Новосибирский государственный университет
Факультет естественных наук
Кафедра аналитической химии

Курсовая работа.

Тема: Микропрепаративный подход к идентификации компонентов кислой части экстракта хвои пихты сибирской с применением микроколоночной ВЭЖХ.

Выполнила студентка
НГУ ФЕН гр. 0407
Дементьева Таисия Анатольевна

Научный руководитель
Друганов Александр Георгиевич

Новосибирск - 2004

Содержание

1.	Введение……	3
2.	Хвойные лева как источник биологически активных веществ……...	3
3.	Краткая характеристика препарата Силк (Новосил).....	4
4.	Способы тестирования препарата Силк (Новосил).....	4
5.	Особенности препаративного и аналитического хроматографического	6
6.	разделения ……	6
7.	Принципы препаративной ЖХ ……..	7
8.	Нагрузка на колонку……	7
9.	Качественная модель нагрузки……..……	8
10.	Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой ……..	9
11.	Препаративная ЖХ на аналитических хроматографах ……...	11
12.	Используемое в работе оборудование ……..	12
13.	Экспериментальная часть……	14
14.	Результаты и обсуждение ……...	15
15.	Выводы …….	16
16.	Литература ……...	16
	ПРИЛОЖЕНИЕ	18

Введение

Экстракты из природных объектов всегда являются сложными смесями органических веществ. При последующем изучении их биологической активности важно знать как можно полнее структуры компонентов смеси. Такая работа невозможна без выполнения больших объемов хроматографических работ, которые обычно требуют разных условий. Существенным ускоряющим фактором таких работ является эффективный перенос информации от одной стадии хроматографической работы к следующей. В нашем случае была известна идентификация терпеновых кислот в кислой части экстракта хвои пихты сибирской при разделении этой смеси на обращенной фазе в системе элюентов вода-метанол-кислота, экстрагент - метилтретбутиловый эфир. В ходе настоящей работы мы оптимизировали разделение этих кислот в другой системе "вода - ацетонитрил - кислота". Необходимость такого перебора систем связана с многокомпонентностью и практической важностью смеси терпеновых кислот.

Тритерпеновые кислоты близки по своему строению, и при работе на колонке с эффективностью в 5000 т.т. не удается добиться их полного разделения. Задачу осложняет так же и наложение пиков присутствующих дитерпеновых кислот.

Перенос данных о строении разделяемых веществ с метанольной системы на ацетонитрильную требовал, естественно, наличия чистых веществ. Строго говоря, требуемое для идентификации количество веществ не превышает их количество, выходящее в элюируемой зоне на колонке аналитического хроматографа, т.е. несколько микрограммов. Нам не известны методики, позволяющие работать с аналитическими количествами веществ для описанных выше целей. Большее количество вещества вполне возможно получить при использовании аналитического хроматографа, как микропрепаративного, накапливая вещество при повторении разделения. При этом достигается предельно возможное разделение компонентов, а так же отпадает необходимость поиска препаративного хроматографа со всеми вытекающими материальными и экономическими последствиями.

Хвойные леса как источник биологически активных веществ

Пихта сибирская (*Abies sibirica Ldb.*) является одной из основных пород лесов Западной Сибири и Алтая. Хвойные леса обладают санирующим действием на окружающий воздух. Ещё в начале 20-го века было известно, что пихта содержит эфирное масло, обладающее бактерицидными действиями. Показано, что ветки пихты очищают воздух от стрептококка и коклюшной палочки [1,2].

Основным продуктом переработки хвои пихты сибирской являются эфирные масла. Технология получения пихтового масла очень проста и осуществляется даже на лесных делянках.

Состав древесной зелени сложен. Остаток после отгонки пихтового масла представляет собой ценную смесь биологически активных веществ. При последовательном экстрагировании сырья жидкой углекислотой, водой и этиловым спиртом были выделены такие вещества, как моно- и олигосахариды, фенольные соединения, липиды, аминокислоты, витамины, моно-, сескви-, ди-, тритерпеноиды, полипренолы, мальтол [3-7].

На данный момент существует ряд патентов на способы выделения биологически активной суммы тритерпеновых кислот из древесной зелени хвойных деревьев [8-12]. Препарат получил государственную регистрацию под названием «*Силк*» и «*Новосил*» и рекомендован для применения на пшенице, картофеле и других сельскохозяйственных культурах.

Краткая характеристика препарата Силк (Новосил)

Силк (*Новосил*) – препарат нового поколения средств защиты растений с чётко выраженным фунгицидным и ростостимулирующим эффектом. Действующим веществом является природная сумма тритерпеновых кислот, выделенная из экстракта хвои пихты сибирской. Химическая формула C_{30} $H_{46\text{-}48}O_4$. *Силк* способен в малых концентрациях вызывать заметные ростовые эффекты во всех органах растения.

Физиологическая активность тритерпеновых кислот проявляется в выведении семян из глубокого покоя и стимуляции их прорастания за счёт инициации растяжения клеток в корне, колеоптиле, а затем в стеблях и листьях. Терпеноиды положительно воздействуют на процесс фотосинтеза в растениях, повышая фотохимическую активность хлоропластов и увеличивая интенсивность фотосинтетического фосфорилирования. Они также значительно усиливают транспирацию, регулируя открывание устьиц.

Препарат стимулирует устойчивость растений к абиотическим стрессам и грибным заболеваниям, что, вероятно, связано с ростом образования в клетках антистрессовых белков и других компонентов системы фитоиммунитета. Показано его действие в условиях жестокой засухи. Также после применения препарата наблюдается улучшение качества выращениых растений (увеличение накопления витаминов, усиливание сахаристости / масляничности, сокращение кислотности и количества нитратов).

Совмещается с известными гербицидами и фунгицидами. Не токсичен для теплокровных и не оказывает местного и кожно-резорбтивного действия. Относится к пестицидам IV класса опасности [13].

Способы тестирования препарата Силк (Новосил)

Как уже было отмечено, препарат *Силк* (*Новосил*) представляет собой сложную смесь тритерпеновых кислот, причём многие из них существуют в различных таутомерных формах и имеют множество изомеров. Определение состава таких смесей, тем более, что это смеси высокомолекулярных соединений, представляет особую сложность. Для анализа подобных смесей применим только метод жидкостной хроматографии с привлечением для идентификации разделённых компонентов спектральных методов и рентгено-структурного анализа [14,15].

В литературе описан метод определения состава *Силка* с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии на микроколоночном хроматографе «Млихром». Хроматографирование проводилось на колонке 64×2 мм с обогреваемой рубашкой (30°С) и обращёно-фазовым сорбентом LiChrosorbRP-18 с размером частиц 5 мкм. В качестве элюента использовалась смесь метанола с 0,05 М водной фосфорной кислотой в отношении 85:15 по объёму. Скорость элюирования 100мкл/мин. Детекция двухволновая - при длинах волн 200 и 240 нм. Концентрация анализируемого раствора 12 мг/ мл в метаноле. Объём вводимой в колонку пробы 1.4 мкл.

При анализе *Силка* в указанных условиях получается довольно характерная хроматограмма, состоящая из 8 пиков.

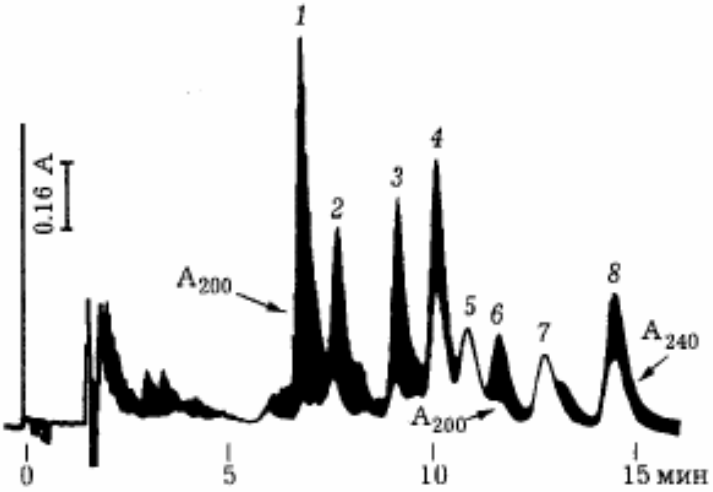
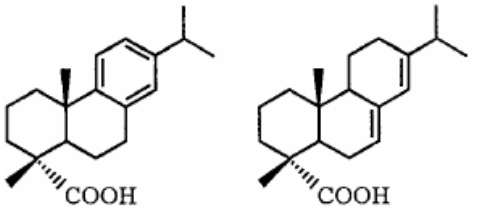
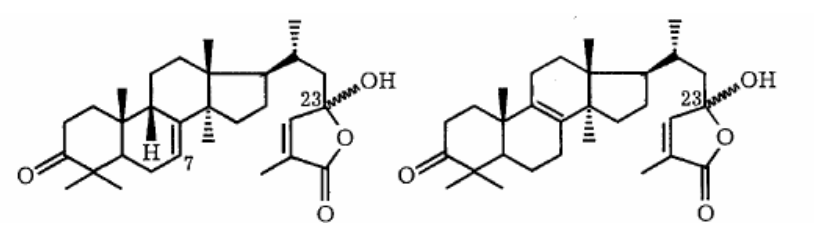


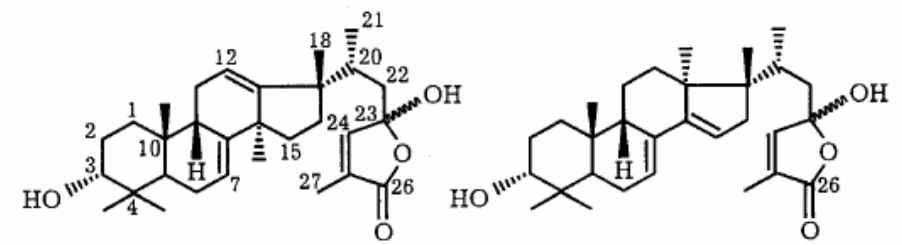
Рис. 1. Хроматограмма препарата Силк. Пик 1 соответствует лактолу 1, пик 2 - дегидроабиетиновой кислоте и совпадает с пиком лактола 2, пики 3 и 4 отвечают лактолам 3 и 4 соответственно, которые находятся в виде неразделимых в данных условиях пар эпимеров по атому С23, пик 5 – кислоте 5, пик 6 – абиетиновая кислота, пик 7 – смесь компонентов, пик 8 - кислота 6.



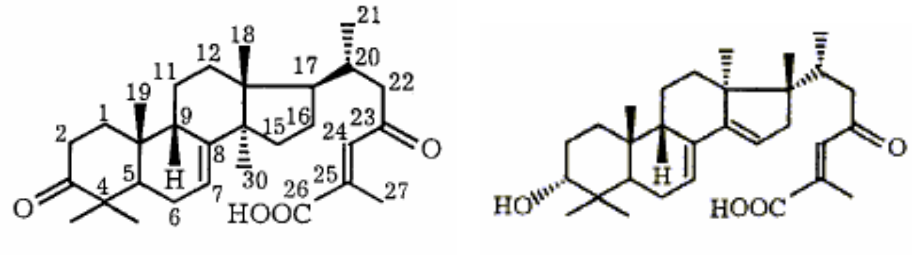
Дегидроабиетиновая и абиетиновая кислоты.



Лактолы 1 и 2 - изомеры



Лактолы 3 и 4



Кислота 5 Кислота 6

Разработанная методика используется для контроля качества выпускаемого *Силка*. При этом хроматограмы полученных продуктов сравниваются с образцовой хроматограммой, приведенной в технических условиях. Идентифицировать тритерпеновые кислоты в смеси методом добавок, как это обычно принято, невозможно из-за их малой доступности, но можно добавлять в смесь абиетиновую и дегидроабиетиновую кислоты, которые вполне доступны, и по относительным временам удерживания идентифицировать остальные компоненты.

Целью работы является поиск новых подходов для анализа смеси тритерпеновых кислот. В данной работе рассматривается разделение препарата *Силк* (*Новосил*) в смеси элюентов ацетонитрил–вода-кислота с последующей идентификацией некоторых из полученных компонентов по отработанной ранее методике в смеси элюентов метанол–вода–кислота. Работа выполнялась на высокоэффективном жидкостном микроколоночном хроматографе “Милихром А-02”.

Особенности препаративного и аналитического хроматографического разделения

Целью любого хроматографического разделения является анализ или препаративное выделение компонентов с последующим анализом или использованием. Аналитическое и препаративное разделения отличаются по своим целям даже в том случае, если выполняются в одном и том же масштабе. Обычно аналитическую ЖХ используют для получения качественной или количественной информации о данном образце, после разделения компоненты которого обычно отбрасываются. Препаративная жидкостная хроматография (ЖХ) ориентированна на выделение, обогащение или очистку одного или большего числа компонентов образца, которые собирают для дальнейшего использования. В этом случае при помощи детекторов, следя за процессом, делают заключение о том, как фракционировать поток элюента.

Таблица 1. 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: ≤100мг Препаративная: 0,1 – 100г Макропрепаративная: ≥0,1кг
Нагрузка на колонку	Как можно меньшая, обычно 10^{-10} – 10^{-3}г образца на 1г насадки	Как можно большая, обычно 0,001 – 0,1г образца на 1г 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	Необходим. Высокая чувствительность и широкий динамический диапазон	Желателен для анализа фракций «он-лайн» или «офф-лайн», необходим дополнительный диапазон измерения при низкой чувствительности
Назначение образца	Обычно образец сбрасывают вместе с подвижной фазой	Фракции образца собирают, подвижная фаза может быть возвращена в процесс

Принципы препаративной ЖХ

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

Понятие “чистота” является относительным. Требования к чистоте обуславливаются дальнейшим использованием выделенного материала.

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 так же 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 многоцикловому разделению.

Трудности разделения могут возрастать в зависимости от сложности образца, числа компонентов, степени близости их свойств.

Факторы времени и стоимости так же являются чрезвычайно важными факторами при планировании разделения.

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

1. Каждый компонент, подлежащий хроматографированию, должен быть в растворе подходящего состава растворителя и в необходимой концентрации.
2. Методы, используемые для переведения образца в раствор и удаления нерастворимой части, могут одновременно исключать 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, может появиться необходимость применения других приёмов. Эта особенность препаративного разделения часто не принимается во внимание.

Нагрузка на колонку

Главный вопрос возникающий при планировании ЖХ разделении - какое количество образца можно загрузить в хроматографическую систему и всё-таки получить требуемое разделение?

Часто хроматографическую систему отклоняют как “перегруженную”, когда уровень нагрузки превосходит область, в которой эффективность перестаёт быть математически предсказуемой, изотерма адсорбции становится нелинейной, и уравнения перестают адекватно описывать негауссовы формы пиков. Тем не менее, в этих условиях и при этих препятствиях, можно успешно разделять компоненты образца, следуя определённым практическим правилам.

Наиболее практическим применимым определением перегрузки служит нагрузка, которая больше не позволяет выделить продукт с требуемой чистотой или степенью извлечения.

Задолго до того, как был введён коэффициент разделения и предложен его расчёт, в 40-х гг. аналитики методом проб и ошибок установили эмпирические положения, которые достаточно хорошо согласуются с нагрузками, предложенными в 60-х гг. на основе линейных изотерм адсорбции и стандартизации адсорбента. Во втором случае величина нагрузки зависит от таких параметров как: коэффициент разделения, сложность разделения, метод и масса адсорбента, которые влияют на эффективность. Таким образом, любые рекомендации, опубликованные для удобства аналитика, и есть “основные положения”. При этом нужно учитывать, что структура и свойства молекул, характер их взаимодействий с подвижной и неподвижной фазами в присутствии других компонентов образца, геометрия и свойства активных фаз (особенно их взаимодействие с молекулами растворителя), их активность, величина поверхности адсорбента, размер его пор и т.д. наряду с другими аспектами являются критическими для определения оптимального размера образца, при котором достигается максимальный выход в препаративной ЖХ. Эксперимент всё ещё служит лучшим путём определения, какую нагрузку следует выбрать в данной ситуации.

Качественная модель нагрузки

Хроматография – динамический процесс, поскольку одна или две распределяющиеся фазы находятся в движении. Концепцию динамического равновесия трудно понять математически или представить себе мысленно, поэтому часто проще сделать приближение путём “моментальных снимков” различных стадий и затем объединить их в модель, представляющий весь процесс.

Каждая молекула соединения, имеющая коэффициент массового распределения между подвижной и неподвижной фазой больше нуля, часть времени своего пребывания в хроматографическом слое проводит в адсорбированном состоянии на неподвижной фазе. Молекулы другого типа в зависимости от относительной величины их взаимодействия с неподвижной и подвижной фазами будут проводить больше или меньше времени в неподвижной фазе. Это взаимодействие может быть химическим, механическим или электрическим по природе, или же комбинированным. Различие в силах притяжения адсорбентом двух различных типов чрезвычайно мало, однако абсолютная величина взаимодействия достаточно велика. Поэтому, для того, чтобы одна молекула селективно удержалась и таким образом отделилась от другой при её прохождении через хроматографический слой, она должна переходить на поверхность адсорбента и подвижную фазу, туда и обратно много раз, с тем, что бы очень малое различие в перемещениях масс для каждого типа молекулы, многократно умноженное, привело к значительному различию в измеряемых временах удерживания. При рассмотрении модели, содержащей большое число молекул (в одном грамме образца может содержаться порядка 10^{21} молекул), требуется учитывать статистические факторы (кинетика) и эффекты, связанные с объёмными свойствами (термодинамика), чтобы объяснить сложные взаимодействия и конкуренцию между молекулами и механизм хроматографического процесса.

Введение порции молекул в слой адсорбента вызывает первоначально хаос, и требует время и пространство для того, чтобы молекулы рассортировались. Молекулы образца и элюента соревнуются за доступные активные места на поверхности. Продвигаясь по путям наименьшего сопротивления (пусть и извилистым), они обходят некоторые адсорбционные места для того, чтобы занять другие, и, в общем, не используют всю доступную им поверхность. Для того чтобы достичь равновесного распределения между неподвижной и подвижной фазами для определённого количества вещества, введённого с заданной концентрацией, требуется определённый объём слоя адсорбента. Это объём слоя фактически является первоначальным определением «хроматографической тарелки».

В случаях, когда размер образца очень мал (аналитические нагрузки), определяют собственную, “врождённую” эффективность колонки, которая определяется не размером образца, а механическими параметрами, такими, как размер частиц, метод заполнения, конструкция колонки. Но в препаративной ЖХ размер тарелки принципиально определяется количеством и концентрацией образца, введённого в слой.

К сожалению, очень трудно получить точные численные значения размеров тарелки при вводе пробы в препаративной ЖХ. При прохождении молекул образца через слой в колонке размер первоначально полосы всегда только увеличивается из-за различных механизмов размывания полосы. Поэтому, когда компоненты образца разделяются на индивидуальные, часто перекрываясь и давая более широкие зоны, первоначальный объём тарелки невозможно измерить.

Почти всегда для того чтобы добиться действительно максимального выхода, следует проводить эксперименты при нагрузках, превышающих аналитические условия.

Соотношение между параметрами разделения и нагрузкой

1. Нагрузка и коэффициент разделения

На рис.2. графически представлено соотношение между коэффициентом селективности α и коэффициентом разделения.

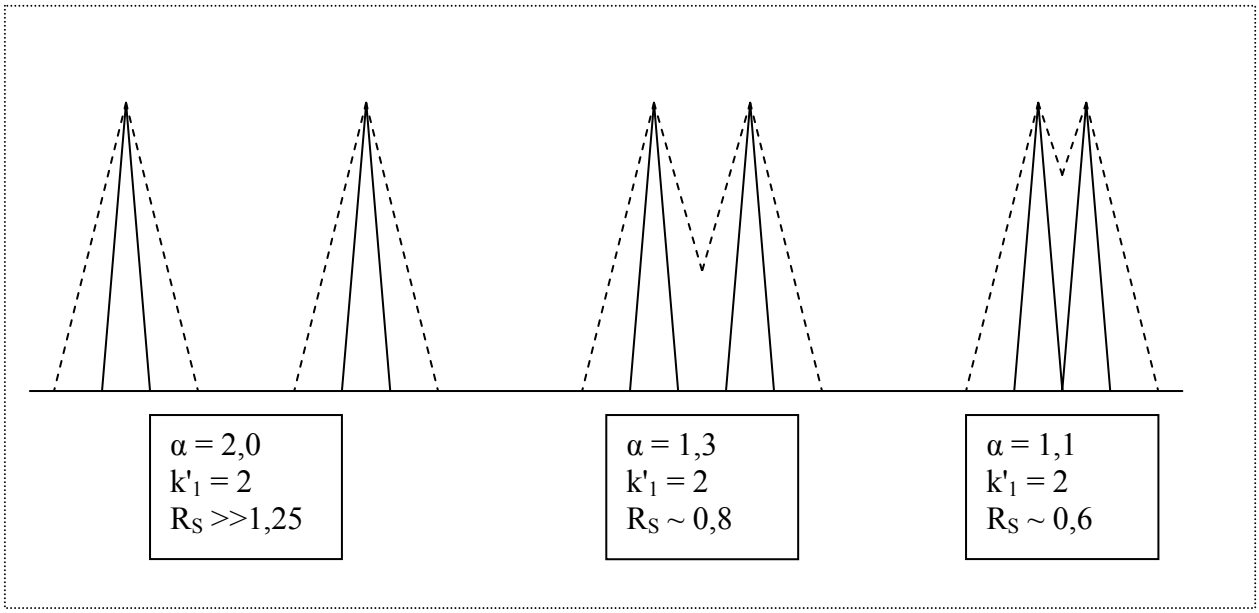


Рис.1. Соотношение между коэффициентом α и коэффициенотм разделения. Треугольники, изображённые сплошными линиями, показывают пики при малых нагрузках, штриховыми линиями – наблюдаемое разрешение пиков в тех же условиях, но увеличенной в 10 раз нагрузкой. Приблизительные значения разрешения соответствуют 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 α, нагрузка может быть многократно увеличена. Или же наоборот, сохраняя постоянную нагрузку, можно сократить затраты на насадку и растворители, и сберечь время, необходимое для завершения разделения.

2. Нагрузка и эффективность

Как говорилось выше, в препаративной хроматографии используют два типа эффективности: собственную эффективность колонки, которая определяется динамическими и гидродинамическими свойствами упакованного слоя, конструкцией аппаратуры, свойствами материала насадки 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 нагрузках и больших значениях коэффициента разделения 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.

Оба типа эффективности иллюстрируются данными, представленными на рис. 3. Общий вид этих зависимостей был предсказан ещё Дж. Л. Уотерсом в начале 70-х гг., до их экспериментального получения [18].

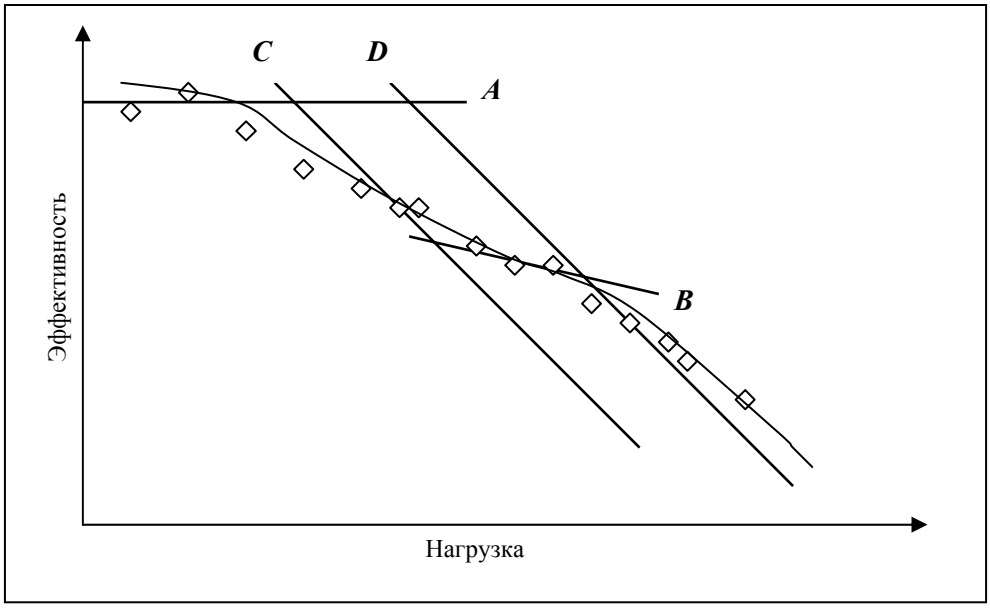


Рис.3. Общий вид снижения эффективности с увеличением нагрузки

Линия *A* на рисунке соответствует собственной эффективности колонки. Увеличение вводимого в колонку количества образца, приводит сначала к медленному, а затем более быстрому уменьшению эффективности с линейной скоростью (обозначено линией *C*).

Данные, приведённые на рисунке, также позволяют сопоставить эффект объёмной перегрузки с массовой перегрузкой. Следует отметить, что в аналитической ЖХ имеют дело с очень разбавленными растворами, при этом не возникает необходимости в данных понятиях. 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.

Эффект объёма образца на рисунке может объяснить плато, обозначенное линией B. В данном случае используются обозначения: *C* и *D* – линии меньшей и большей нагрузки соответственно.

3. Нагрузка и время удерживания

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 разделения (*k’*) растворённого вещества между неподвижной и подвижной фазами

$$k' = \frac{\textit{количество компонента в неподвидной фазе}}{\textit{количество компонента в подвижной фазе}}$$

определяет отношение объёма ко времени, требуемому для элюирования этого растворённого вещества из хроматографического слоя.

При оптимизации коэффициента селективности α 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.

Препаративная ЖХ на аналитических хроматографах

Аналитические колонки позволяют разделять количества вещества не больше миллиграммовых из-за малой ёмкости таких систем. Тем не менее в литературе приводятся методики, в которых повышения эффективности и ёмкости системы добиваются путём последовательного соединения нескольких колонок, использования циркуляции, а так же последовательным разделением сначала на несколько больших фракций с последующим разделением их на более мелкие [19,20].

На данный момент существует ряд математических моделей, позволяющих с достаточной точностью описать процессы, возникающие при различных условиях хроматографирования [21]. Использования специализированных компьютерных программ, содержащих эти модели, облегчает оптимизацию системы, что позволяет сократить издержки при крупномасштабном разделении. Тем не менее такой подход мало применим в лабораторных исследованиях, так как требует большого количества информации, часто не доступной, особенно в случае сложных смесей и смесей неизвестного состава.

Примером таких смесей является исследуемая в данной работе сумма тритерпеновых кислот, выделяемая из древесной зелени пихты сибирской (*Abies sibirica*).

Используемое в работе оборудование

Микропрепаративное разделение проводилось на высокоэффективном микроколоночном хроматографе “Милихром А-02” [16]. Одной из проблем при работе на жидкостных хроматографах со спектрофотометрическим детектором является появление пузырьков воздуха в кювете детектора как следствие применения недегазированных элюентов, что проявляется в виде выбросов весьма значительной амплитуды и переменной полярности, либо в значительном дрейфе нулевой линии детектора. И то и другое затрудняет или исключает возможность получения достоверных результатов. Значительно облегчает проблему борьбы с пузырьками клапан противодавления, подключаемый к выходу рабочей кюветы. Клапан имеет значительное сопротивление (порядка 2-3 атмосфер) протеканию жидкости через него, которое практически не зависит от скорости её течения. Дополнительное давление препятствует возникновение пузырьков в кювете.

Применение такого клапана для сбора разделённых компонентов при препаративном разделении невозможно в связи с тем, что при этом возникают большие погрешности сбора фракций. В данной работе использовалось специальное приспособление, которое также позволяет создавать дополнительное давление.

Схематическое изображение этого приспособления изображено на рис. 4.

В этом случае сопротивление создаётся за счёт передавливания капилляра винтом. Устройство подсоединяется к выходу рабочей кюветы через конус. В ходе работы необходимое давление подбирается вручную подкручиванием винта.

Внутренний объём такой системы составляет около 2,5 мкл.

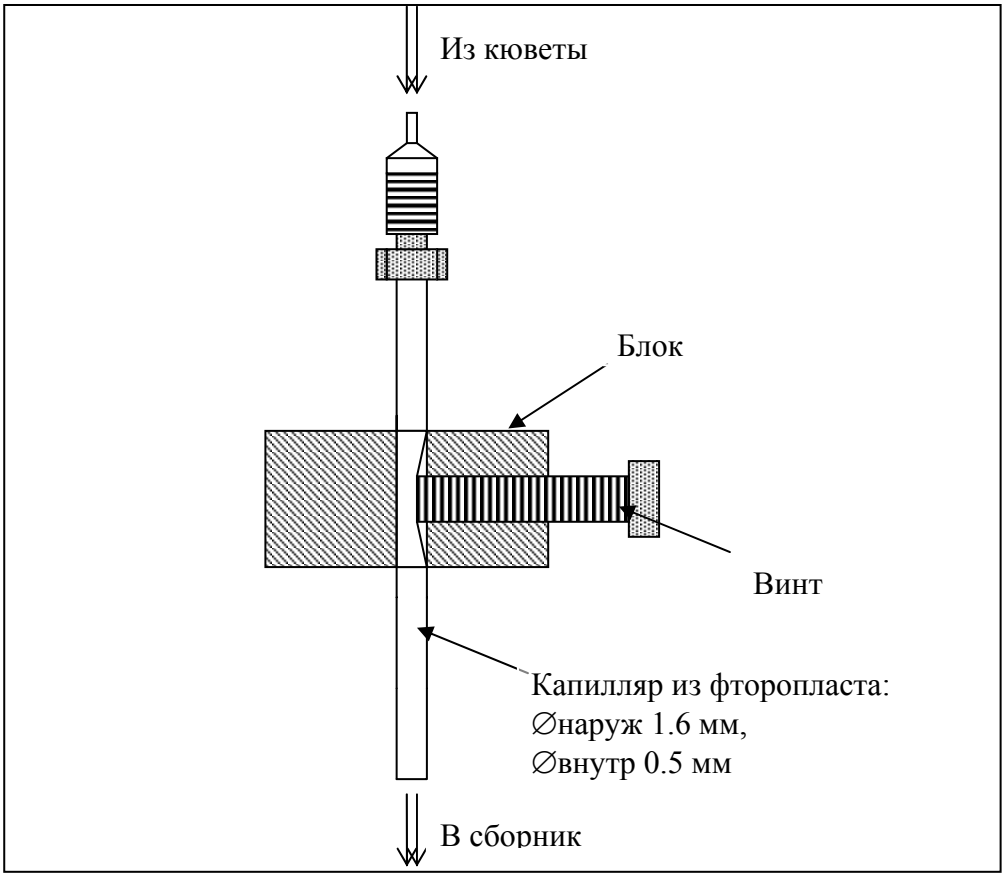


Рис. 4: Устройство для сбора элюата.

Удаление элюента проводилось в вакууме водоструйного насоса на установке микросинтеза (разработка КБ НИОХ СО РАН), которая позволяет работать с микроколличествами вещества. Схема установки приведена на рис. 5.

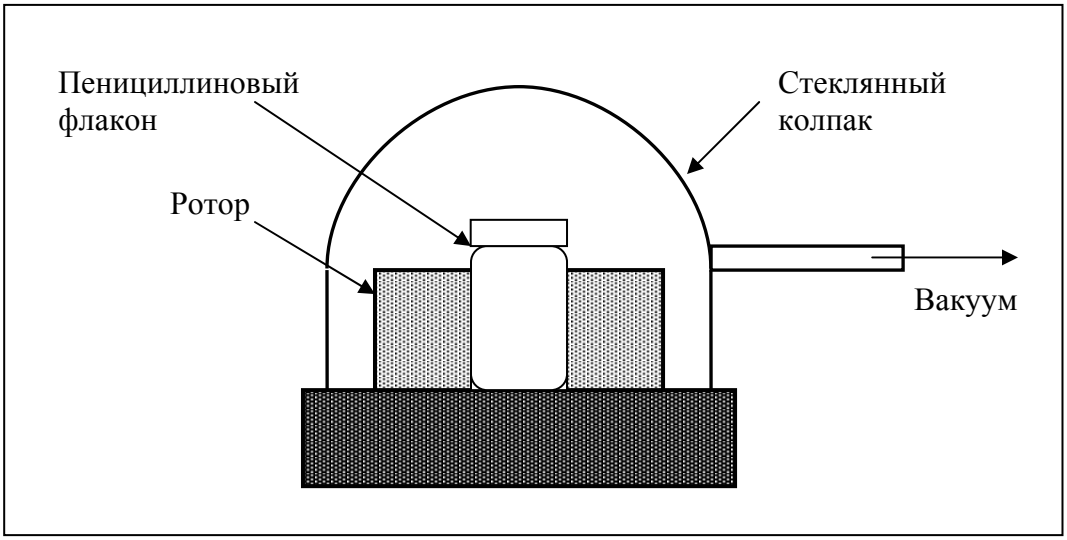


Рис. 5: Установка для удаления растворителя. Пенициллиновый флакон фиксируется в отверстии вращающегося механизма, который герметично закрывается стеклянным куполом с выходом к водоструйному насосу.

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

Экспериментальная часть

В работе использованы реактивы: ацетонитрил (AcCN) «сорт 1» («Криохром», для хроматографии, С.-Петербург), метанол (MeOH) «чда», вода бидистиллированная, 0,05М водная фосфорная кислота.

Препараты: три образца *Силк*, производства: лабораторного (в работе именуется «*Силк*, лабораторный»), опытный химический цех 1 (*Силк* ОХЦ 1), опытный химический цех 2 (*Силк* ОХЦ 2).

Рабочие растворы готовились растворением соответствующих препаратов в метаноле с заданной концентрацией.

Хроматографирование проводилось на хроматографе «Милихром А-02». (ЗАО "ЭкоНова", Новосибирск) на колонке ∅2х75 с сорбентом Prontosil 120-5-C18 AQ N00/BO343 (Bischoff Chromatography, Germany).

1. Подбор условий для микропрепаративного разделения в системе элюентов ацетонитрил – вода – кислота

1.1. Провели хроматографирование трёх образцов при условиях:

Элюент А: 0,05М водная фосфорная кислота,
Элюент В: ацетонитрил,
Элюирование изократическое, соотношение элюентов 20:80, 25:75, 30:70, по объёму,
Температура 35°С,
Концентрация 15мг/мл,
Объём пробы 8 мкл.

Хроматограммы приведены в приложении на стр. 1-4, хроматограммы 1-7.

1.2. Провели хроматографирование образца «*Силк*, лабораторный» при условиях:

Элюент А: 0,05М водная фосфорная кислота,
Элюент В: ацетонитрил,
Элюирование изократическое, соотношение элюентов 25:75 по объёму,
Температура 40°С,
Концентрация 15мг/мл,
Объём пробы 8 мкл.

Хроматограмма приведена в приложении на стр. 4, хроматограмма 8.

Для дальнейшего микропрепаративного разделения выбраны условия:

Образец: «*Силк,* ОХЦ 2»,
Элюент А: 0,05М водная фосфорная кислота,
Элюент В: ацетонитрил,
Элюирование изократическое, соотношение элюентов 25:75 по объёму,
Температура 40°С.

2. Определение степени возможной перегрузки колонки

В выбранных условиях проведено хроматографирование образца «*Силк*, ОХЦ 2» с концентрацией 60 мг/мл и объёмами пробы 4, 6 и 8 мкл.

Хроматограммы приведены в приложении на стр. 5-6, хроматограммы 9-11.

Выбранный объём пробы при данной концентрации составил 6 мкл.

3. Микрорепаративное разделение и анализ полученных фракций

Разделение образца проводили на 10 фракций. Схематическое изображение зон, соответствующих фракциям, приведено на хроматограмме 12 приложения, стр. 6. В

работе использовали описанное выше приспособление для сбора фракций (стр. 11) и установку для удаления растворителя (стр. 13).

Отбор вещества, отвечающего конкретной зоне, проводили сбором элюата в чистый пенициллиновый флакон во время записи соответствующих пиков. Хроматографию и сбор элюата повторяли 12-кратно, после чего фракции упаривали под вакуумом водоструйного насоса до полного отсутствия жидкости, сухие остатки растворяли в метаноле (около 200 мкл) и переносили в стеклянные пробирки для дальнейшего анализа.

Анализ фракций проводили в стандартных условиях:

Элюент А: 0,05М водная фосфорная кислота,

Элюент В: ацетонитрил,

Элюирование изократическое, соотношение элюентов 25:75 по объёму,

Температура 40°С.

Хроматограммы приведены в приложении на стр. 7-11, хроматограммы 13-22.

Холостой опыт проводили в тех же условиях, хроматограмма 23 на стр. 12 приложения.

4. Сравнительный анализ фракций в системе элюентов метанол–вода-ацетонитрил

Провели хроматографирование образца «*Силк* ОХЦ 2» и фракций № 3-8 в условиях:

Элюент А: 0,05М водная фосфорная кислота,

Элюент В: метанол,

Элюирование изократическое, соотношение элюентов 17:83 по объёму,

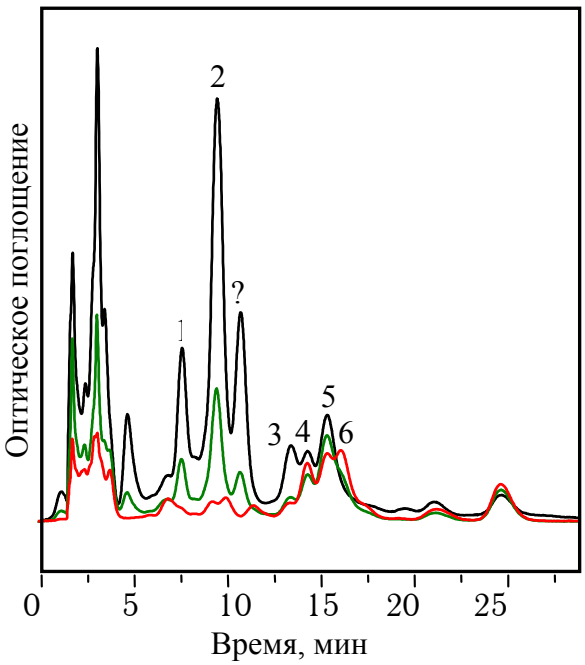
Температура 35°С.

В этих же условиях провели холостой опыт.

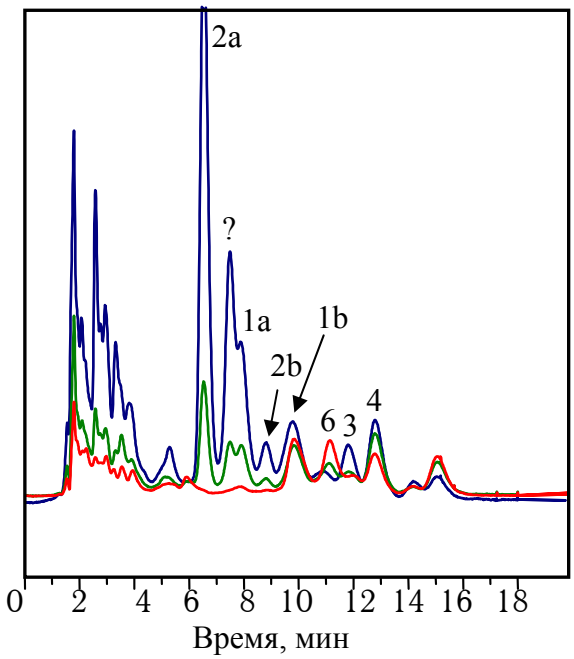
Хроматограммы приведены в приложении на стр. 12-16, хроматограммы 24-31.

Результаты и обсуждение

Анализ полученных хроматограмм показал следующее соответствие пиков:



1. Хроматограмма образца Силк в системе элюентов метанол – вода - кислота



2. Хроматограмма образца Силк в системе элюентов ацетонитрил – вода - кислота

Рис. 6. Сравнение хроматограмм образца в различных системах элюентов. Нумерация пиков соответствует приведённой в литературе.

Из распределения компонентов видно, что картина разделения смеси терпеновых кислот в двух разных системах существенно различается. Также видно, что в обоих случаях не удаётся добиться полного разделения компонентов.

На хроматограммах 19 и 29 приложения присутствуют пики продуктов окисления абиетиновой кислоты, образовавшиеся после разделения смеси на отдельные фракции.

Выводы.

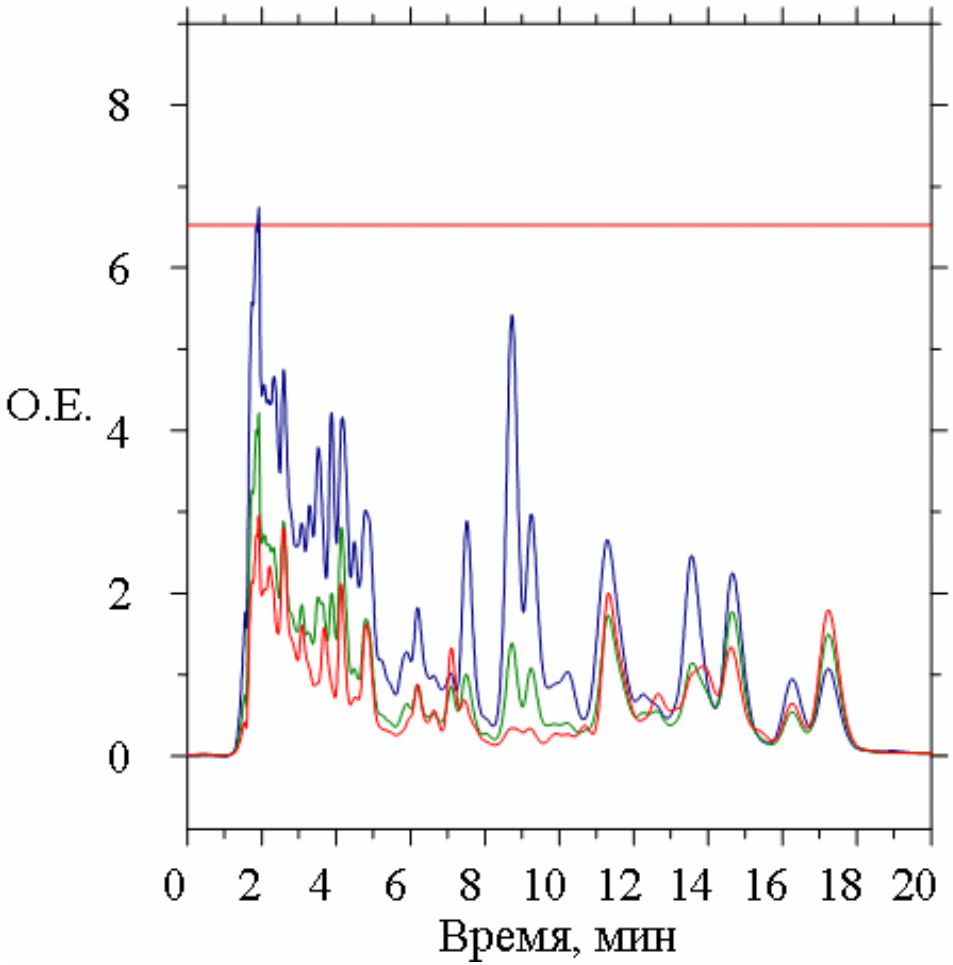
1. Разработаны основные приемы микропрепаративного разделения образца методом ВЭЖХ.
2. Препаративно получены и идентифицированы основные компоненты препарата *Силк.*

Литература:

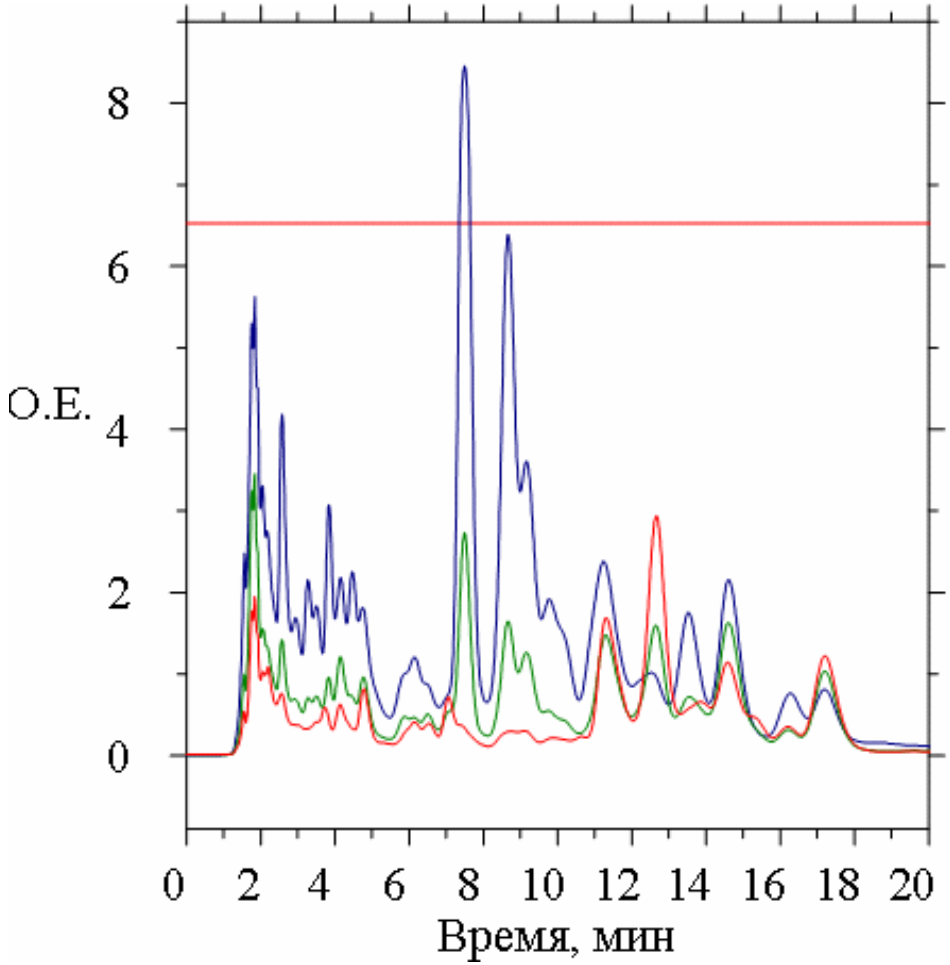
1. В.Г. Дроботько, Б.Е. Айзерман, М.О. Швайгер, С.И. Зеленуха, Т.П. Мандрик // Антимикробные вещества высших растений, Киев, АН УССР, 1958, с. 139-142.
2. В.Г. Минаева // Лекарственные растения Сибири, Новосибирское книжное издательство, 1960, с. 83-84.
3. В.М. Ушанова, С.М. Репях // В кн.: Переработка растительного сырья и утилизация отходов, Изд. КГТА, Красноярск, 1994, с. 144.
4. А.В. Кучин, Л.П. Карманова, А.А. Королева // Химия в интересах устойчивого развития, 1997, Т. 5, № 1, с. 7-20.
5. Е.М. Рунова, Б.И. Угрюмов // Химия растительного сырья, 1998, № 1, 57 –60.
6. В.А. Ралдугин // Химия в интересах устойчивого развития, 5, № 1, 75-77.
7. Т.В. Лейбюк, С.А. Шевцов, В.А. Ралдугин // Химия природных соединений, 1990, № 4, с. 556-557.
8. В.А. Ралдугин, С.А. Шевцов, Г.И. Щукин, Г.В. Ляндрес, К.А. Михеев // Патент России № 2061487, 1996, БИ № 16, 1996 // Способ получения биологически активной суммы тритерпеновых кислот.
9. В.А. Ралдугин, А.Г. Друганов, В.П. Климов, А.Н. Шубин, В.М. Чекуров // Патент России № 2108107, 1998, БИ № 10, 1998 // Способ получения биологически активной суммы тритерпеновых кислот.
10. В.А. Ралдугин, А.Г. Друганов, В.П. Климов, А.Н. Шубин, В.М. Чекуров // Патент России № 2108803, 1998, БИ № 11, 1998 // Способ получения биологически активной суммы тритерпеновых кислот.
11. Открытое акционерное общество «ЭЛХА» // Патент России № 22151139, 2000, БИ № 35, 2000 // Способ получения биологически активной суммы тритерпеновых кислот.
12. А.В. Кучин, Л.П. Карманова, Т.В. Хуршкайнен // Патент России № 2161149, 2000, БИ № 36, 2000 // Способ выделения биологически активной суммы кислот из древесной зелени пихты.
13. // Применение препарата *Силк* в зернопроизводстве : рекомендации // Департамент с.-х. Новосибирской обл., СибНИИЗХим, НИОХ СО РАН, НТЦ «Биорост», Новосибирск, 2001.
14. M. Tischler, J.H. Gardelina // J/ Liquid Chromatogr.,1993, 16, № 1, 15-19.
15. А.Г. Друганов, В.А. Ралдугин, М.М. Шакиров, С.А. Нехорошев, А.Р. Коскин, Г.А. Толстиков // Химия в интересах устойчивого развития, 2000, 8, № 5, 699-704.
16. ЗАО Институт хроматографии «ЭкоНова» // Хроматограф жидкостный микроколоночный «МИЛИХРОМ А-02»: Руководство по эксплуатации // Новосибирск, 2003.

17. Б. Билиндмейгер, Б. Фрайд, Г. Хегнауер, Б. Хемпер, У. Хэнкок, П. Макдональд, У. Пиркл, Р. Престидж, Й. Шерма, Ф. Ванкат, А. Верли, Дж. Уайтселл // Препаративная жидкостная хроматография, М.: Мир, 1990.
18. Waters J. L., Personal communications (1974).
19. Jung Il Kim, Seung Bum Hong, Kyung Ho Row // Journal of Chromatography A, // 949 (2002) 275–280.
20. Anthony R. Mehok, Colin T. Mant, Lajos Gera, John Stewart, Robert S. Hodges // Journal of Chromatography A, 972 (2002) 87–99.
21. Georges Guiochon // 965 (2002) 129–161 Journal of Chromatography A.

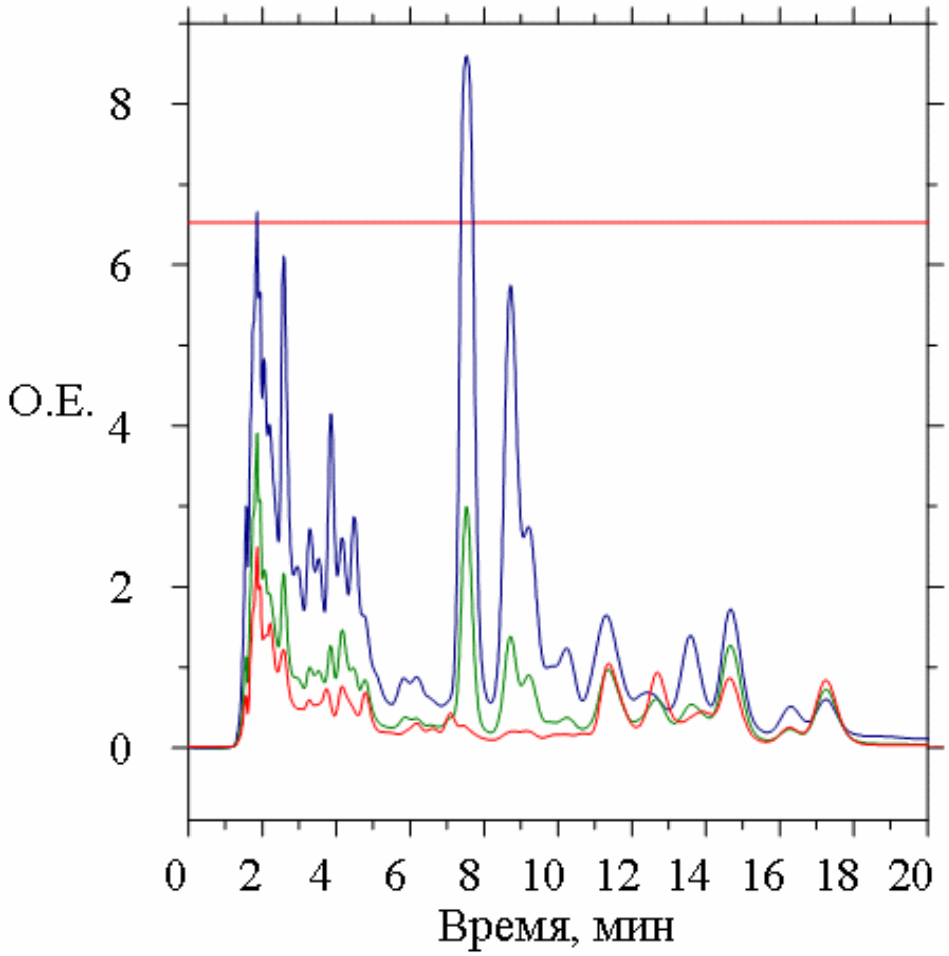
ПРИЛОЖЕНИЕ



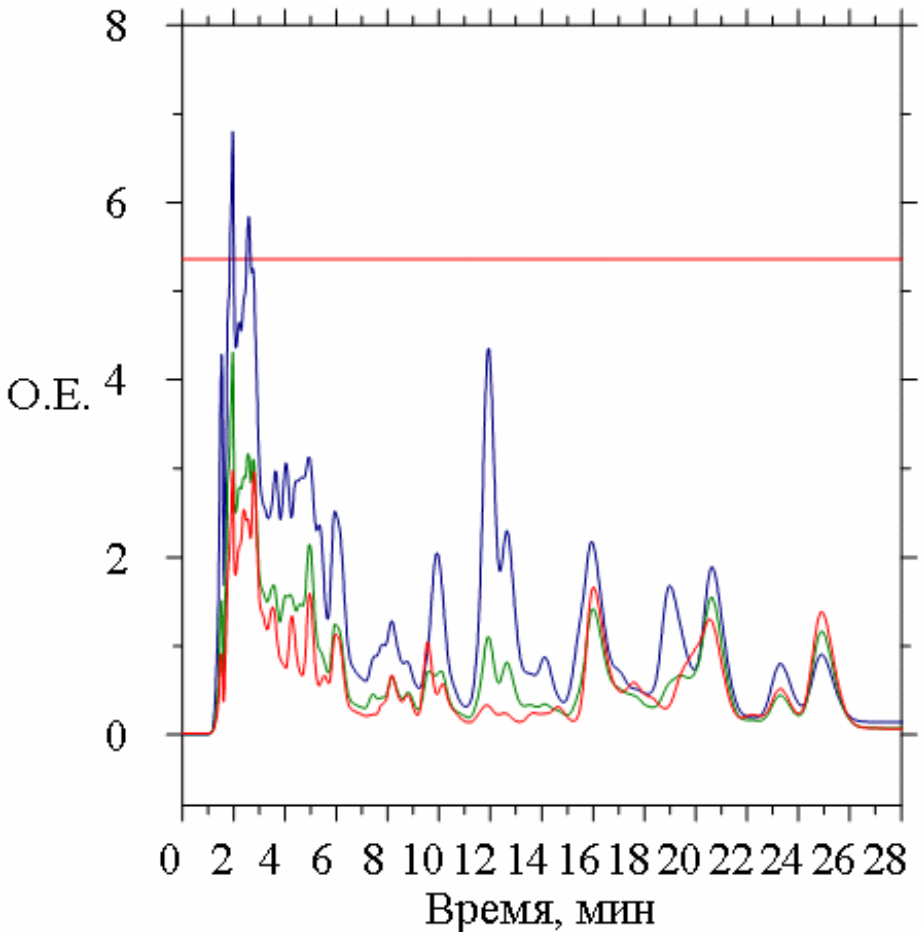
Хроматограмма 1. Образец: Силк, лабораторный (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 35°С.



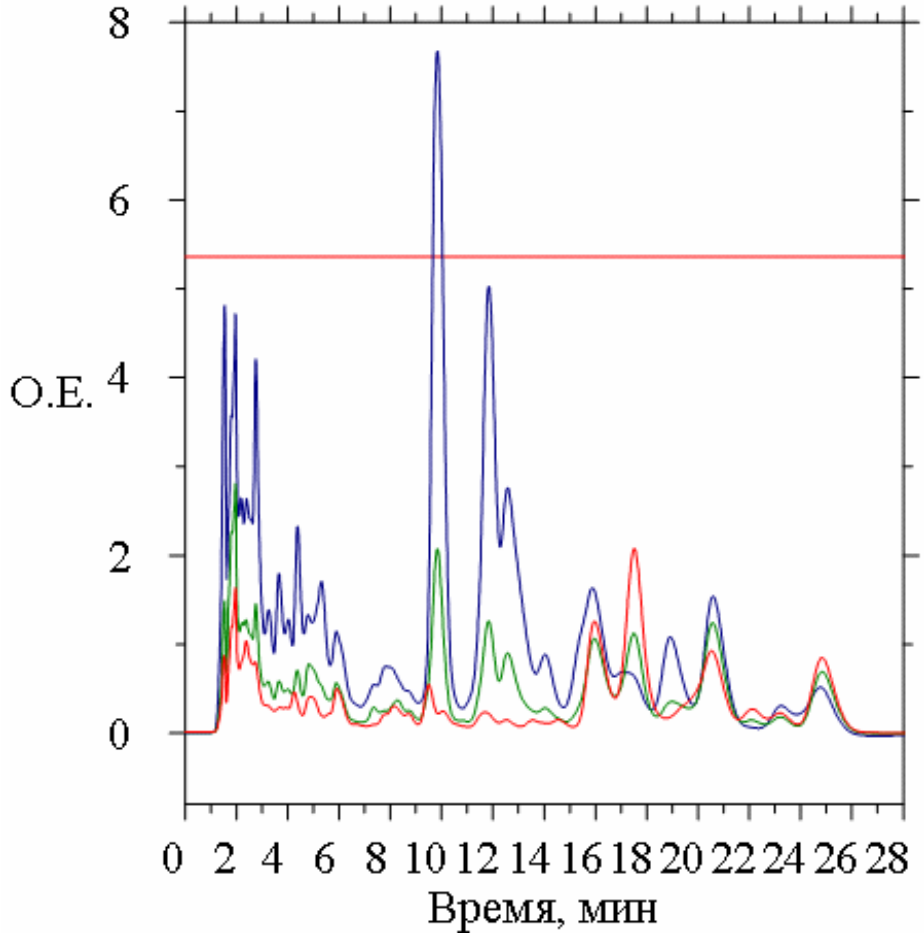
Хроматограмма 2. Образец: Силк ОХЦ 1 (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 35°С.



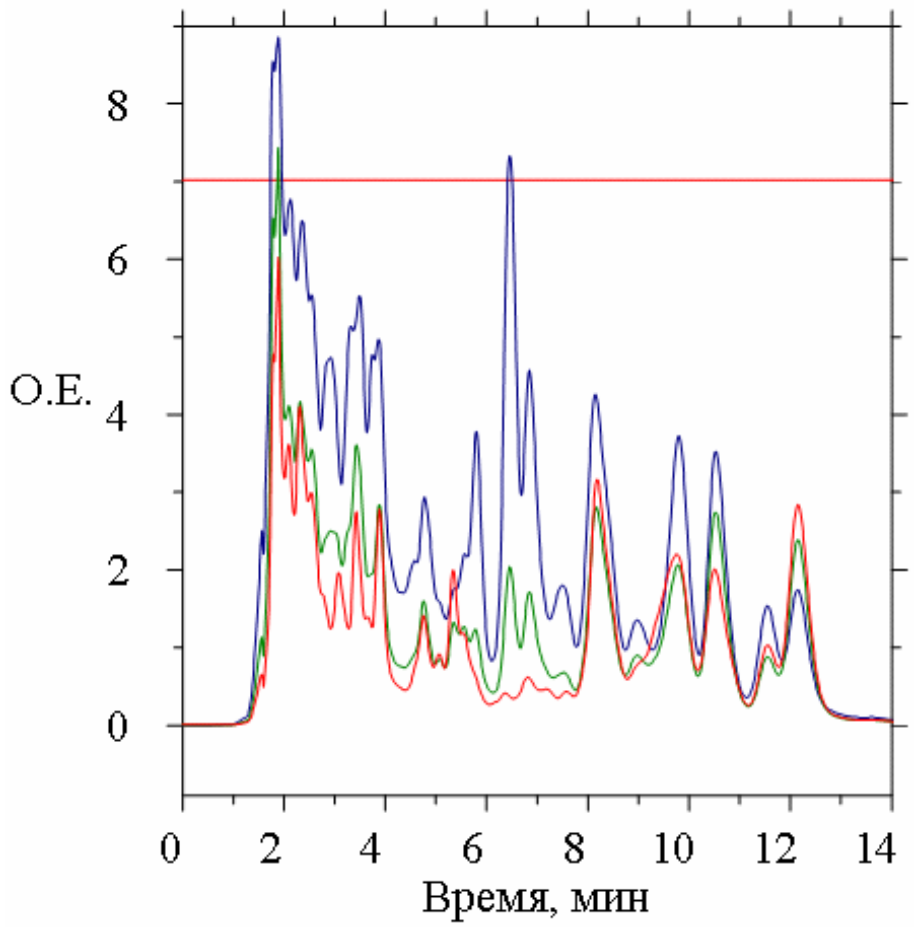
Хроматограмма 3. Образец: Силк ОХЦ 2 (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 35°С.



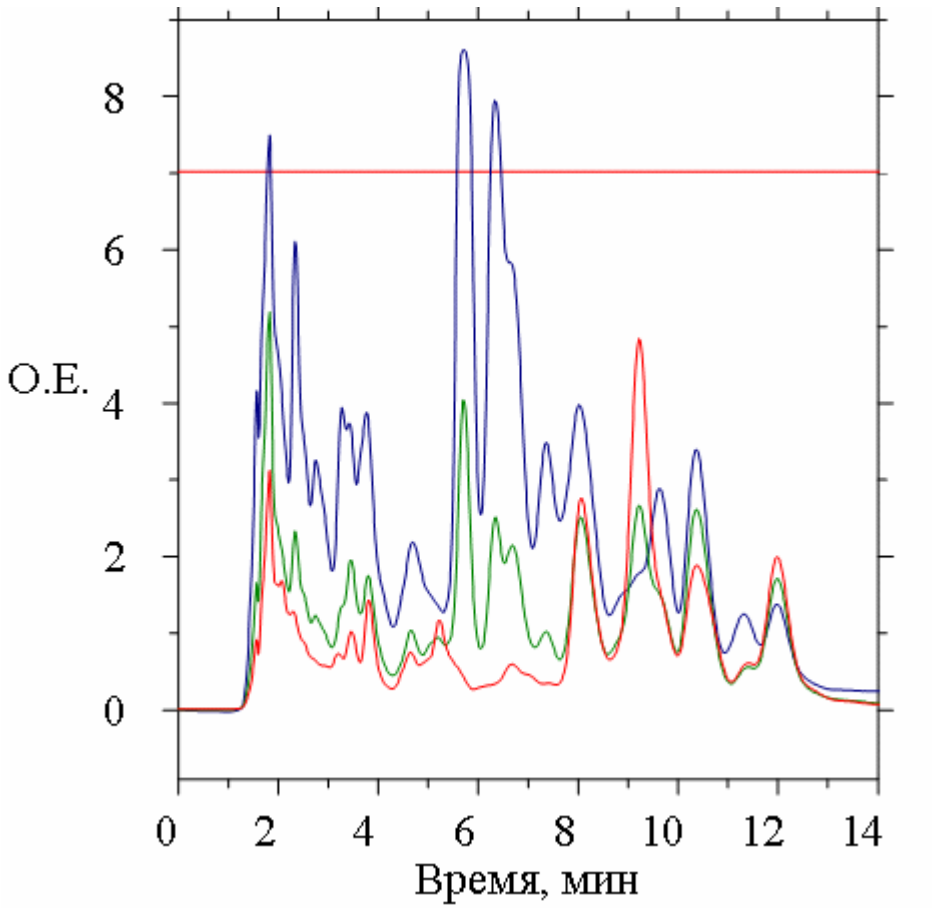
Хроматограмма 4. Образец: Силк, лабораторный (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 30:70 соответственно; температура 35°С.



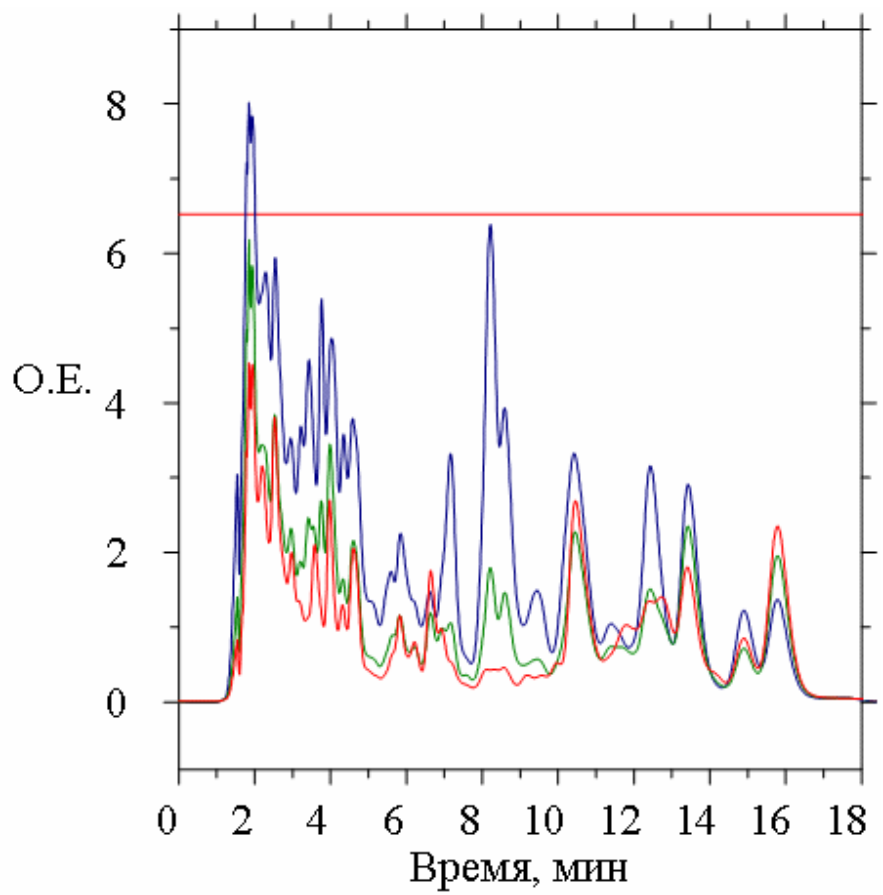
Хроматограмма 5. Образец: Силк ОХЦ 1 (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 30:70 соответственно; температура 35°С.



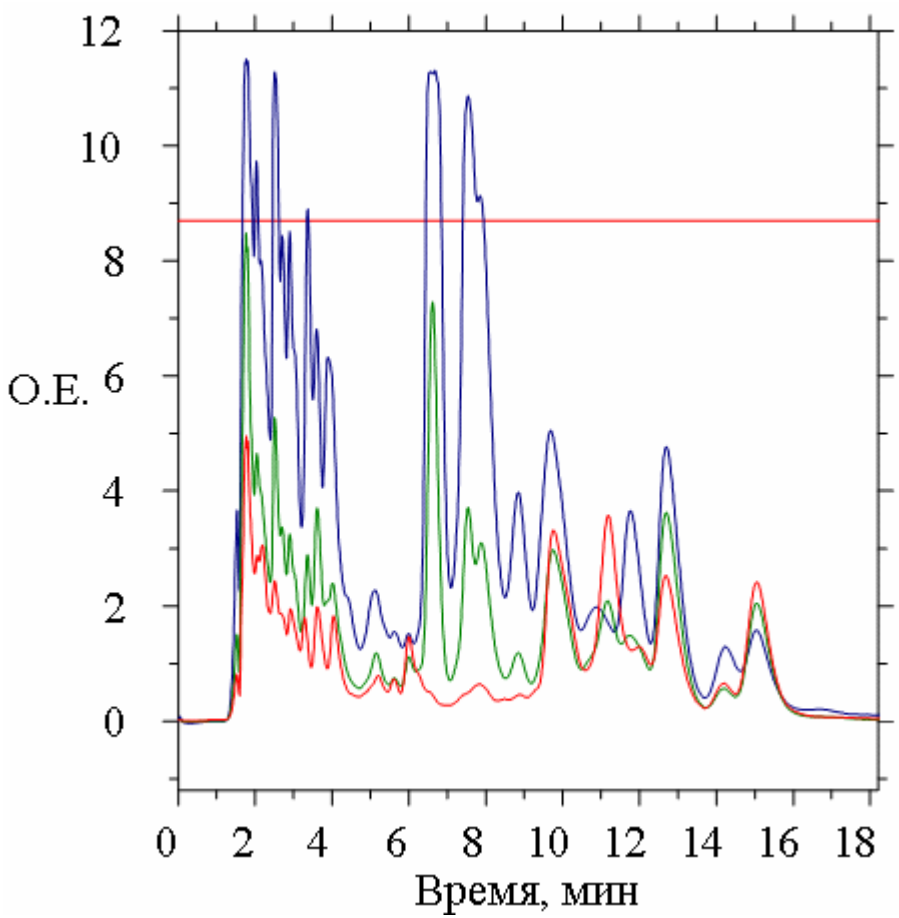
Хроматограмма 6. Образец: Силк, лабораторный (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 20:80 соответственно; температура 35°С.



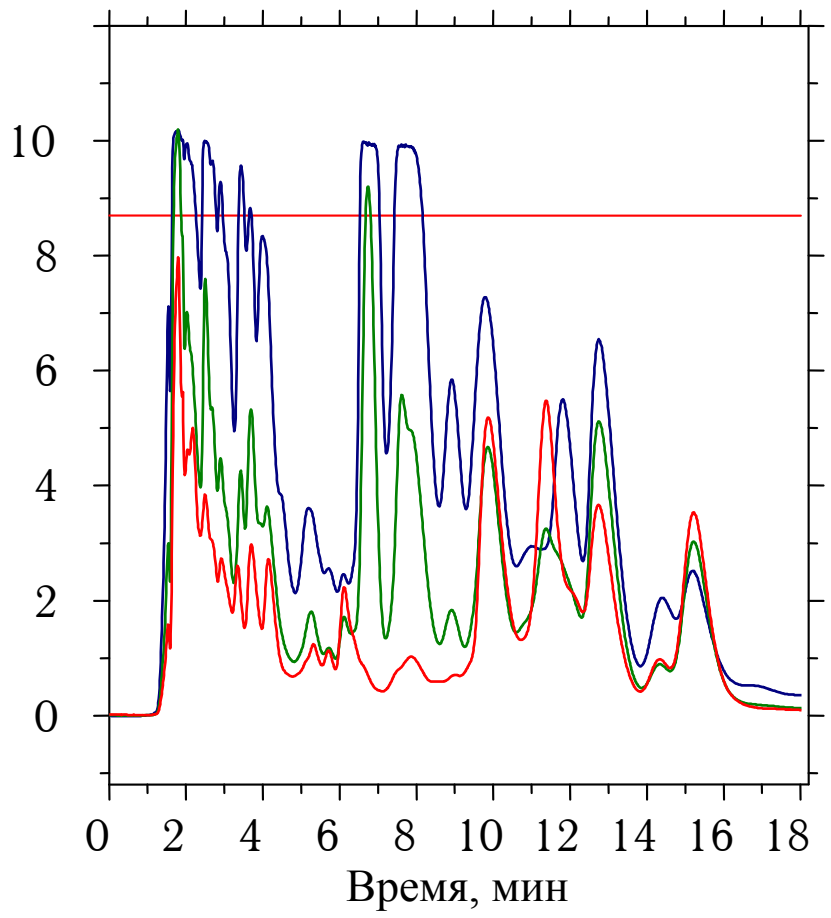
Хроматограмма 7. Образец: Силк ОХЦ 1 (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 20:80 соответственно; температура 35°С.



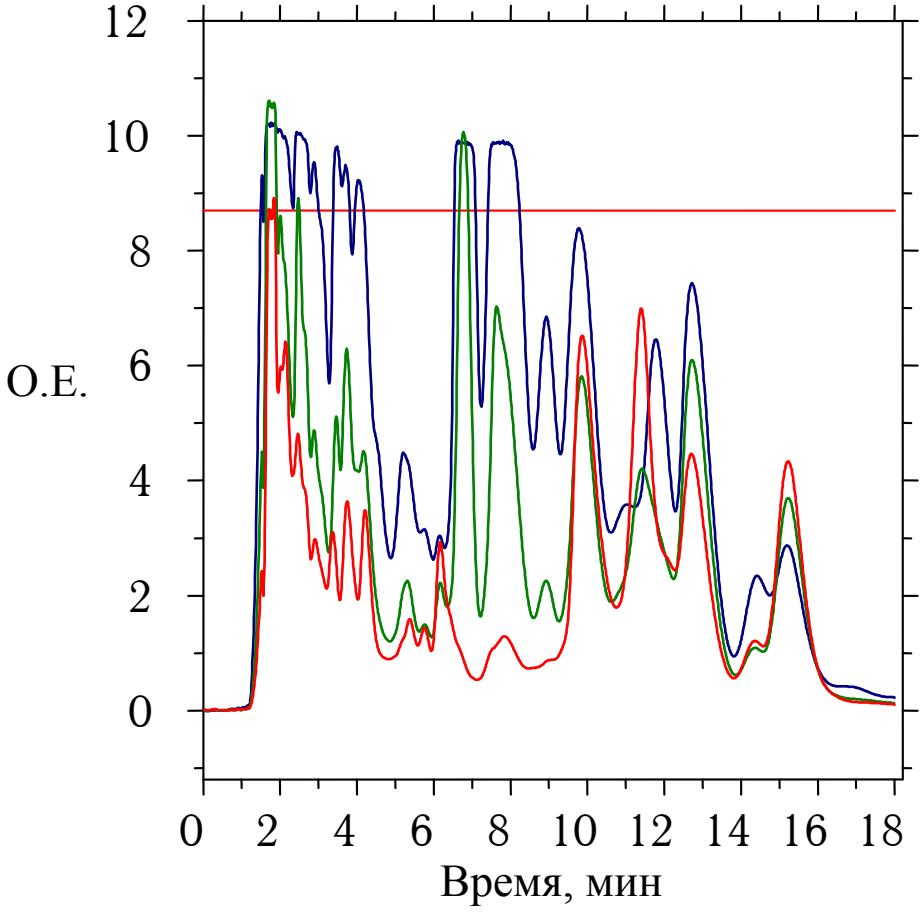
Хроматограмма 8. Образец: Силк, лабораторный (15 мг/мл), объём пробы 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



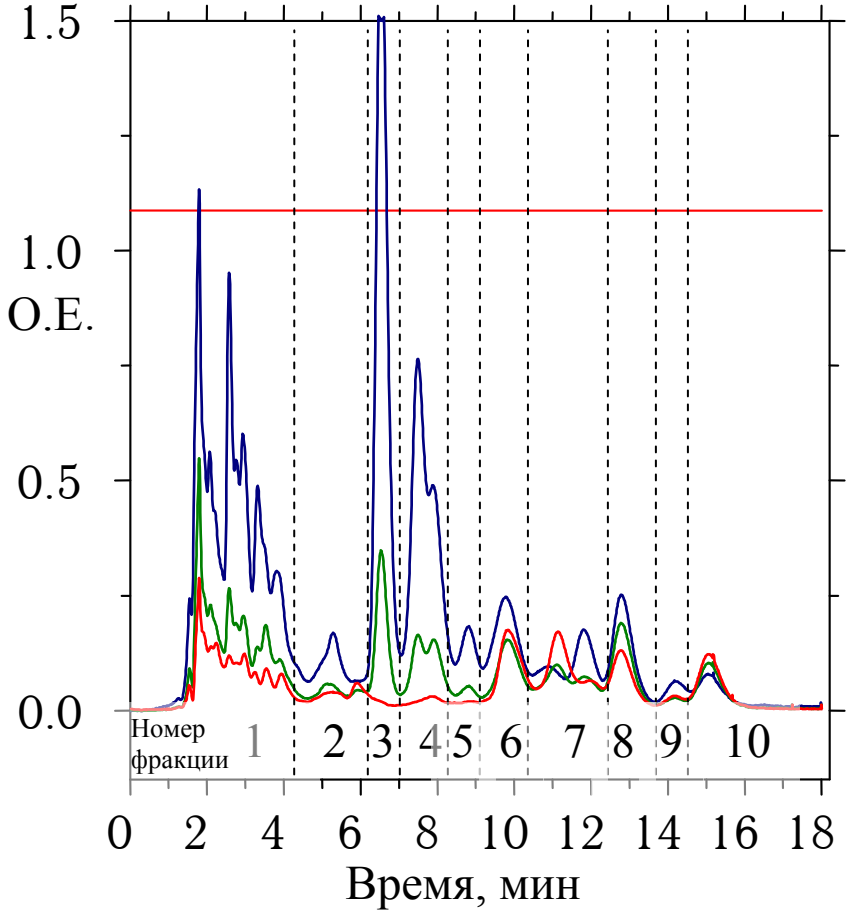
Хроматограмма 9. Образец: Силк ОХЦ 2 (60 мг/мл), объём пробы 4 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



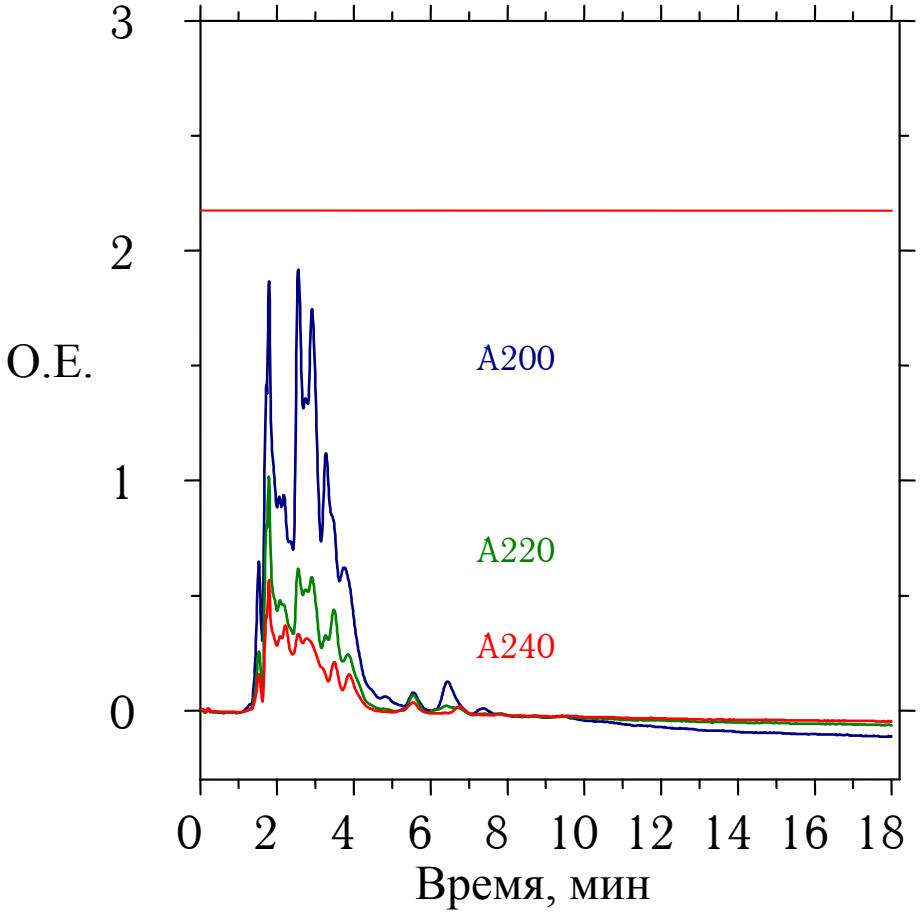
Хроматограмма 10. Образец: Силк ОХЦ 2 (60 мг/мл), объём пробы 6 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



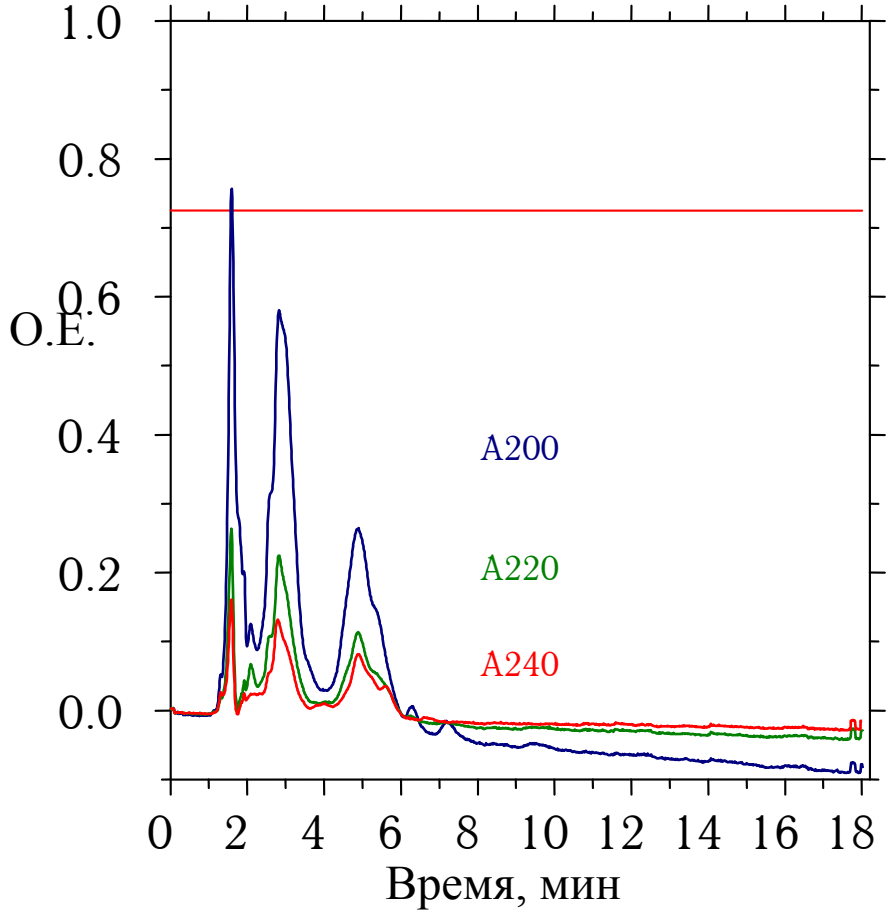
трил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



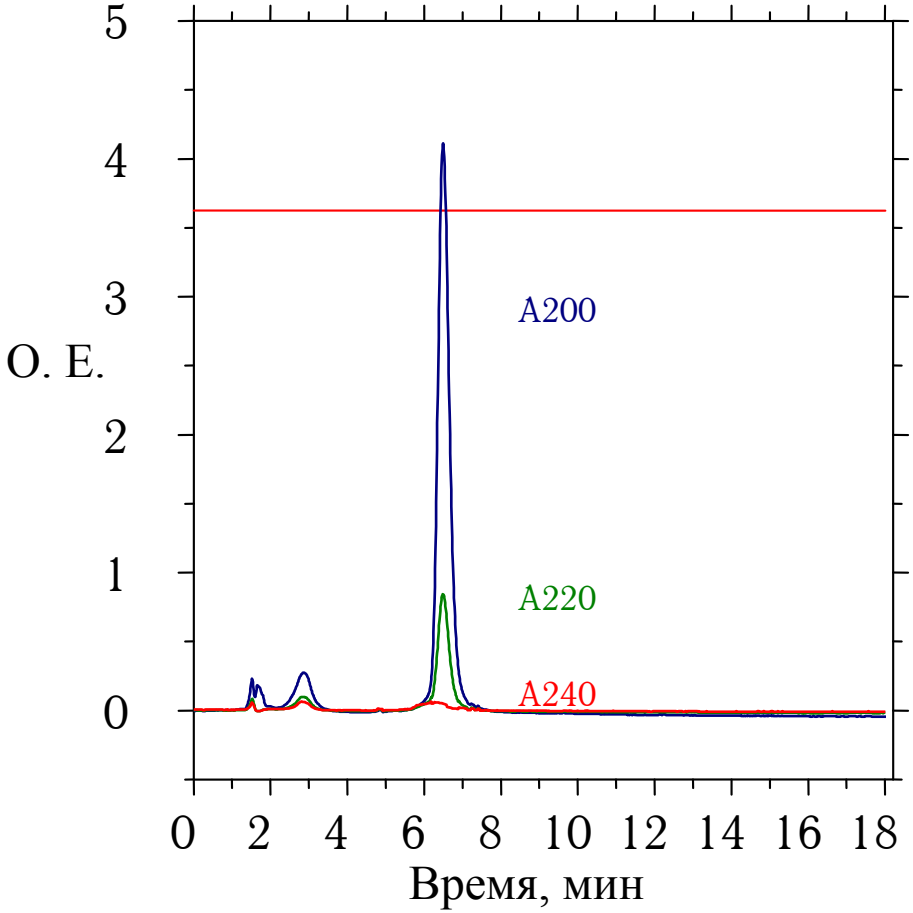
Хроматограмма 12. Разделение образца на фракции.
Образец: Силк ОХЦ 2; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



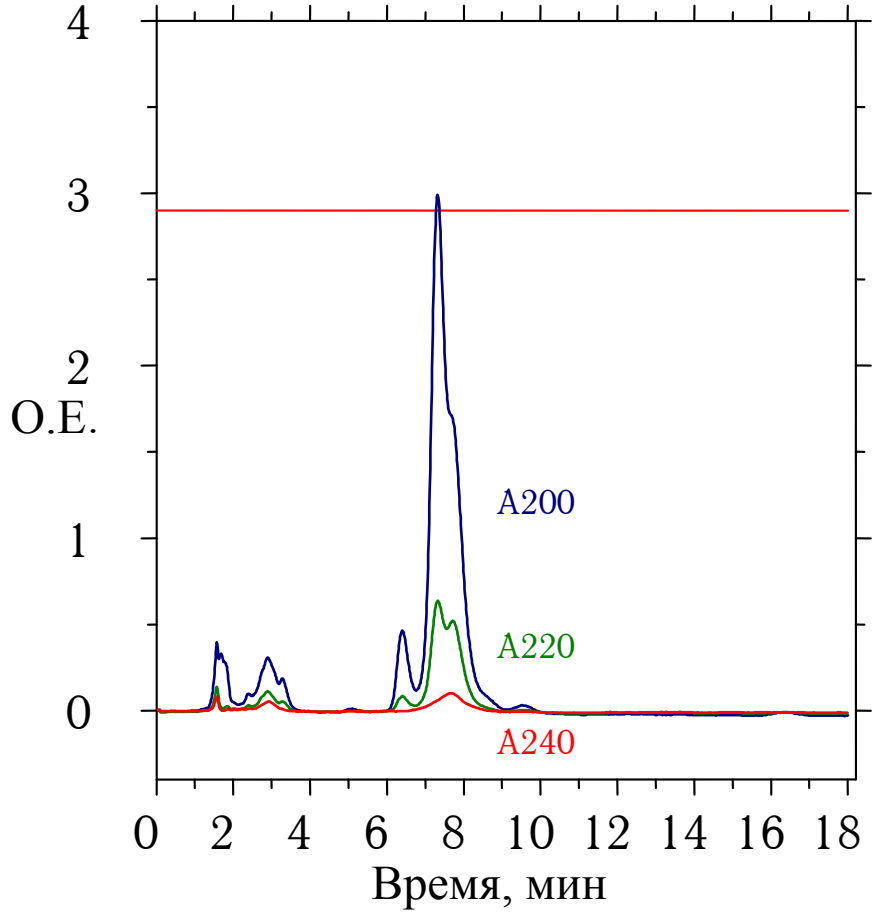
Хроматограмма 13. Образец: Фракция 1; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



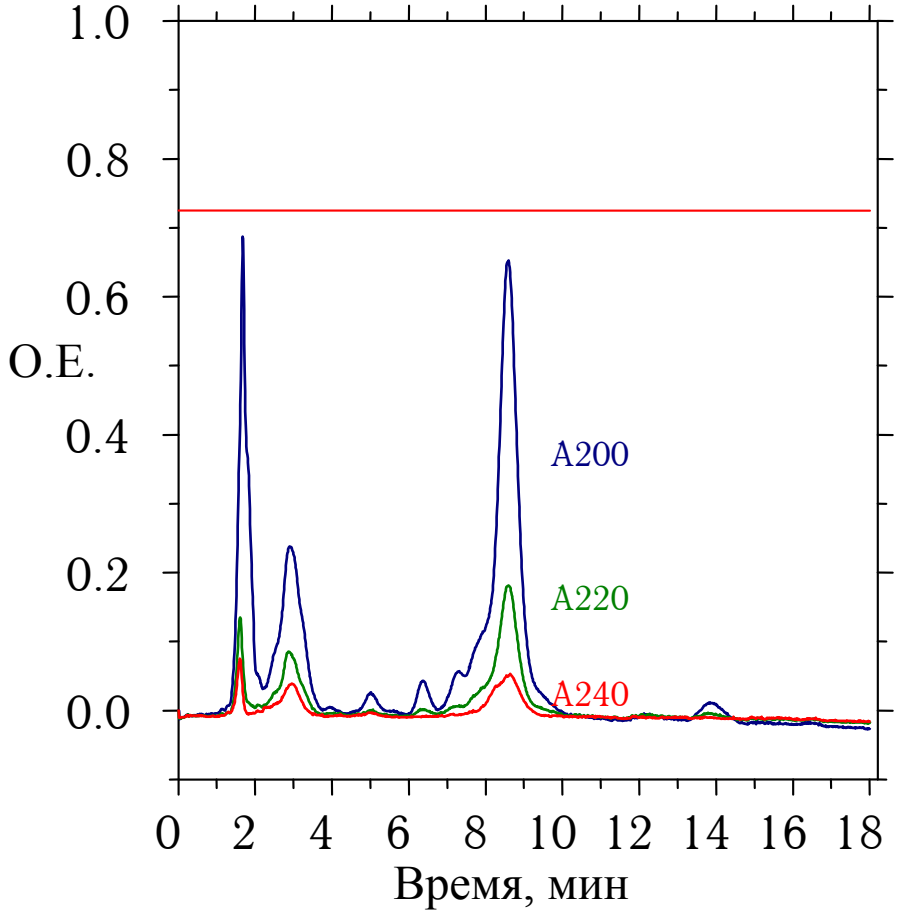
Хроматограмма 14. Образец: Фракция 2; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



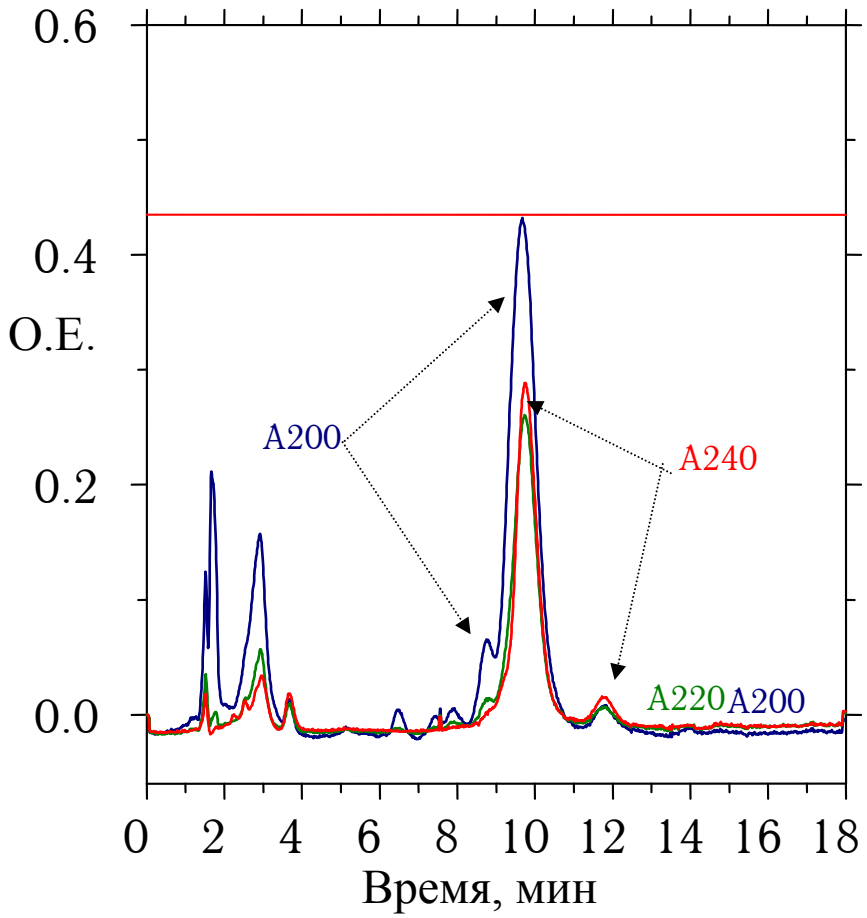
Хроматограмма 15. Образец: Фракция 3; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



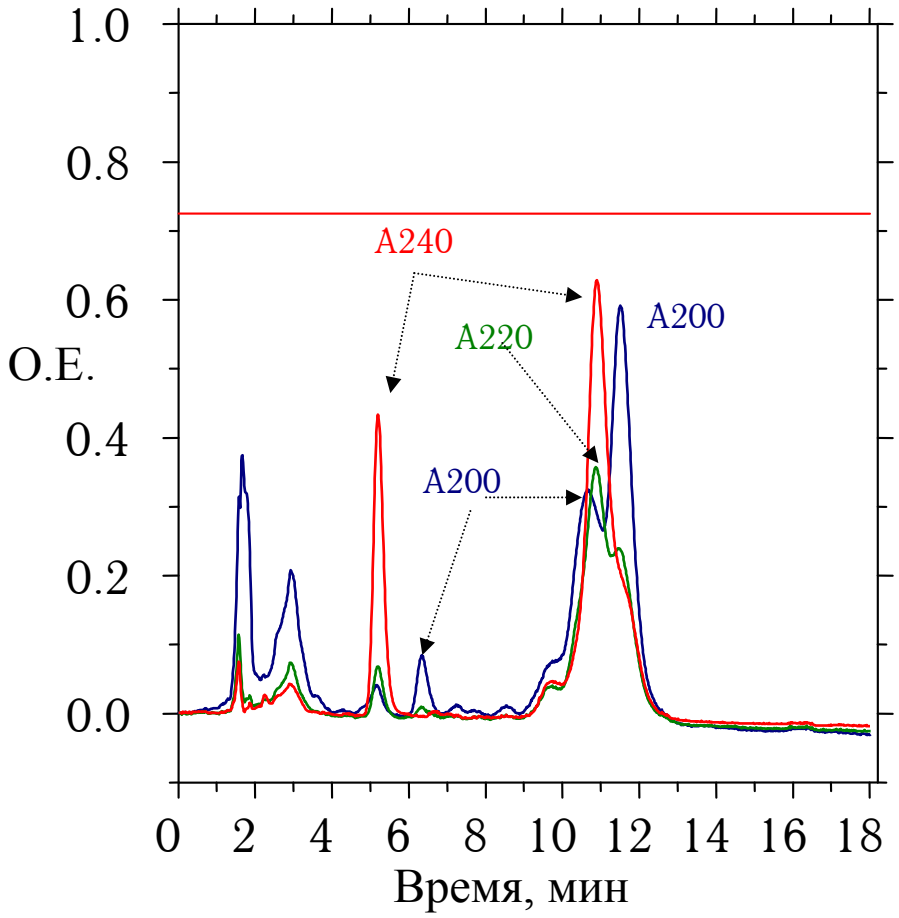
Хроматограмма 16. Образец: Фракция 4; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



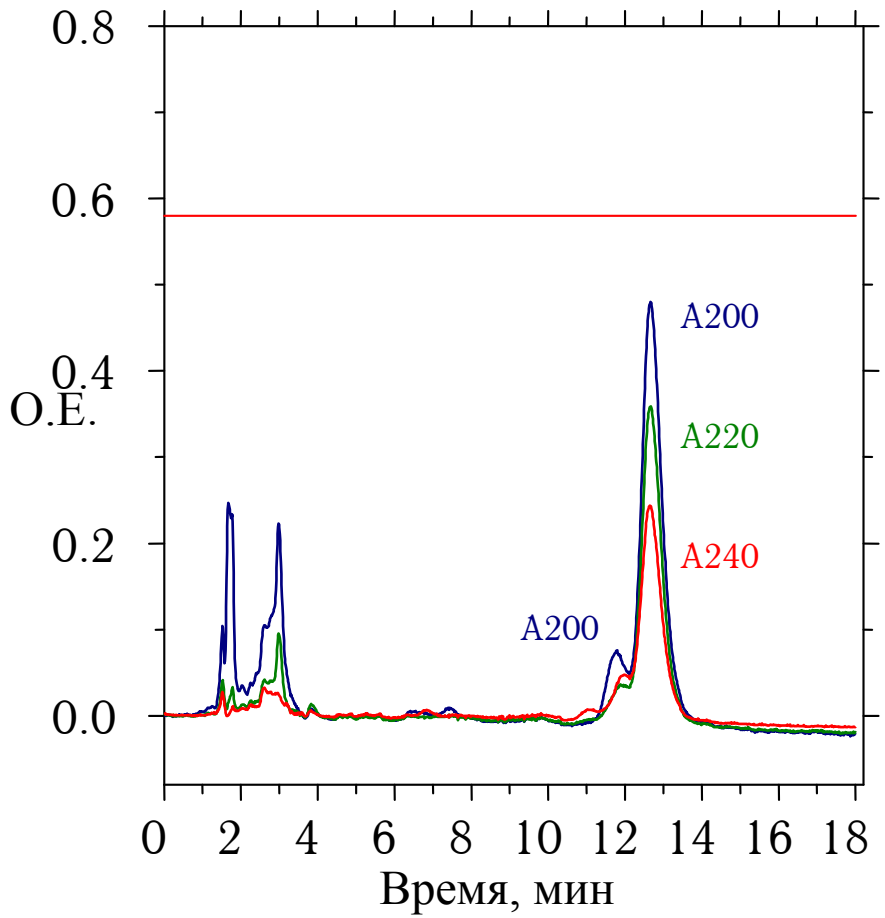
Хроматограмма 17. Образец: Фракция 5; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



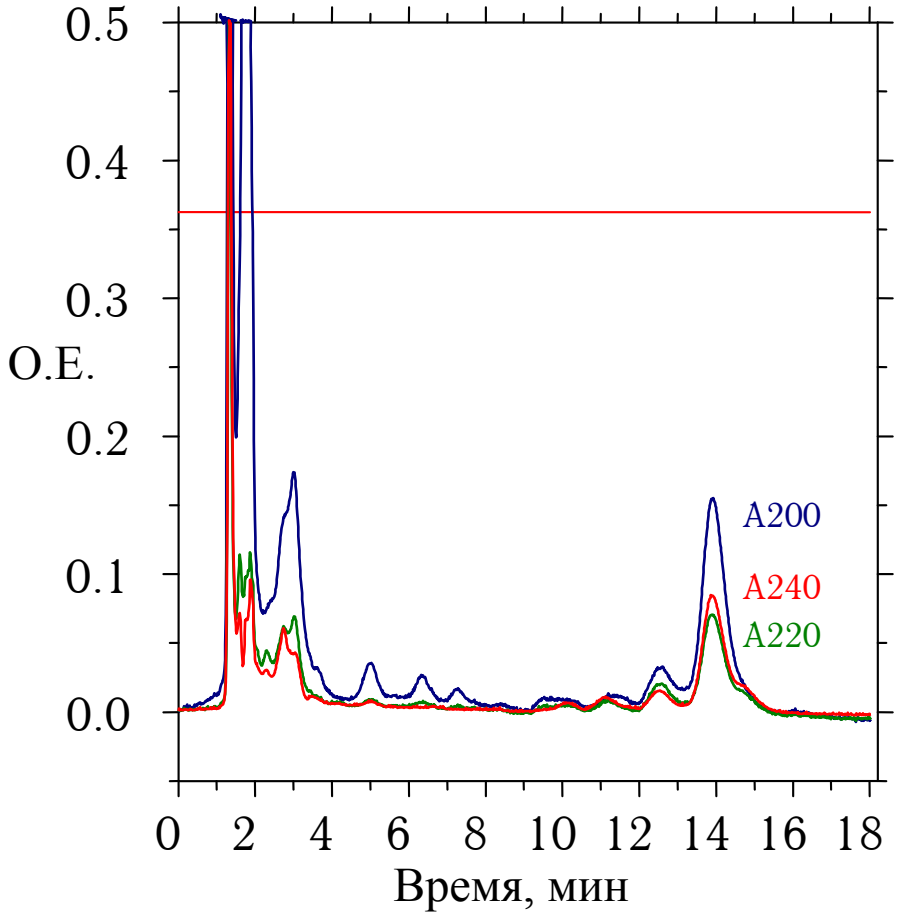
Хроматограмма 18. Образец: Фракция 6; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



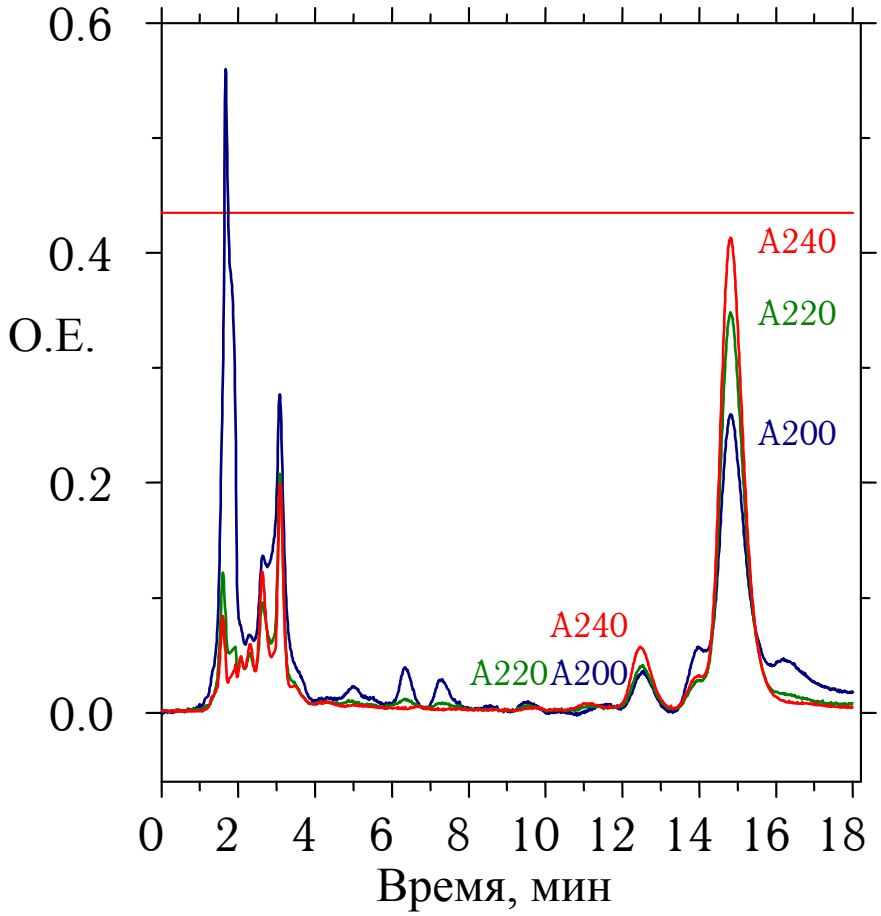
Хроматограмма 19. Образец: Фракция 7; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



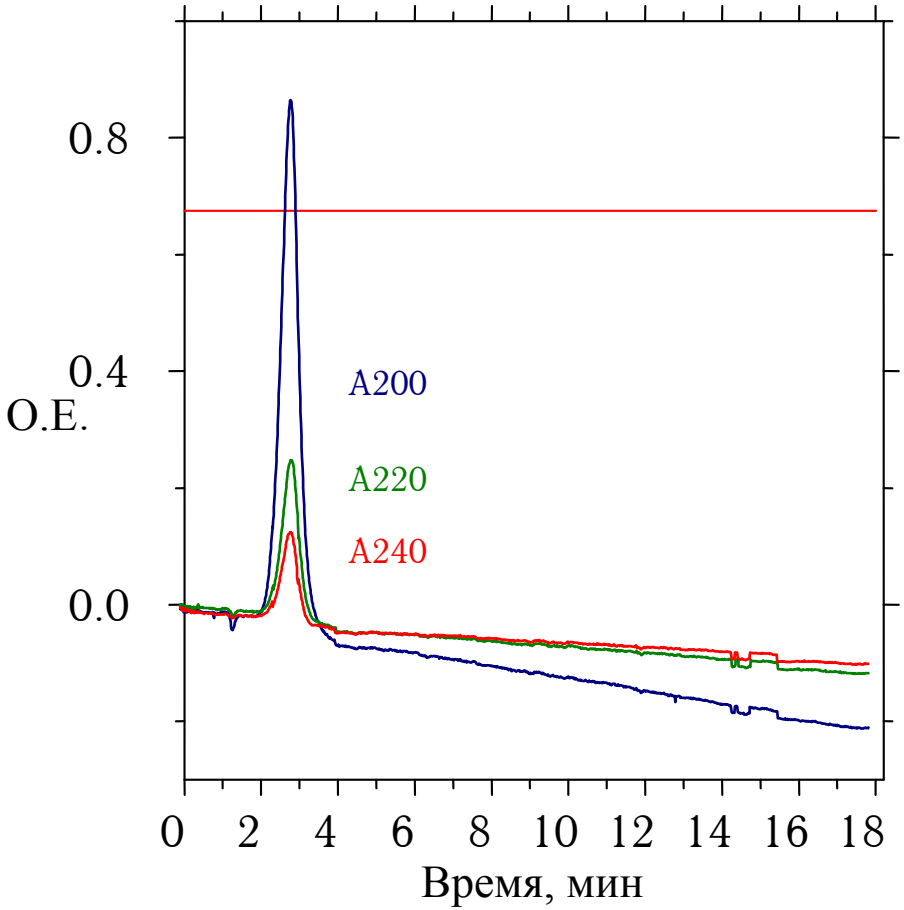
Хроматограмма 20. Образец: Фракция 8; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



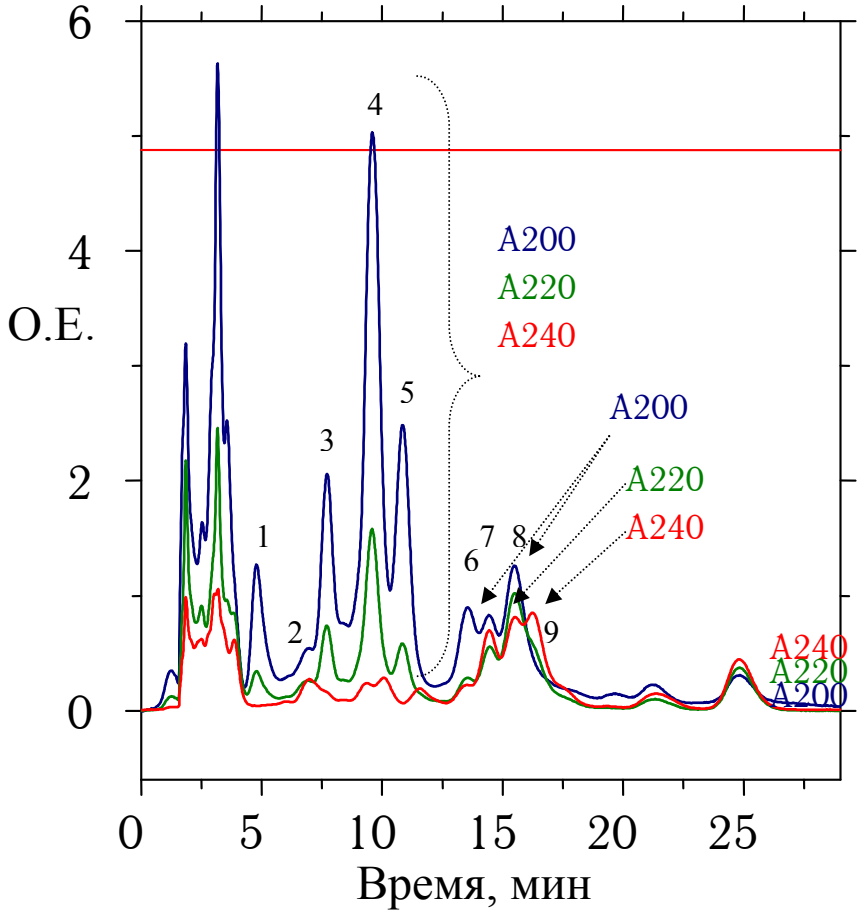
Хроматограмма 21. Образец: Фракция 9; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



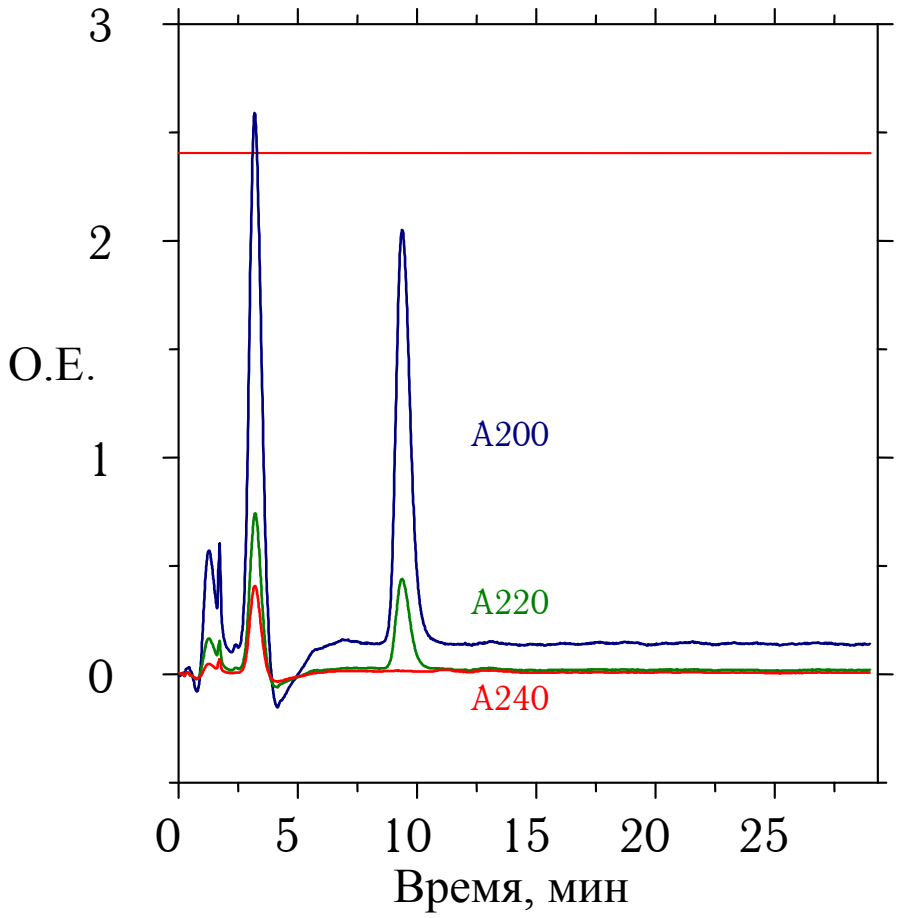
Хроматограмма 22. Образец: Фракция 10; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



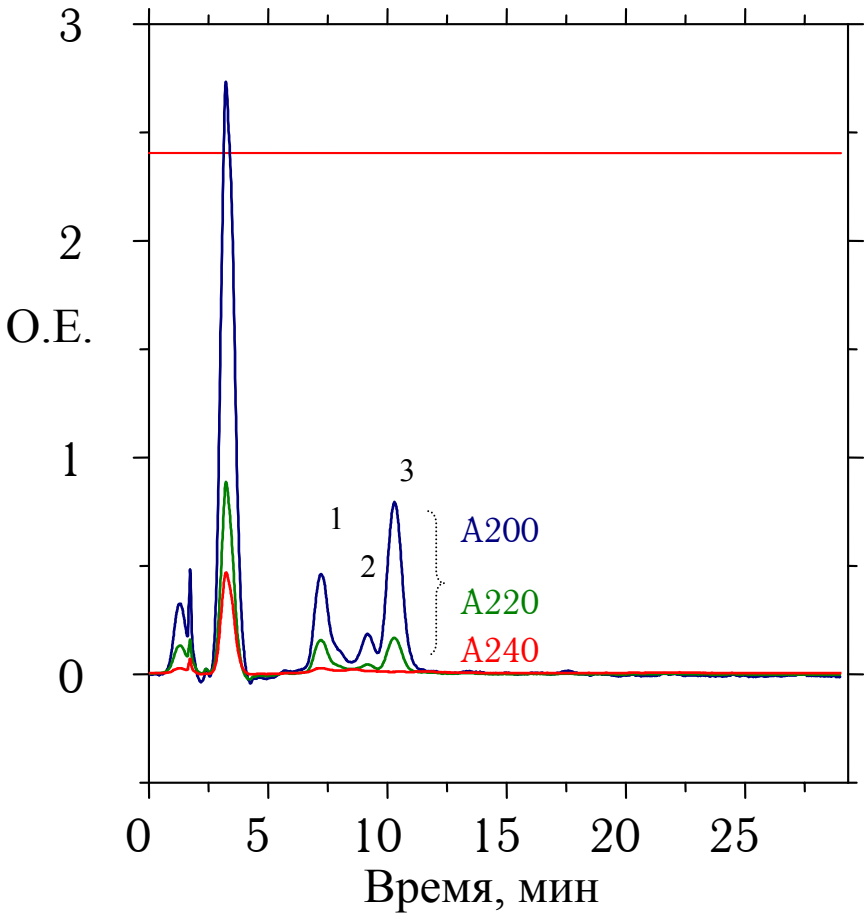
Хроматограмма 23. Холостой опыт; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = ацетонитрил, изократическое элюирование с соотношением элюентов 25:75 соответственно; температура 40°С.



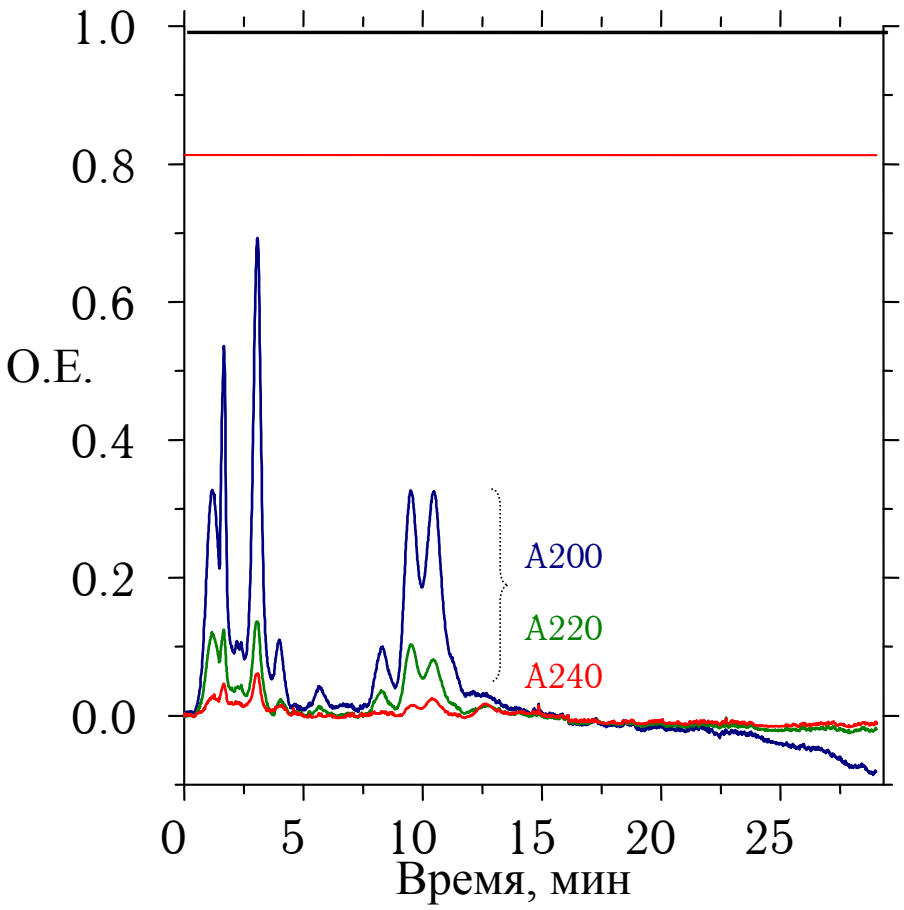
Хроматограмма 24. Образец: Силк ОХЦ 2; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



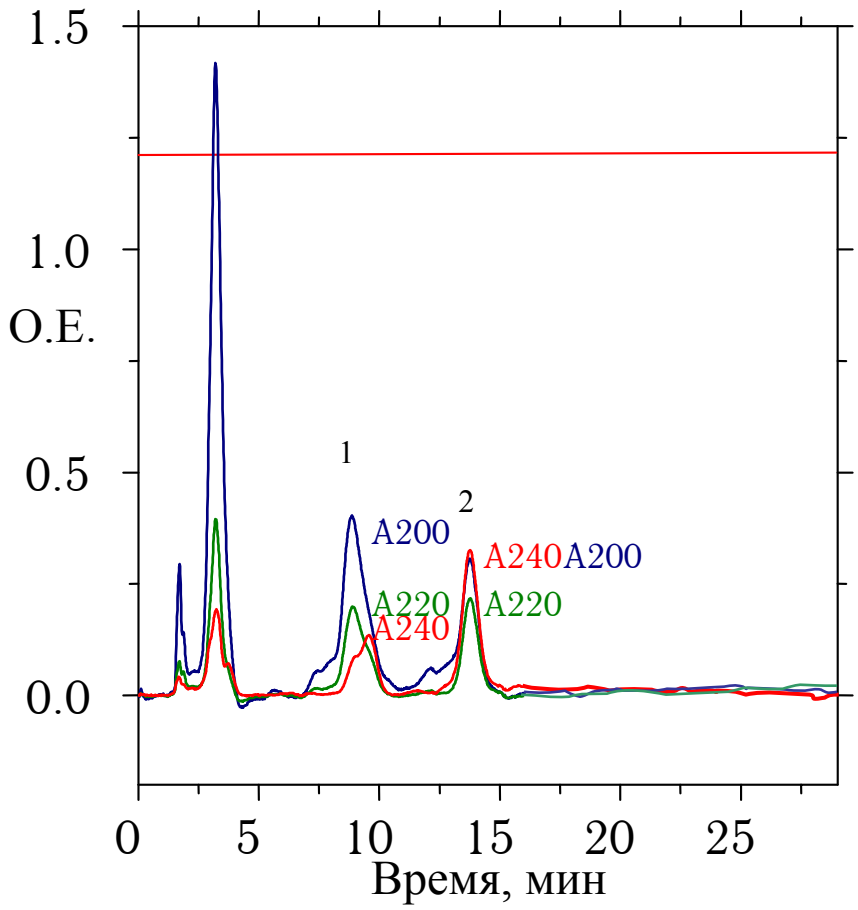
Хроматограмма 25. Образец: фракция 3, 2 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



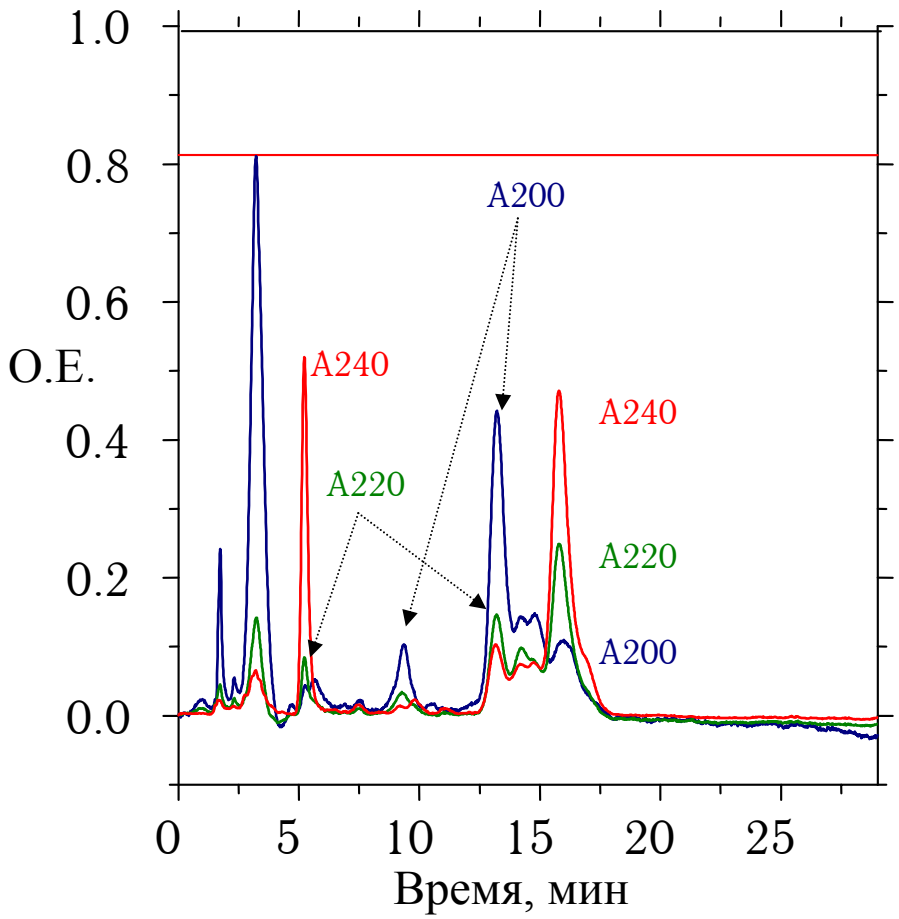
Хроматограмма 26. Образец: фракция 4, 2 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



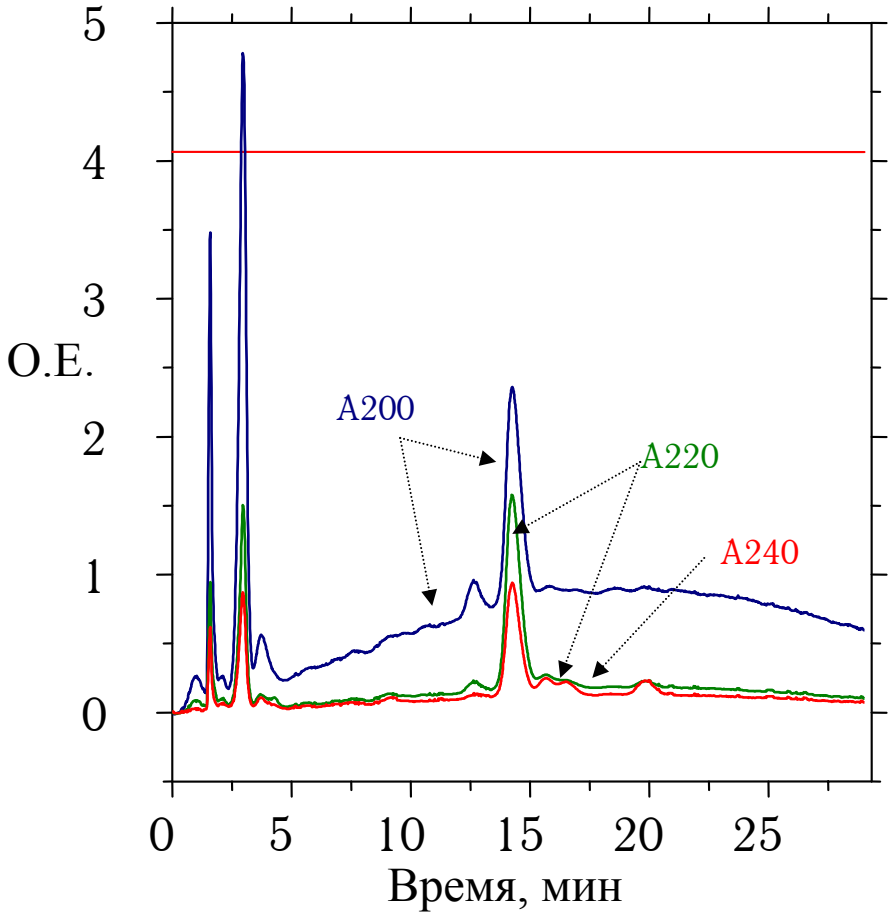
Хроматограмма 27. Образец: фракция 5, 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



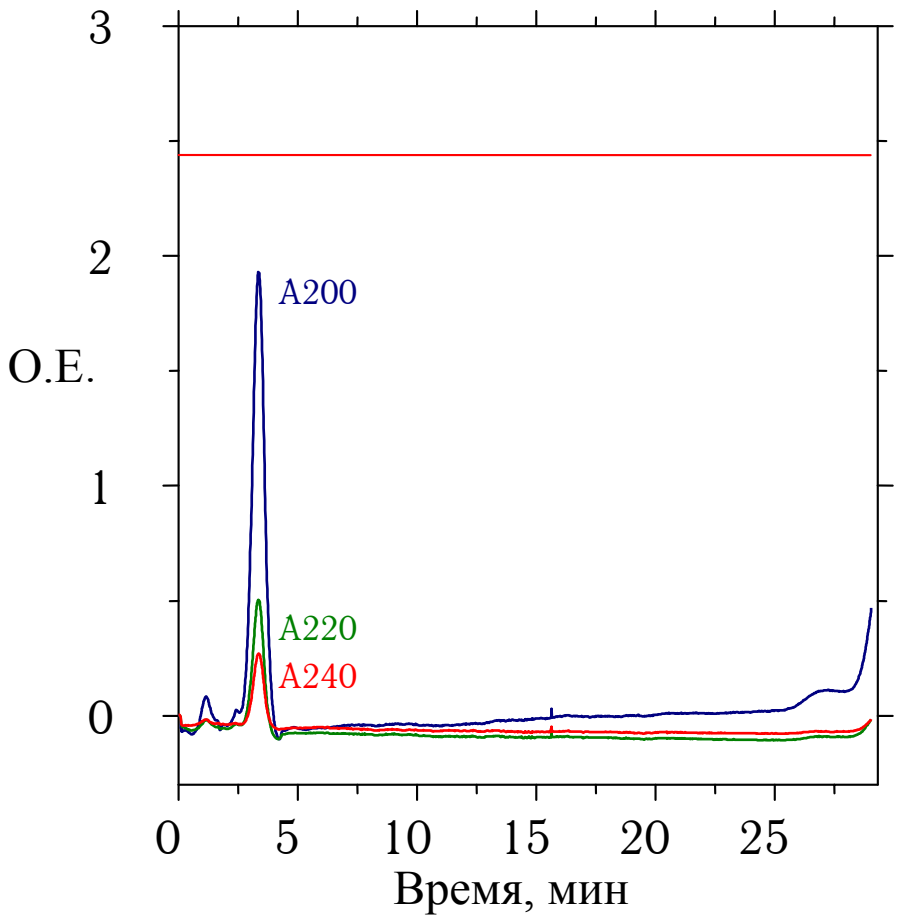
Хроматограмма 28. Образец: фракция 6, 4 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



Хроматограмма 29. Образец: фракция 7, 4 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



Хроматограмма 30. Образец: фракция 8, 8 мкл; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.



Хроматограмма 31. Холостой опыт; элюенты: А = фосфорная кислота (0.05М), Б = метанол, изократическое элюирование с соотношением элюентов 17:83 соответственно; температура 35°С.