблица 2. Сравнение аналитической и препаративной ЖХ.

Основа сравнения	Аналитическая ЖХ	Препаративная ЖХ
Цель	Получение качественной или количественной информации об образце	Выделение, обогащение или очистка компонентов образца
Практическое назначение	Максимальная пиковая ёмкость (число компонентов, разделённых или измеренных в единицу времени)	Максимальный выход (количество материала, очищенного в единицу времени)
Типичный размер образца	До 10 мг	Микропрепаративная: $\leq 100$ мг Препаративная: 0,1 – 100 г Макропрепаративная: $\geq 0,1$ кг
Нагрузка на колонку	Как можно меньшая, обычно $10^{-10}$ – $10^{-3}$ г образца на 1 г насадки	Как можно большая, обычно 0,001 – 0,1 г образца на 1 г насадки
Степень разделения	Соответствует возможностям техники детектирования. Обычно разделение до нулевой линии	Соответствует требованиям уровня чистоты и степени извлечения. Часто вполне достаточно умеренного разрешения
Детектор	Необходима высокая чувствительность и широкий динамический диапазон	Желателен для анализа фракций «он-лайн» или «офф-лайн», необходим расширенный линейный диапазон измерения
Назначение образца	Обычно образец сбрасывают вместе с подвижной фазой	Фракции образца собирают, подвижная фаза может быть возвращена в процесс

### 3.3. Принципы препаративной ЖХ

При планировании разделения методом препаративной ЖХ необходимо учитывать по крайней мере пять независимых факторов: чистота выделенного компонента, количество, время, качество разделения и стоимость.

Требования к чистоте материала и разделённых компонентов обуславливаются дальнейшим их использованием. Даже в случае плохого разделения компонентов, их чистоты при сборе фракций можно добиться “вырезанием” узкой полосы пика, жертвуя при этом количеством данного компонента (рис. 1).

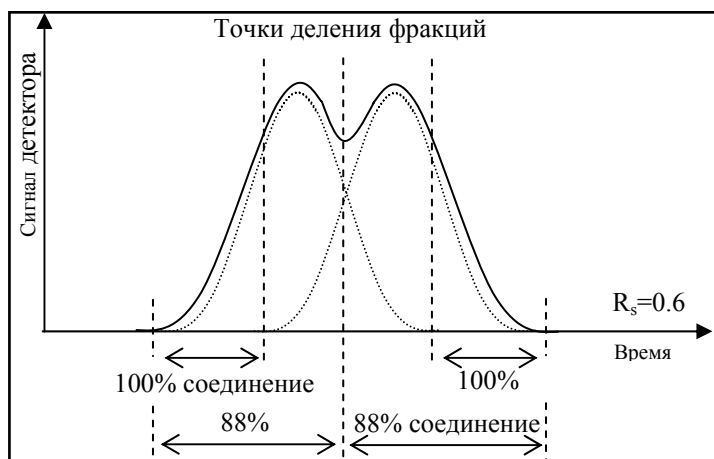


Рис. 1. Получение чистого вещества при неполном разделении.

При расчёте количества разделяемого образца стоит обратить внимание на несколько аспектов. Во-первых, требуемое количество готового, очищенного материала, во-вторых, уровень концентраций исследуемых компонентов в матрице образца. А также возможности оборудования. Так, например, для получения компонента, концентрация которого мала, необходимо переработать большие количества образца; или если в наличии имеется только оборудование для маломасштабных разделений, то большой образец может быть разделён на части и подвергнут многократному разделению.

Время, затрачиваемое на разделение, может определяться несколькими основными параметрами: скоростью элюирования, времена удерживания компонентов смеси, количество единичных разделений и др.

Правильно составленный план поможет уменьшить как время и стоимость, так и трудоёмкость разделения. Имеется несколько ключевых моментов, которые нужно учитывать при подходе к препаративному ЖХ-разделению:

1. Каждый компонент, подлежащий хроматографированию, должен быть растворён в растворителе подходящего состава при необходимой концентрации.
2. Желательно, чтобы методы, используемые для перевода образца в раствор и удаления нерастворимой части, исключали большие посторонние части матрицы образца, уменьшая при этом проблему как сложности, так и масштаба разделения.



3. Каждая правильно спланированная ступень часто на порядок увеличивает разделяющую способность и скорость многомерной системы разделения.
4. Аналитическая ЖХ является идеальным средством для оптимизации системы.
5. Выделенные в индивидуальных фракциях компоненты образца находятся в растворе при концентрациях, значительно более низких, чем концентрации, в которых они были введены в хроматограф. Степень разбавления зависит от колонки и удерживания компонентов. Для удаления растворителя и примесей, занесённых в результате использования большого объёма растворителя и применения неподвижных фаз, появляется необходимость применения других приёмов. Эта особенность препаративного разделения часто не принимается во внимание.

### **3.4. Нагрузка на колонку**

Количество образца, которое можно ввести в колонку для препаративного разделения необходимого качества, зависит от многих факторов, и для каждого случая должно определяться экспериментально, с использованием растворов образца разной концентрации. В самом общем случае масса образца, которую можно ввести, составляет от 0,1 до 1 мг на 1 г сорбента при отсутствии заметной перегрузки колонки пробой (снижение эффективности колонки менее чем в 2 раза).

Как правило, препаративные разделения проводят при максимально возможной перегрузке колонки пробой, поэтому, чем больше селективность для разделяемых компонентов, тем больше можно перегрузить колонку пробой и тем, соответственно, больше получить разделенного вещества за препаративный цикл [8,9].

### **3.5. Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой**

#### **3.5.1. Нагрузка и коэффициент разделения**

На рис.2. графически представлено хроматографическое разделение при различных соотношениях между коэффициентом селективности  $\alpha$  и коэффициентом разделения для случаев аналитических и препаративных нагрузок.

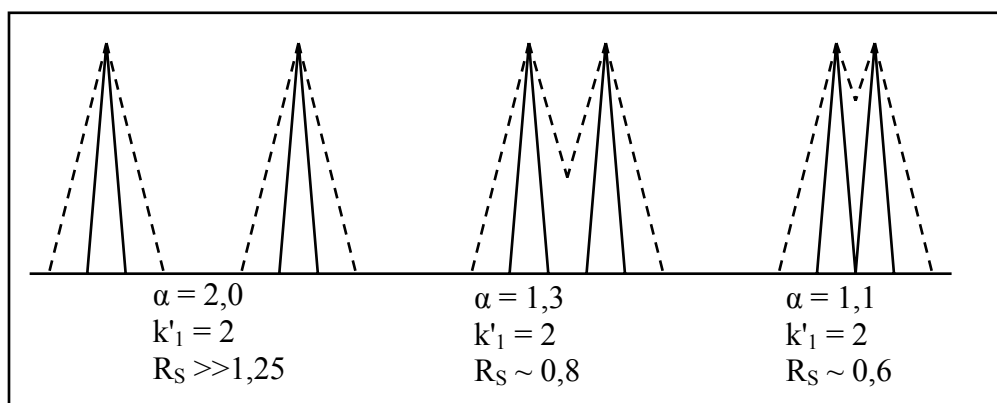


Рис.2. Соотношение между коэффициентом  $\alpha$  и коэффициентом разделения. Треугольники, изображённые сплошными линиями, показывают пики при малых нагрузках, штриховыми линиями – наблюдаемое разрешение пиков в тех же условиях, но с увеличенной в 10 раз нагрузкой. Приблизительные значения разрешения соответствуют условиям большой нагрузки. Искажение формы пика и смещение максимума пика при увеличении нагрузки не учтены.  $k'_1$  – коэффициент массового распределения,  $R_S$  – разрешение.

Сравнивая эти три хроматограммы, можно увидеть, что если, например, путём выбора различных подвижной или неподвижной фаз увеличить коэффициент селективности  $\alpha$ , нагрузка может быть многократно увеличена без потерь в чистоте выделяемых компонентов.

### 3.5.2. Нагрузка и эффективность

Как правило, в препаративной хроматографии используют два типа эффективности: собственную эффективность колонки, которая определяется динамическими и гидродинамическими свойствами упакованного слоя, конструкцией аппаратуры, свойствами сорбента и т.д., и разделительную эффективность, которая существенно зависит от природы и количества образца и физико-химических характеристик разделительной системы. Мерой любого типа эффективности является число теоретических тарелок  $N$ , но первая эффективность обычно определяется при условиях идеальных, а последняя – при действительных препаративных условиях ХЖ. При больших значениях коэффициента разделения можно использовать большие нагрузки, при этом число эффективных тарелок будет намного меньше, чем собственное число тарелок используемой колонки. Однако при приближении коэффициента разделения к 1, для достижения разделения нагрузка должна быть уменьшена, и тогда оба типа эффективности будут близки друг к другу (рис.2).

Следует отметить, что в аналитической ЖХ имеют дело с очень разбавленными растворами, при этом не возникает необходимости в таких понятиях, как массовая и объёмная перегрузка. В препаративной ЖХ используются большие концентрации образцов, что может приводить к увеличению высоты тарелки, дополнительному уширению полосы и уменьшению разрешения – а это и есть “симптомы” массовой перегрузки. Если же вводимый объём при нормальных концентрациях образца превышает 10-20% от мёртвого объёма колонки, то пики слабоудерживаемых компонентов могут чрезмерно размываться и разрешение может стать недостаточным для достижения желаемого результата. Такие условия называют объёмной перегрузкой. Этот эффект также необходимо учитывать при планировании препаративного разделения.

### 3.5.3. Нагрузка и удерживание

Время удерживания также является принципиальным параметром разделения, так как влияет на два важных фактора: временные затраты на проведение разделения и расход элюента. В свою очередь время разделения определяется большим числом переменных, начиная с термодинамических свойств ЖХ системы.

Коэффициент распределения растворённых веществ между неподвижной и подвижной фазами  $k'$  напрямую связан со временем удерживания компонентов.

$$k' = \frac{V_i}{V_0} - 1,$$

где  $V_i$  – объём удерживания компонента,  $V_0$  – свободный объём колонки.

При оптимизации коэффициента селективности  $\alpha$  комбинацию подвижной и неподвижной фаз, прежде всего, выбирают так, чтобы сделать максимальным отношение коэффициентов  $k'$ , и затем стремятся установить наименьшее значение  $k'$ , которое позволяет работать с хорошей нагрузкой при приемлемом разрешении, поскольку это минимизирует общее время разделения.

### 3.5.4. Скорость потока подвижной фазы

Как известно, хроматографическая зона размывается в результате диффузионных процессов. Мерой этого размывания в колонке является высота, эквивалентная теоретической тарелке (ВЭТТ) – величина, обратная эффективности. Размывание полосы

в хроматографической колонке (снижение эффективности) обусловлено тремя причинами: наличием вихревой диффузии, молекулярной диффузии и сопротивления массопереносу. Общая ВЭТТ ( $H$ ) колонки получается путем суммирования вкладов всех этих факторов:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

где  $A$ ,  $B$  и  $C$  – константы,  $u$  – скорость потока. В таком виде это выражение представляет собой известное уравнение Ван-Деемтера [10].

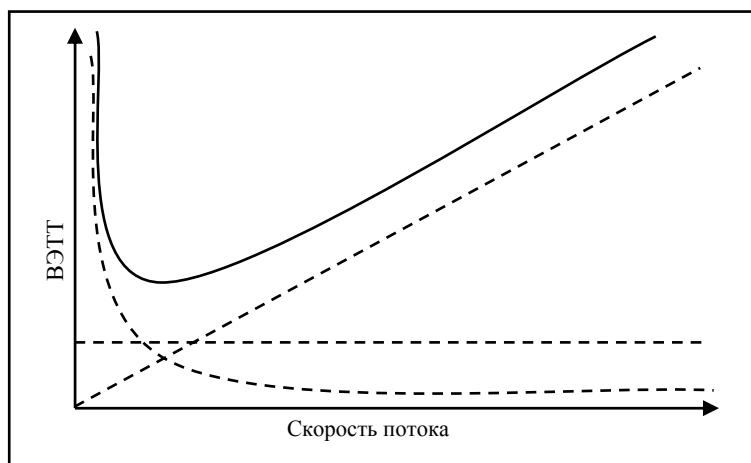


Рис.3. Общий вид зависимости ВЭТТ от скорости потока элюента.

### 3.5.5. Влияние нагрузки на форму пика

Если количество образца в подвижной или неподвижной фазе выразить как произведение концентрации образца ( $C_s$  или  $C_m$  соответственно) и объема фазы ( $V_s$  или  $V_m$  соответственно), то массовый коэффициент распределения можно выразить:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = K_D \cdot \frac{C_s}{C_m}$$

График зависимости  $C_s$  от  $C_m$  для данного соединения и адсорбционной системы в условиях равновесия должен давать прямую линию с наклоном, равным  $K_D$  (рис. 4а). График, представляющий изотерму Ленгмюра, отклоняется от линейности в точке, где адсорбционная ёмкость по образцу неподвижной фазы или растворимость образца в подвижной фазе становится ограниченной (нижняя и верхняя кривая, соответственно).

Размывание задней части пика начинается в вершине пика и продолжается до нулевой линии. На рис. 4б схематически показано, как при росте концентрации в нелинейной области форма пика из равнобедренного треугольника постепенно переходит в форму прямоугольного. Фронт становится вертикальным, а задний конец пика

расширяется. При этом вершина пика элюируется при кажущемся  $k'$ , много меньшем действительного, рассчитанного из положения максимума при малых нагрузках.

Это явление также необходимо учитывать при планировании препаративного разделения, так как размытые хвосты и их перекрывание могут отразиться на чистоте выделяемых компонентов.

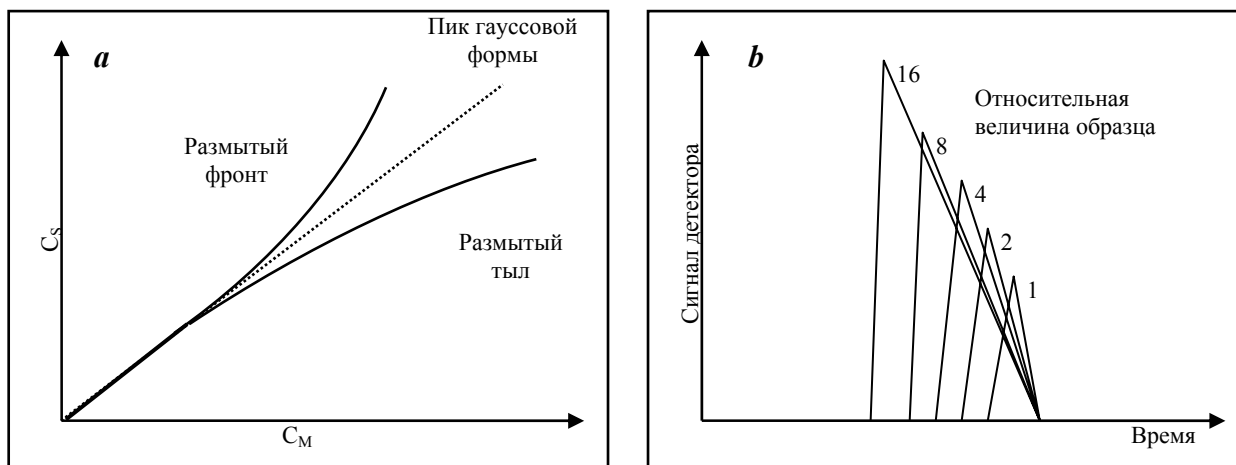


Рис.4. а: Изотермы Ленгмюра. б: Представление с помощью треугольников изменения формы пика с увеличением нагрузки.

## 4. Экспериментальная часть

### 4.1. Материалы

В работе использованы реактивы: ацетонитрил (AcCN) “сорт 1” (“Криохром”, для хроматографии, С.-Петербург); метанол “чда”; вода бидистиллированная; 0.05 М водная трифторуксусная кислота (ТФУК); 0.02 М водная фосфорная кислота; 0.02 М водный калия гидроксид (KOH); бромид калия (KBr), хч; ацетон, чда; бром (Br<sub>2</sub>); поташ (K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>); триэтиламин (N(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>3</sub>) перегнанный.

Препараты: препарат Силк; дегидроабиетиновая кислота; абиетиновая кислота; 1-2-(4-Изобутилфенил)-пропионовая кислота (ибупрофен), фарм.; пентаметилдифенил, хч; *m*-нитроанилин, хч; бензойная кислота, хч.

### 4.2. Оборудование

Хроматограф жидкостной микроколоночный “Милихром А-02” (ЗАО “ЭкоНова”, Новосибирск), оснащённый колонкой 2×75 мм, Prontosil 120-5-C18 AQ, d<sub>p</sub>=5 мкм; весы аналитические электронные “Adventurer” и весы технические электронные “Scout II” фирмы “Ohaus Europe” (Швейцария); *pH*-метр “Анион-4100” (НПП “Инфраспек-Аналит”, Новосибирск), допускаемая погрешность при измерении *pH*±0.03; магнитная мешалка “ПЭ-6110” (АО “Экрос”, С.-Петербург); микроцентрифуга “MiniSpin” (Eppendorf, Германия); пипетки переменного объёма со сменными наконечниками “Ленпипет Колор” (100 мкл±1.5%, 1000 мкл±1.0%); пипетки со сменными наконечниками (20 мкл±2.0%, 200 мкл±1.5%) (ЗАО “ТермоЛабсистемс”, С.-Петербург); колбы мерные (50 мл±0.1%, 100 мл±0.1%); пенициллиновые склянки, установка микросинтеза (КБ НИОХ СО РАН); устройство для сбора элюата (ЗАО “ЭкоНова”, Новосибирск); ИК - спектрофотометры: “FTIR – 8300” (Shimadzu Deutschland, Germany), “Vector - 22” (Bruker, Germany).

Запись ИК-спектров проводилась в лаборатории кислотно-основного катализа Института Катализа СО РАН.

#### 4.2.1. Устройство для сбора элюата

При сборе фракций необходимо учитывать внутренний объём выводящей системы между детектором и сборником.

В высокоэффективном микроколоночном хроматографе “Милихром А-02” к выходу рабочей кюветы подключён клапан противодействия, который препятствует образованию пузырьков воздуха – одной из основных проблем при работе на жидкостных хроматографах со спектрофотометрическим детектором – за счёт создания дополнительного давления (порядка 2-3 атмосфер) [11]. Применение такого клапана для сбора разделённых компонентов при препаративном разделении нежелательно в связи с большим внутренним объёмом такой выводящей системы.

Эта проблема решается с помощью специального приспособления, которое так же позволяет создавать дополнительное давление (подбирается вручную) и имеет малый внутренний объём. Схематическое изображение этого приспособления показано на рис. 5.

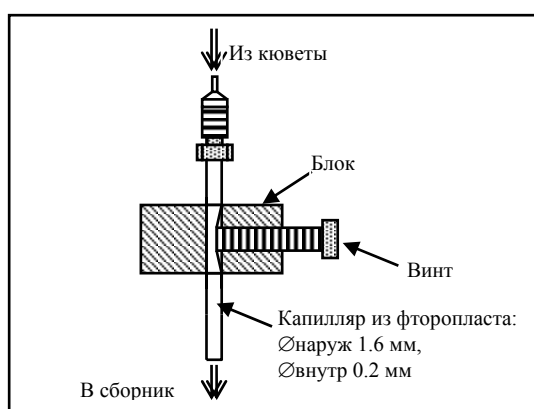


Рис. 5: Устройство для сбора элюата.

Общий объём выводящей системы складывается из объёмов капилляра, находящегося между кюветой и выходным отверстием хроматографа ( $\varnothing_{\text{внутр}}$  0.1 мм, длина 50 мм), и объёмом устройства для сбора элюата ( $\varnothing_{\text{внутр}}$  0.2 мм, длина 35 мм), и составляет 1.5 мкл.

#### 4.2.2. Удаление элюента

Удаление элюента проводилось вакуумом водоструйного насоса на установке микросинтеза (разработка КБ НИОХ СО РАН), которая позволяет работать с микроколичествами вещества. Схема установки приведена на рис. 6.

В результате вращения раствор покрывает стенки сосуда тонкой плёнкой, что позволяет удалять растворитель без опасности выброса раствора.

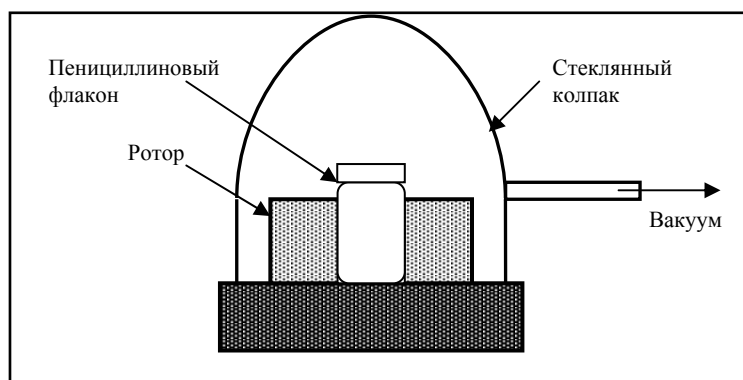


Рис. 6: Установка для удаления растворителя. Пенициллиновый флакон фиксируется в отверстии вращающегося механизма, который герметично закрывается стеклянным куполом с выходом к водоструйному насосу.

### 4.3. Расчётные формулы

Эффективность, ТТ:

$$N_i = 16 \times \left( \frac{V_i}{W_i} \right)^2$$

где  $V_i$  – объём удерживания,  $W_i$  – ширина пика.

Приведённая высота, эквивалентная теоретической тарелке (ПВЭТТ):

$$H_i = \frac{1000 \times L}{N_i \times d_p}$$

где  $N_i$  – эффективность,  $L$  – длина колонки (75 мм),  $d_p$  – диаметр частиц сорбента (5.0 мкм).

Относительное время удерживания (фактор ёмкости):

$$k' = \frac{V_i}{V_0} - 1$$

где  $V_i$  – объём удерживания,  $V_0$  – свободный объём.

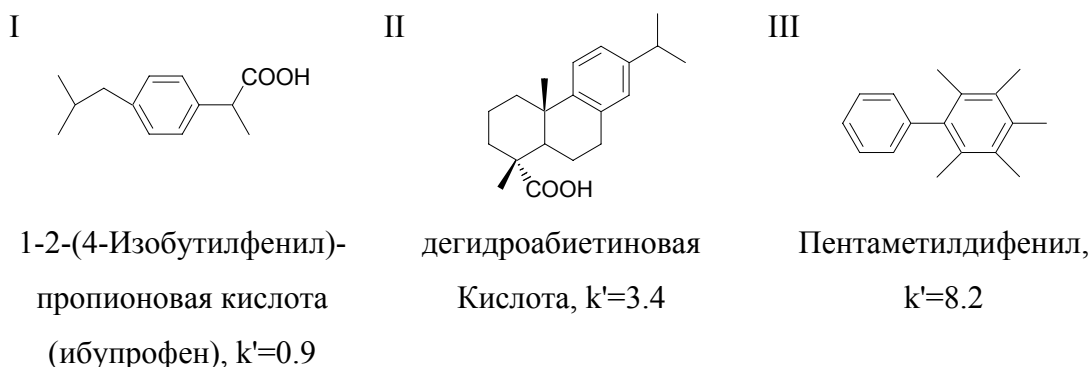


## 4.4. Эксперименты

### 4.4.1. Оптимизация микропрепаративной хроматографии

Для проведения опытов, позволяющих установить влияние различных факторов на разделяющую способность колонки, использовали модельные вещества, которые удовлетворяли бы основным требованиям: должны быть доступны и иметь времена удерживания, близкие к временам удерживания разделяемых компонентов смеси.

Для этих целей были выбраны следующие вещества:



На рис. 7 приведены хроматограммы препарата Силк и смеси модельных веществ.

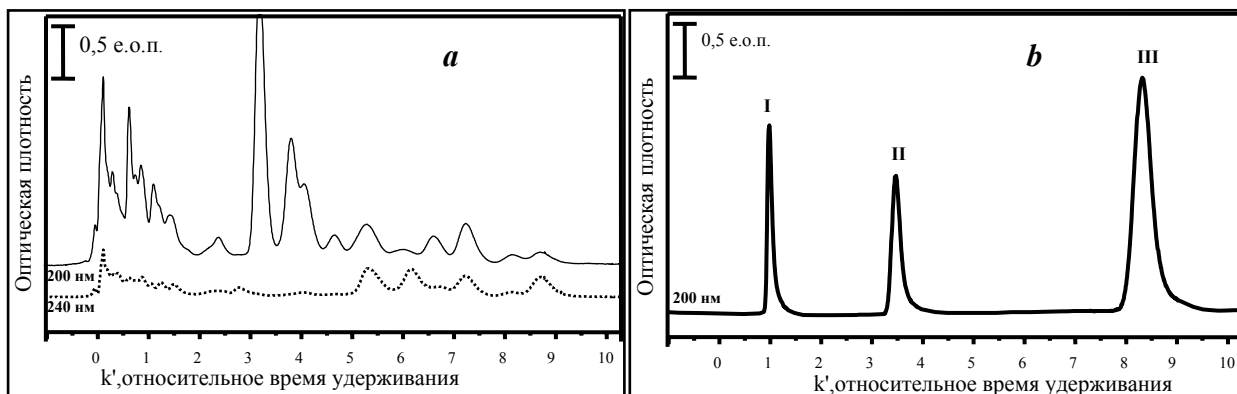


Рис.7: Хроматограммы: а - препарата Силк, б - смеси модельных веществ: I – ибупрофен, II - дегидроабетиновая кислота, III – пентаметилдифенил

Условия хроматографирования:

Подвижная фаза: 0.05 М водная ТФУК - ацетонитрил (25:75);

Скорость потока: 100 мкл/мин;

Температура: 40°C;

Детектирование: 200, 240 нм;

Давление: 1.7 МПа

Оптимизацию проводили путём изменения одного из параметров хроматографической системы. Исследовали следующие зависимости:

1. Зависимость фактора ёмкости от содержания органической составляющей в подвижной фазе  
Подвижная фаза: 0.05 М ТФУК, - ацетонитрил (65, 70, 75, 80, 90%).
2. Зависимость ПВЭТТ от концентрации  
Концентрации образцов: I – 0.1÷10 мг/мл, II – 0.125÷1 мг/мл, III – 0.5÷2 мг/мл.
3. Зависимость ПВЭТТ от объёма вводимой пробы  
Объём пробы: 2÷8 мкл.
4. Зависимость ПВЭТТ от скорости потока элюента  
Скорость потока: 20, 50, 100, 200 мкл/мин.
5. Зависимость ПВЭТТ от температуры  
Температура: 35, 40, 45, 50, 55, 60 °С.

По полученным хроматограммам построены зависимости, приведённые на рис. 8.

Из полученных графиков видно, что:

1. Все три модельных вещества удерживаются по распределительному механизму.
2. Эффект от объёмной перегрузки значительно превышает массовую. Исходя из этого, следует выбирать наименьший объём пробы, 1-2мкл.
3. Влияние температуры на эффективность достаточно мало.
4. Зависимость эффективности от скорости потока подчиняется уравнению Ван-Деемпера; в области 80 – 200 мкл эффективность можно считать постоянной, а скорость потока выбирать исходя из соображений удобства при сборе фракций.

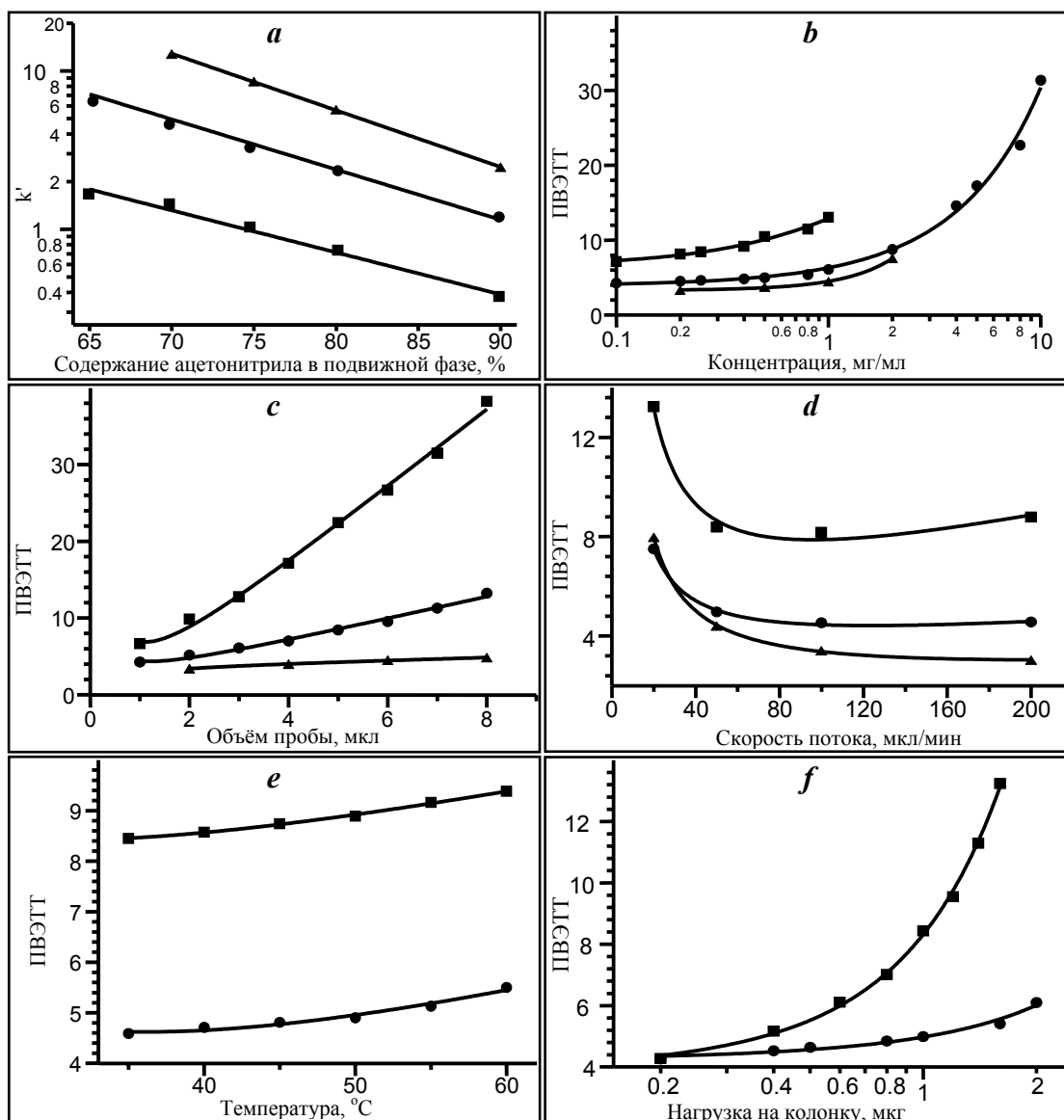


Рис.8: Зависимость: фактора ёмкости от состава подвижной фазы (a); ПВЭГТ от: концентрации образца в пробе (b), объёма пробы (c), скорости потока элюента (d), температуры (e) (обозначения: ■ - ибупрофен,  $k'=0.9$ , ● - дегидроабиетиновая кислота,  $k'=3.4$ , ▲ - пентаметилдифенил,  $k'=8.2$ ). f- сопоставление влияния на эффективность увеличения концентрации и объёма пробы дегидроабиетиновой кислоты (■ - концентрация 0.2 мг/мл, ● - объём пробы 2 мкл).

Для установления потерь при сборе фракций провели 5 хроматографических выделений дегидроабиетиновой кислоты (концентрация 4 мг/мл, объём пробы 2 мкл) со сбором фракций. Полученный объём довели до 1 мл. Концентрация должна составить 0,040 мг/мл. СКО составило 1.0%. Концентрация полученного раствора составила 0.038 мг/мл. На рис. 9. приведены хроматограмма дегидроабиетиновой кислоты с разметкой собираемой фракции и градуировочный график.

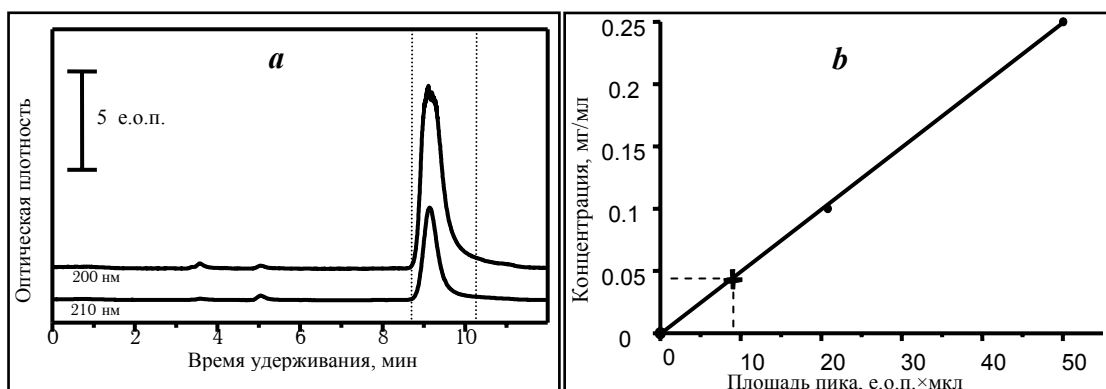


Рис.9а: Выделение фракции дегидроабиединовой кислоты. 9б: Градуировочный график для определения количества дегидроабиединовой кислоты в собранной фракции

#### 4.4.2. Оценка количества вещества, необходимого для получения ИК-спектров

Для прогнозирования чувствительности ИК – спектрометра воспользовались формулами, приведёнными в п. 3.1.3, где  $C_{min}$  – минимальная концентрация определяемого вещества,  $A_{min}$  – минимальная величина оптической плотности,  $\epsilon$  – коэффициент экстинкции, а  $l$  – длина оптического пути.

Величина  $A_{min}$  для современных приборов составляет  $6.5 \times 10^{-5} \div 1.6 \times 10^{-5}$  при соотношении сигнал/шум равном 3.

Коэффициент экстинкции для метильных групп составляет в среднем 0,440 л/(г×мм) в области  $2960-2924 \text{ см}^{-1}$  и 0,035 л/(г×мм) в области  $1400-1340 \text{ см}^{-1}$  [7]. Длина оптического пути ( $l_{эфф}$ ) составляет 0.1 мм, а объём мишени спектофотометра, используемого в данной работе, равен 2,5мкл.

Таким образом,

$$C_{min} \sim 4 \times 10^{-4} \div 15 \times 10^{-4} \text{ г/л} \quad (M_{min} \sim 1 \times 10^{-9} \div 4 \times 10^{-9} \text{ г}) \text{ в области } 2960-2924 \text{ см}^{-1} \text{ и}$$

$$C_{min} \sim 5 \times 10^{-3} \div 19 \times 10^{-3} \text{ г/л} \quad (M_{min} \sim 1 \times 10^{-8} \div 5 \times 10^{-8} \text{ г}) \text{ в области } 1400-1340 \text{ см}^{-1}.$$

Принимая во внимание, что рассчитанная концентрация относится только к поглощению метильных групп, зная их количество в молекуле образца, можно рассчитать минимальное количество вещества. Так, молярная масса дегидроабиединовой кислоты составляет 300 г/моль, содержание в ней метильных групп  $4 \times 15 \text{ г/моль} = 60 \text{ г/моль}$ ,  $M_{min} \sim 5 \times 10^{-9} \div 20 \times 10^{-9} \text{ г}$  в области  $2960-2924 \text{ см}^{-1}$  и  $M_{min} \sim 5 \times 10^{-8} \div 25 \times 10^{-8} \text{ г}$  в области  $1400-1340 \text{ см}^{-1}$ .

Для получения ИК - спектра дегидроабиединовой кислоты необходимо  $0,05 \div 0,25$  мкг образца.

Для экспериментальной оценки этой величины были получены ИК - спектры дегидроабиединовой кислоты на спектрофотометре "FTIR – 8300".

Растворы в ацетонитриле различной концентрации наносили на мишени для спектрофотометра, заполненные порошком бромида калия. Объем нанесённого раствора составил 5 мкл. Для сравнения на дополнительную мишень был нанесён чистый ацетонитрил. Пробы высушивали на воздухе.

Полученные спектры приведены на рис. 10.

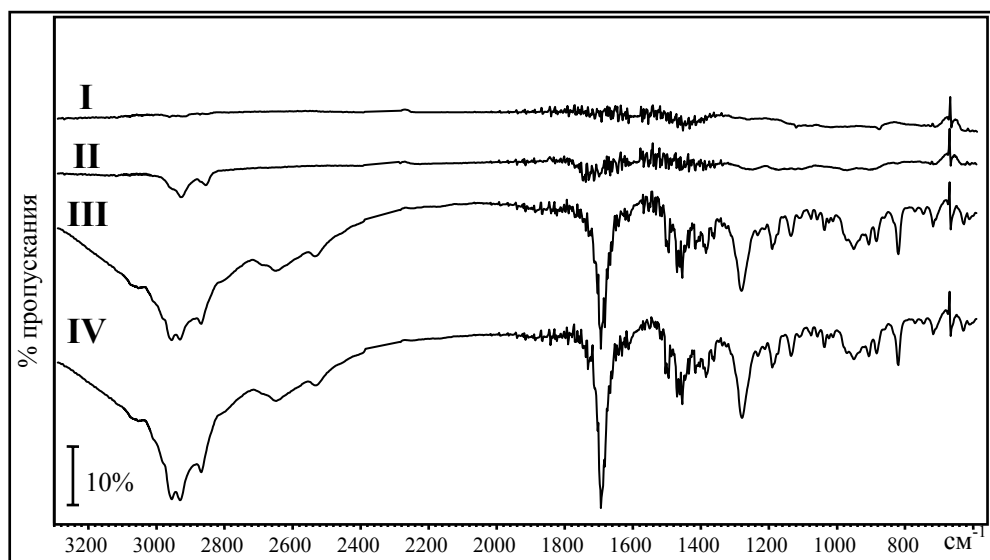


Рис.10: ИК спектр раствора дегидроабиединовой кислоты различных концентраций, нанесённого на КВг. I – чистый растворитель, II – раствор с концентрацией 0.1 мг/мл, III – раствор с концентрацией 2 мг/мл, IV – раствор с концентрацией 10 мг/мл.

Видно, что для получения качественного спектра необходимо 1 - 10 мкг чистого вещества, нанесённого на мишень.

Различие в теоретическом и экспериментальном значениях искомой величины вероятно обусловлено чувствительностью к атмосферной влаге. Использование инертной атмосферы и негигроскопичного наполнителя мишени, возможно, позволило бы достичь теоретических пределов чувствительности.

#### 4.4.3. Выделение фракций компонентов и получение ИК - спектров

Микропрепаративное выделение чистых компонентов проводилось в условиях:

Подвижная фаза: 0.05 М водная ТФУК - ацетонитрил (25:75);

Скорость потока: 200 мкл/мин;

Температура: 40°C;

Детектирование: 200, 240 нм;

Концентрация 200 мг/мл, объём пробы 2 мкл.

Для установления чистоты пиков компонентов применили отношение поглощений на различных длинах волн. Основа этого метода заключается в пропорциональности поглощения на различных длинах волн для чистого вещества:

$A_{\lambda 1} = K \cdot A_{\lambda 2}$ , где  $K$  – коэффициент пропорциональности или относительное поглощение.

Относительное поглощение для чистых веществ является постоянной величиной [12].

Была записана хроматограмма препарата в тех же условиях за исключением того, что было добавлено детектирование на длине волны 220. На протяжении всей хроматограммы построены кривые отношения поглощений на двух длинах волн ( $A_{200}/A_{220}$  и  $A_{240}/A_{220}$ ).

Зоны, соответствующие собираемым фракциям, изображены на рис. 11.

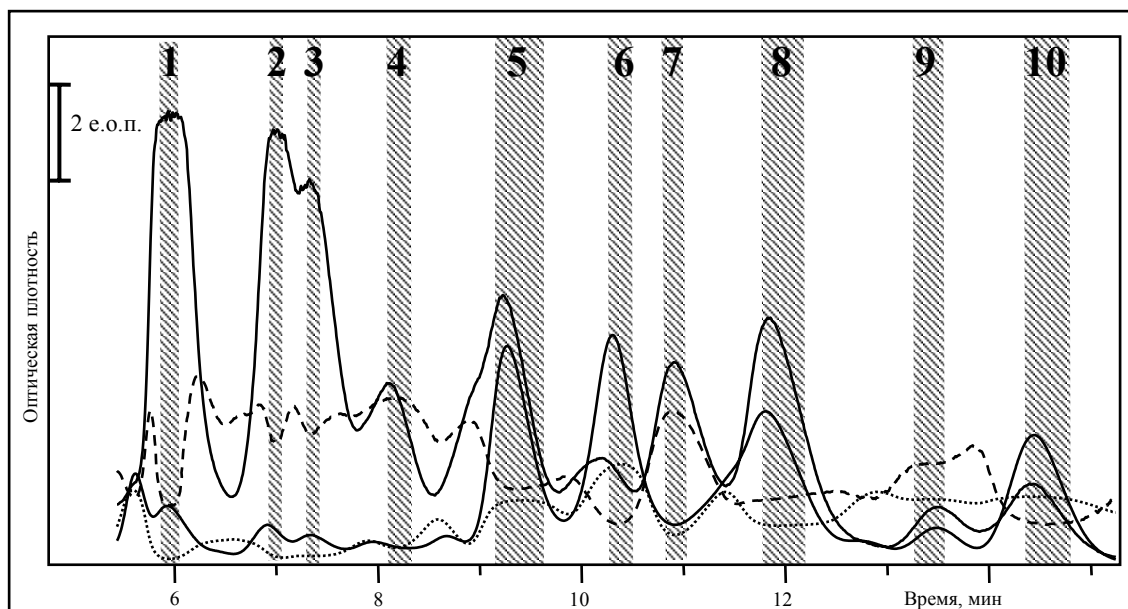


Рис.11: Зоны собираемых фракций (заштрихованы). Крупным пунктиром обозначены спектральные отношения  $A_{200}/A_{220}$ , мелким –  $A_{240}/A_{220}$ .

Было собрано 10 фракций.

Элюат собирали в пенициллиновые склянки, растворитель удаляли в вакууме водоструйного насоса установки микросинтеза (см. п. 4.2.2).

Сухой остаток растворяли в 200 мкл метанола

ИК – спектры компонентов получали на спектрофотометре "Vector - 22".

Раствор по каплям наносили на подложку из хлористого натрия, высушивая на воздухе, до образования плёнки сухого вещества. Полученные ИК – спектры приведены на рис. 12.

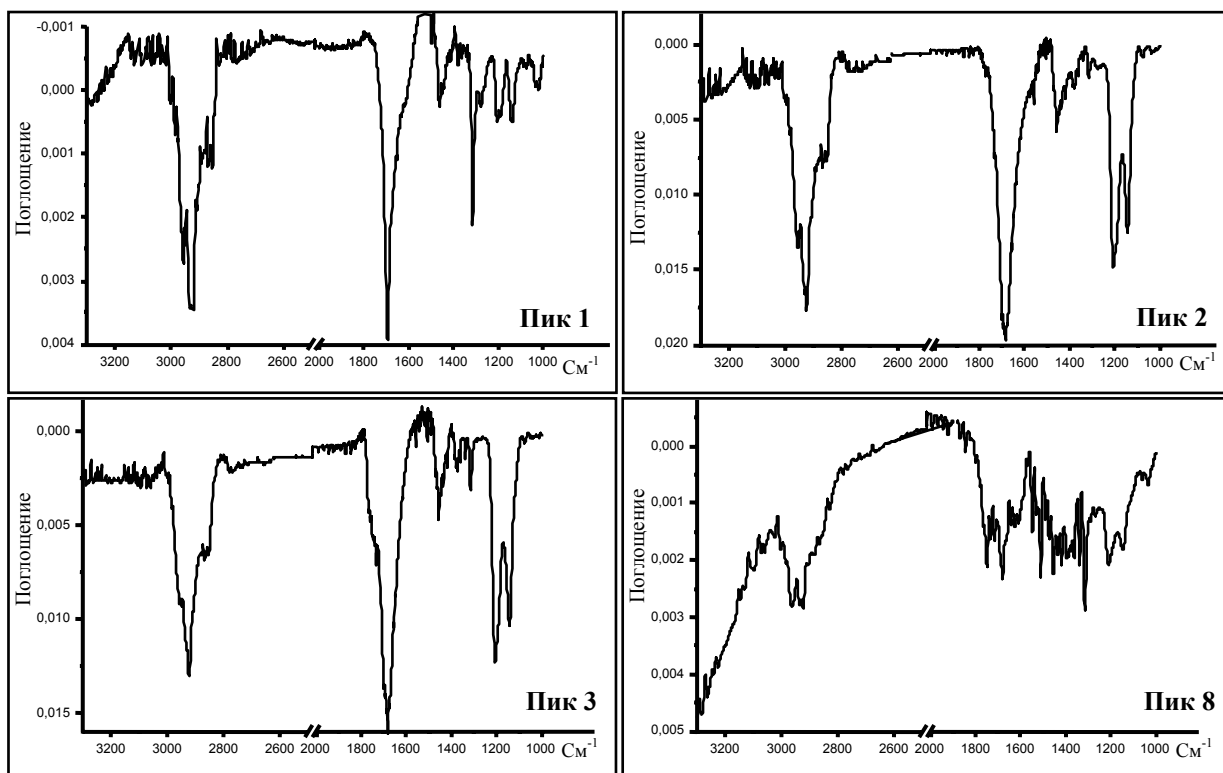


Рис.12: ИК – спектры основных компонентов

#### 4.4.4. Получение дополнительной информации о компонентах образца

##### 4.4.4.1. Идентификация некоторых компонентов методом стандарта

Провели хроматографирование препарата Силк (раствор в метаноле, 20 мг/мл), абиединовой и дегидроабиединовой кислот (раствор в метаноле, 0.5 мг/мл).

Условия:

Подвижная фаза: 0.05 М ТФУК - ацетонитрил (25:75);

Скорость потока: 200 мкл/мин;

Температура: 40°C.

Детектирование: многоволновое 190÷260 нм.

Результаты приведены на рис. 13.

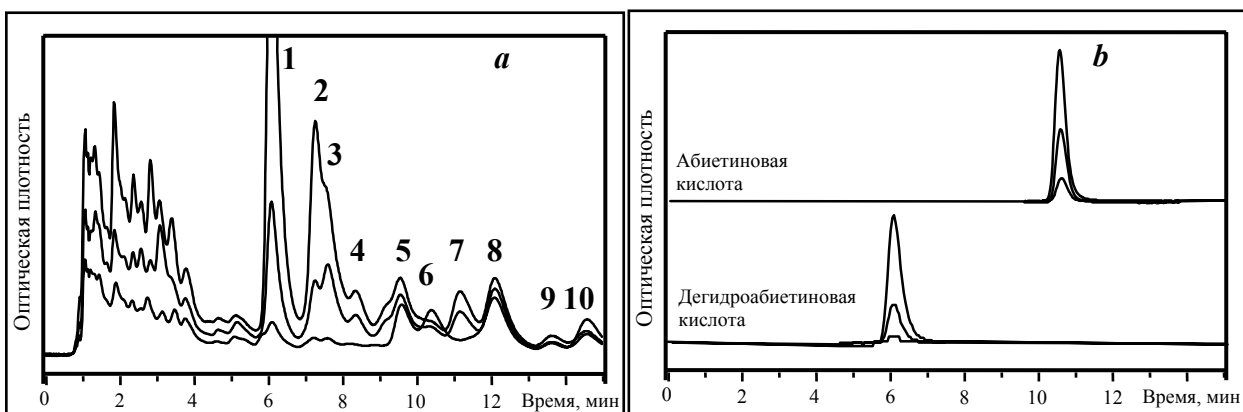


Рис.13: Хроматограммы: а - препарата Силк, b – абиетиновой и дегидроабиетиновой кислот

На хроматограмме препарата пик 1 соответствует дегидроабиетиновой кислоте, а пик 6 - абиетиновой, что подтверждают и спектральные данные (см. далее).

#### 4.4.4.2. УФ - спектроскопия

Для основных компонентов препарата, а так же абиетиновой и дегидроабиетиновой кислоты, построены нормированные на 210 нм спектры УФ – поглощения (рис. 14,15).

Из рисунков видно, что спектры абиетиновой и дегидроабиетиновой кислот идентичны спектрам пика 6 и пика 1 препарата Силк, соответственно.

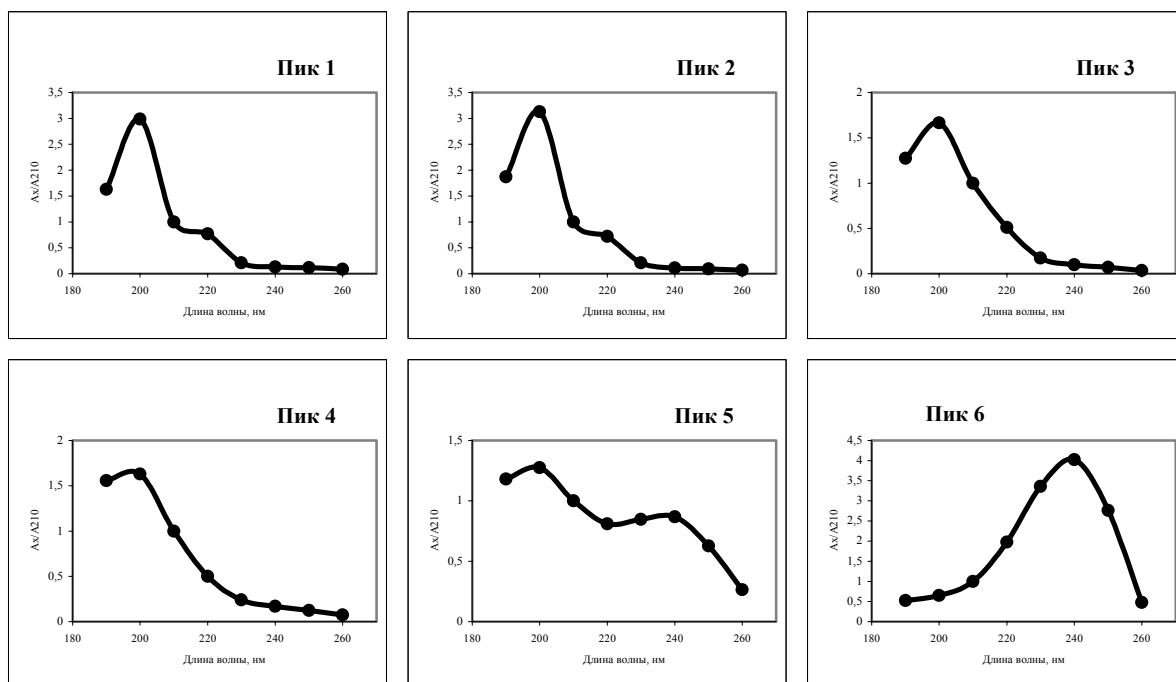


Рис.14: Нормированные на 210 нм спектры основных компонентов препарата Силк



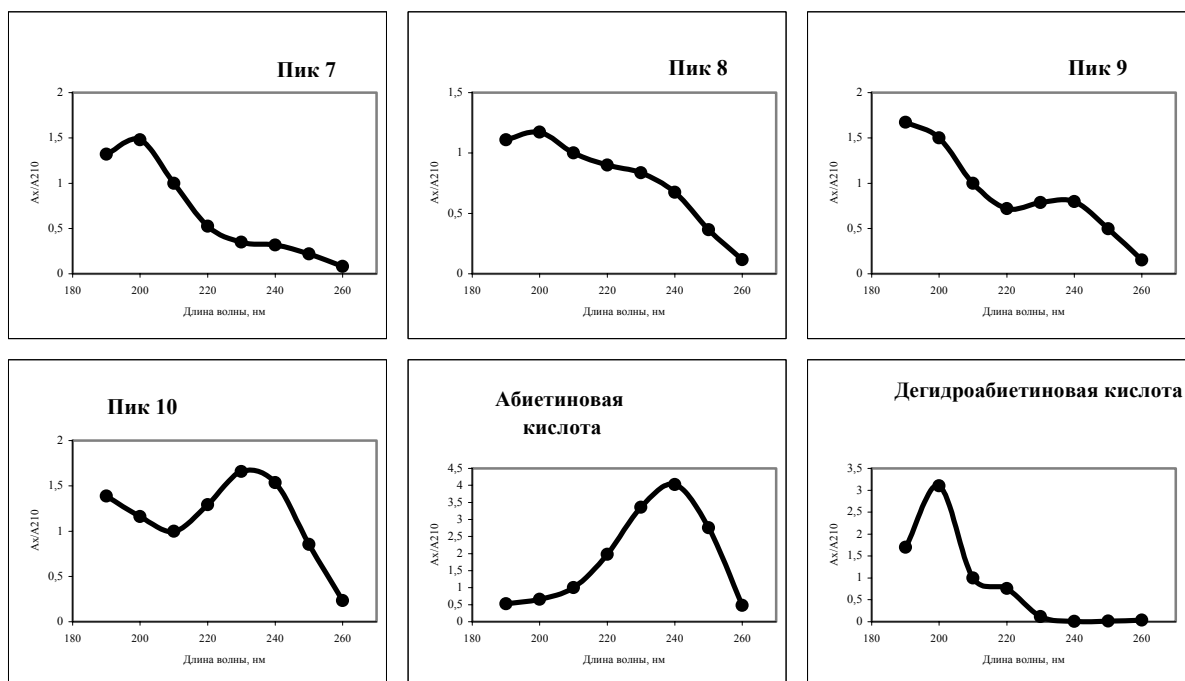


Рис.15: Нормированные на 210 нм спектры основных компонентов препарата Силк, дегидроабетиновой и абетиновой кислот

#### 4.4.4.3. Влияние pH элюента на удерживание компонентов

Для оценки влияния pH на удерживание и поглощение компонентов были выбраны модельные вещества (слабая кислота и слабое основание): бензойная кислота и *m*-нитроанилин. Провели хроматографирование этих веществ при различных значениях pH элюента. pH водного раствора устанавливали добавлением к раствору фосфорной кислоты раствора гидроксида калия, точное значение pH измеряли затем в элюате.

Подготовка пробы: к 20 мкл раствора бензойной кислоты и *m*-нитроанилина в метаноле (10 мг/мл) приливали 200 мкл ацетонитрила и 800 мкл буферного раствора.

Условия хроматографирования:

Подвижная фаза: водный раствор с заданным значением pH - ацетонитрил (80:20);

Скорость потока: 200 мкл/мин;

Температура: 35°C;

Детектирование: 200÷280 нм;

Концентрация 0.2 мг/мл, объем пробы 2 мкл.

Построены зависимости времени удерживания и относительного поглощения от pH элюента (рис. 16).

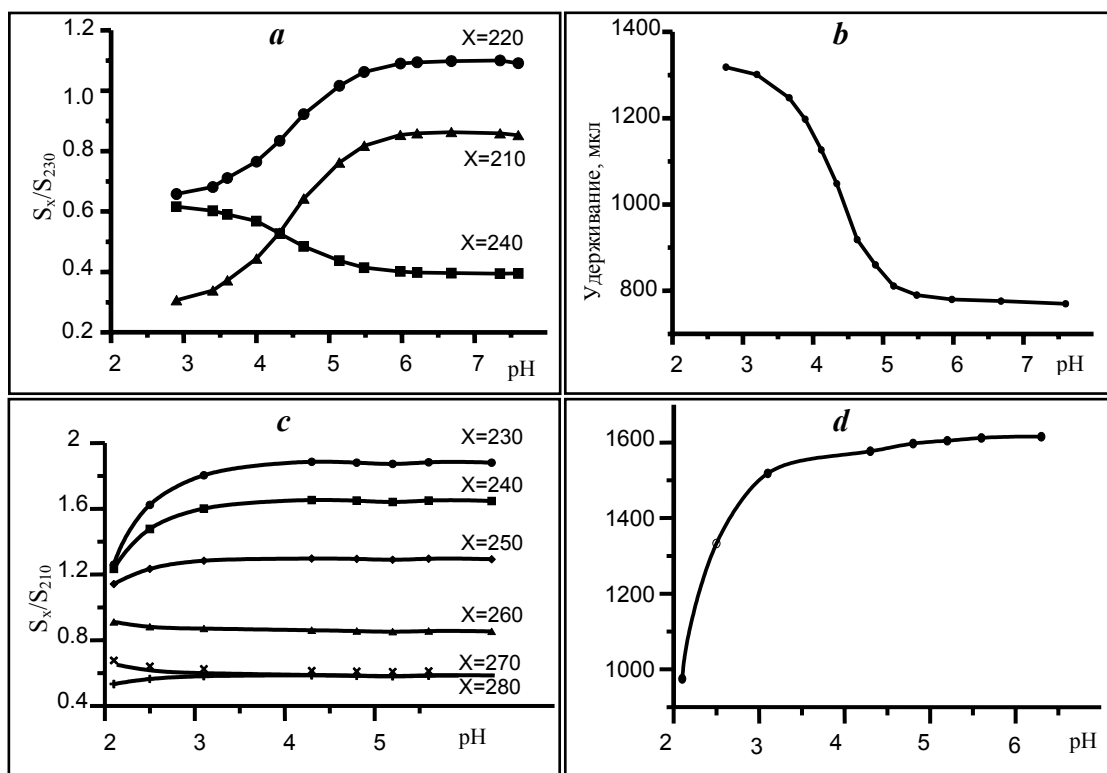


Рис.16: Изменение поглощения (*a* - бензойной кислоты, *c* - *m*-нитроанилина) и времени удерживания (*b* - бензойной кислоты, *d* - *m*-нитроанилина) при изменении pH элюента.  $S_x$  – площадь пика на длине волны  $X$ .

Аналогично провели хроматографирование препарата Силк.

Подготовка пробы: к 20 мкл раствора препарата в метаноле (200 мг/мл) приливали 285 мкл ацетонитрила и 95 мкл буферного раствора, взбалтывали и центрифугировали 3 минуты при скорости 10000 об/мин, для хроматографии отбирали надосадочную жидкость.

Условия хроматографирования:

Подвижная фаза: водный раствор фосфорной кислоты с заданным значением pH - ацетонитрил (25:75);

Скорость потока: 200 мкл/мин;

Температура: 40°C.

Детектирование: 200÷240 нм.

Концентрация 20 мг/мл, объем пробы 2 мкл.

Построили зависимость времени удерживания от pH для основных компонентов (рис. 17).

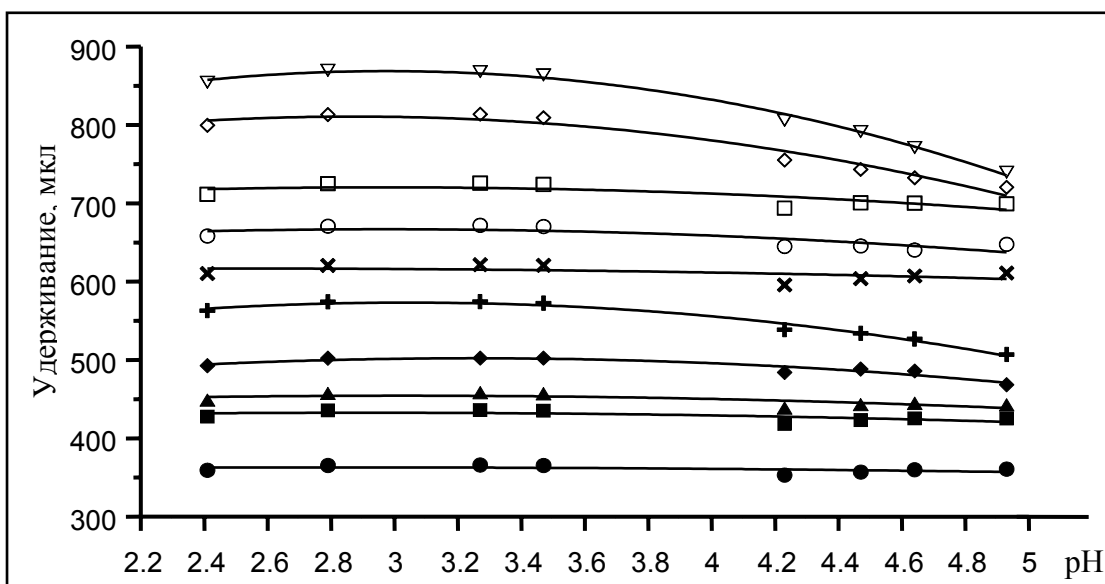


Рис.17: Зависимость удерживания основных компонентов препарата Силк от pH

(● – дегидроабетиновая кислота, ×- абетиновая кислота)

#### 4.4.4.4. Превращение свободных кислот в сложные эфиры

К 2 мл ацетона добавили 0,1 мл брома. После быстрого обесцвечивания в раствор при перемешивании засыпали 250 мг прокаленного поташа для удаления образовавшегося HBr. Для проведения реакции использовали 1 мл полученного раствора, в котором растворили 90 мг смеси терпеновых кислот. После добавления 0,14 мл триэтиламина наблюдали быстрое образование осадка гидробромида триэтиламина. Реакционную смесь выдержали 1 час при комнатной температуре и ночь в холодильнике при +5° С.

Полученный раствор разбавляли в 4 раза метанолом, центрифугировали 3 минуты при скорости 10000 об/мин, для хроматографии отбирали надосадочную жидкость.

Условия хроматографирования:

Подвижная фаза: 0.05 М водная ТФУК - ацетонитрил (25:75);

Скорость потока: 200 мкл/мин;

Температура: 40°С.

Детектирование: 200, 220, 240 нм.

В заданных условиях не все компоненты элюируются за время, которое позволяет использовать устройство хроматографа, для элюирования остальных компонентов провели повторное хроматографирование при нулевом объеме вводимой пробы.

Полученная хроматограмма приведена на рис 18 *b*.

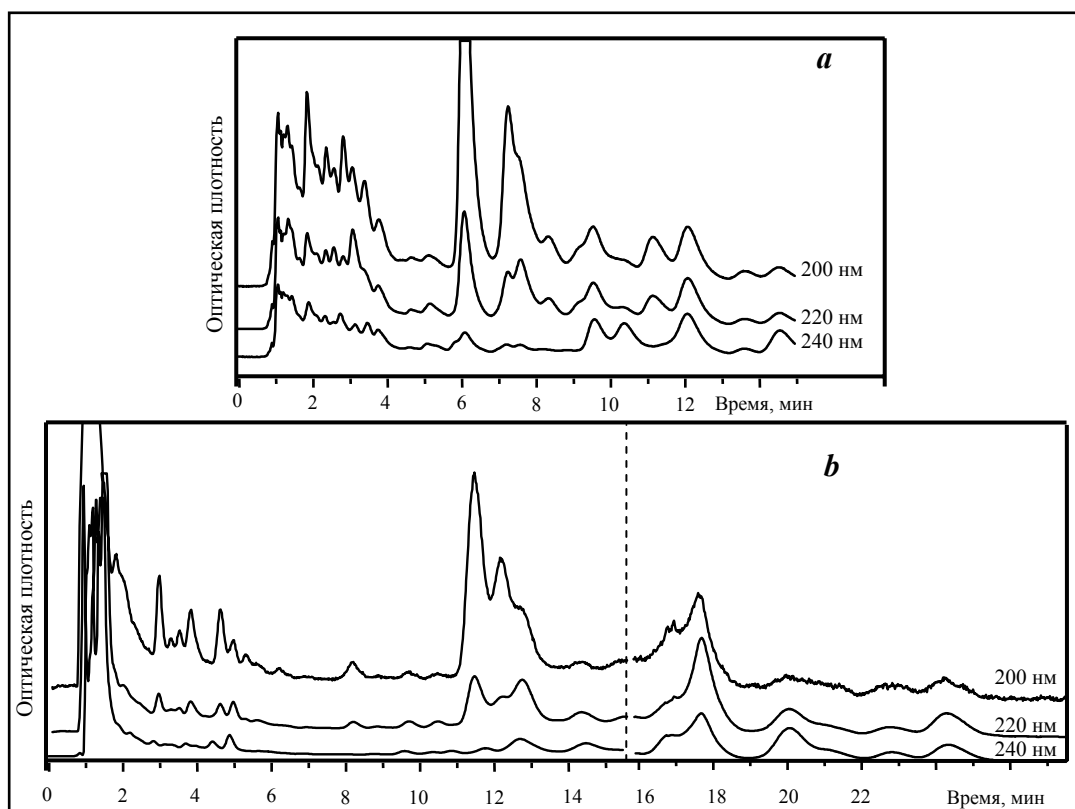


Рис.18: Сравнение хроматограмм до (a) и после (b) проведения реакции

## 5. Результаты и обсуждения

### 5.1. Сравнение литературного и экспериментальных ИК - спектров

В ходе работы оптимизированы условия для препаративного разделения компонентов сложной смеси. Получены ИК – спектры основных компонентов.

Для сравнения на рис. 19 приведён литературный спектр дегидроабиетиновой кислоты (пик 1) [13].

Видно, что данные, полученные нами (см. рис. 12 пик 1), и литературные хорошо согласуются. Отличие обусловлено только отсутствием водородных связей в полученном образце.

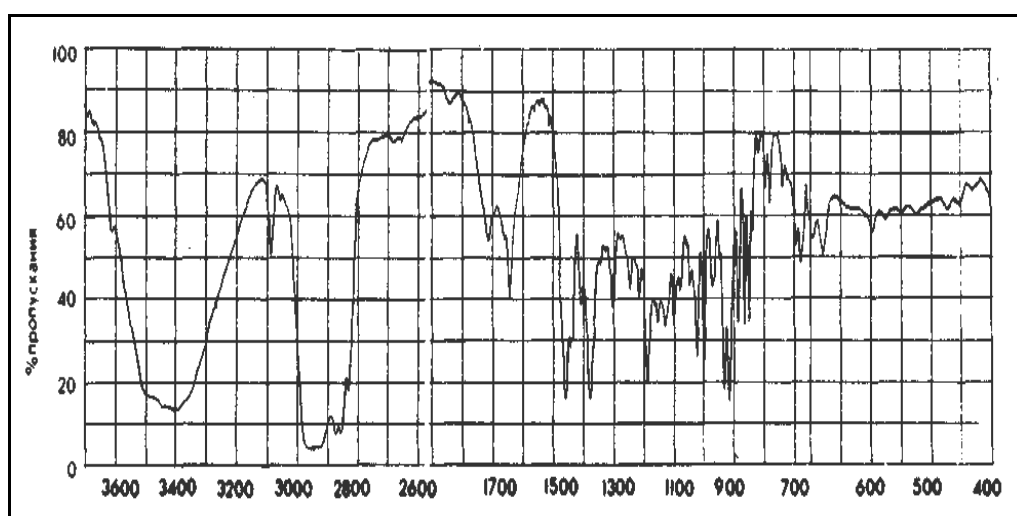


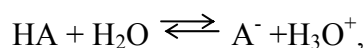
Рис. 19: ИК спектр дегидроабиетиновой кислоты, приведённый в литературе.

На спектрах (рис. 12) отчётливо видны полосы поглощения, отвечающие: карбоксильной группе ( $1700\text{ см}^{-1}$ ), сложным эфирам для пиков 3 и 8 ( $1750\text{ см}^{-1}$ ), эфирной и гидроксильной группам ( $1000\text{-}1200\text{ см}^{-1}$ ), а так же широкая полоса валентных колебаний C-H ( $2800\text{-}3000\text{ см}^{-1}$ ).

### 5.2. Зависимость удерживания и поглощения от pH

pH подвижной фазы влияет на удерживание в ЖХ только в том случае, если структура молекул образца зависит от pH, то есть молекулы образца могут существовать в протонированной и непротонированной форме и относительное содержание этих форм образца меняется с изменением pH.

Если образец является слабой кислотой, диссоциирующей в водной среде:



можно ожидать, что времена удерживания этих двух форм будут значительно различаться.

Константа диссоциации определяется как:

$$K_a = [A^-][H_3O^+]/[HA]$$

Соотношение концентраций различных форм:

$$r_A = [A^-]/[HA] = K_a/[H_3O^+]$$

или

$$\lg r_A = \lg K_a + pH = pH - pK_a$$

Из чего видно, что наибольших изменений можно ожидать вблизи  $pH = pK_a$

Если предположить, что скорости установления кислотно-основного равновесия достаточно велики, и процесс можно считать протекающим мгновенно, то можно записать уравнение для наблюдаемого коэффициента ёмкости:

$$k_{obs} = k_{HA} \frac{[HA]}{[HA] + [A^-]} + k_A \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} = \frac{k_{HA} + k_A \cdot 10^{(pH - pK_a)}}{1 + 10^{(pH - pK_a)}}$$

Аналогичные выводы действуют и для слабых оснований, в этом случае максимальное изменение наблюдается при  $pH = 14 - pK_b$  [14].

Изменение удерживания компонентов образца можно использовать для определения константы диссоциации, подобно титрованию.

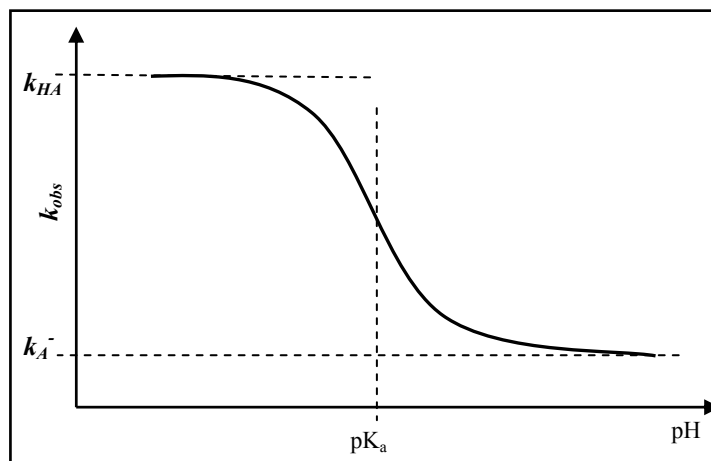


Рис.20. Зависимость наблюдаемого коэффициента ёмкости от pH для слабокислого соединения в условиях ОФЖХ.

Так же следует упомянуть о влиянии pH на УФ – поглощение, которое имеет место в том случае, если протонируемая группа непосредственно связана с хромофорной. Максимального изменения поглощения также следует ожидать вблизи  $pH = pK_a$ .

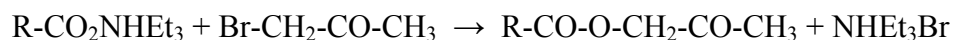
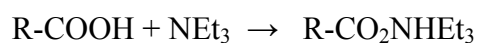
В случае если протонируемая группа удалена от хромофорной, поглощение останется неизменным.

Так, из рис. 16 следует, что для бензойной кислоты  $pK_a \approx 4.2$  (по литературным данным  $pK_a = 4.18$ ). Для *m*-нитроанилина  $pK_a \sim 2\div 3$  ( $pK_a = 14 - pK_b = 2.5$  [15]), установить точно эту величину невозможно в связи с тем, что сорбент, используемый в хроматографической колонке, работает в пределах pH элюента от 2 до 8. Также видно, что протонируемые группы в этих соединениях связаны с хромофором – бензольным кольцом.

Зависимость удерживания компонентов препарата Силк от pH (рис.17) показала, что основные компоненты являются слабыми кислотами, при этом абиетиновая и дегидроабиетиновая кислоты ( $pK_a = 6.4$  и  $5.7$  соответственно [16]) являются самыми слабыми. Незначительность изменения удерживания, вероятно, обусловлена большим размером молекул. Достичь в эксперименте значения pH, превышающего  $pK_a$  компонентов, не удалось в связи с тем, что при приближении к нему разделение компонентов заметно ухудшилось. По этой же причине не была получена зависимость УФ – поглощения от pH.

### 5.3. Подтверждение присутствия карбоновых кислот с помощью реакции дериватизации

Полагая, что превращение карбоновых кислот в сложные эфиры приведет к возрастанию времени удерживания, и такой результат позволит однозначно определить кислые компоненты в смеси, провели реакцию этерификации.



Присутствие в структурах компонентов карбоксильной группы так же подтверждает и хроматограмма препарата после реакции этерификации (рис.18). На хроматограмме видно, что времена удерживания компонентов увеличились на 6-10 минут, чего и следовало ожидать.

## 6. Выводы:

1. Разработана методология выделения отдельных компонентов сложных образцов с помощью ВЭЖХ при предельно допустимых нагрузках на колонку. Для трёх модельных веществ (пентаметилдифенил, дегидроабиетиновая кислота, ибупрофен) определены зависимости эффективности колонки  $\varnothing 2\text{мм}\times 75\text{ мм}$  с обращённой фазой от нагрузки на колонку, скорости потока элюента и температуры колонки.

2. Разработана методика сбора фракций элюата объёмом от 5 мкл и более с оценкой гомогенности собираемого раствора по отношению к компоненту, используя характерные отношения оптических поглощений при разных длинах волн.

3. В режиме допустимой перегрузки колонки из 4 мг препарата Силк выделены четыре вещества, для которых получены ИК – спектры, пригодные для установления структуры входящих в эти вещества функциональных групп.

4. Методом аналитической обращённо-фазовой ВЭЖХ при разных рН элюента в образце Силк выявлены кислоты  $pK_a$  которых меньше 6.



## 7. Используемая литература:

1. Друганов А.Г., Ралдугин, В.А., Шакиров, М.М., и др. Идентификация компонентов кислой части экстракта хвои пихты сибирской с использованием препаративной микроколоночной ВЭЖХ, спектроскопии ЯМР и масс-спектрометрии // Химия в интересах устойчивого развития. – 2000. – т. 8 № 5. – С. 699-704.
2. Исаев, Р. Масс-спектрометрия и её применение - Барнаул: изд. Алт. Ун-та, 1990. – 2 с.
3. Thermo Electron Corporation. Официальный сайт. - Thermo Electron Corporation, 2005. - Режим доступа: <http://www.thermo.com>
4. Varian Inc. Scientific Instruments, Vacuum Products and EMS. Официальный сайт. - Varian, Inc, 2005. - Режим доступа: <http://www.varianinc.com>.
5. Лизогуб, А.П. Спектральный анализ в органической химии. - Киев: Техніка, 1964. - 9с.
6. Алесковский, В.Б. Физико-химические методы анализа: учебное пособие для хим. и хим.-технол. спец. вузов. - Ленинград: Химия, 1988. - 185 с.
7. Кесслер, И. Методы инфракрасной спектроскопии в химическом анализе. - М.: Мир, 1964. – 15 с.
8. Стыскин, Е.Л., Ициксон, Л.Б., Брауде, Е.В. Практическая высокоэффективная жидкостная хроматография. - М.: Химия, 1986. – 59 с.
9. Препаративная жидкостная хроматография / Бидлингмейгер, Б., Фрайд, Б., Хегнауер и др. - М.: Мир, 1990. - 10 с.
10. Руденко, Б.А., Руденко, Г.И. Высокоэффективные хроматографические процессы. - М.: Наука, 2003. – 5 с.
11. Хроматограф жидкостный микроколоночный «МИЛИХРОМ А-02»: Руководство по эксплуатации: ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова» - Новосибирск, 2003. – 55 с.
12. Хубер, Л. Применение диодно-матричного детектирования в ВЭЖХ, М.: Мир. - 1993. 76 с.
13. Атлас спектров природных соединений и их аналогов / Коптюг, В.А., Коробейничева, И.К., Резвухин, А.И., Подгорная, М.И.; вып. 1, Новосибирск: НИОХ СО АН СССР. – 1978. 173 с.
14. Схунмакерс, П. Оптимизация селективности в хроматографии: пер. с англ. - М.: Мир, 1989. - 89 с.
15. Справочник химика: В 3 т. – Л.: Химия. Ленингр. отд-ние, 1963. Т. 3. – 86 с.

16. Nyzen, V., Back, E. The ionization constant, solubility product and solubility of abietic and dehydroabietic acid // *Acta Chemica Scandinavica*. - 1958. - V12 № 7, P. 1516-1520.