



УДК 543.544-415.3:541.49

Модулирование селективности разделения сорбатов за счет образования супрамолекулярных комплексов в подвижной фазе

Анисимович И.П., Дейнека В.И., Дейнека Л.А.

Белгородский государственный университет, Белгород

Селеменев В.Ф.

ГОУ ВПО «Воронежский государственный университет», Воронеж

Поступила в редакцию 9.11.2009 г.

Аннотация

В работе исследовали влияние добавок β -циклодекстрина в подвижную фазу на удерживание природных замещенных бензойных и коричных кислот в условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ. Установлено, что введение гидроксильной группы в пара-положение кислот обоих рядов увеличивает константу комплексообразования между β -циклодекстрином и кислотой (в соотношении 1:1), а заместители в мета-положениях уменьшают ее вне зависимости от изменения липофильности молекулы. Сделан вывод об определяющей роли стерического фактора при образовании комплексов.

Ключевые слова: ВЭЖХ, удерживание, фенольные кислоты, супрамолекулярные комплексы, стерические факторы

Dependence of natural phenolic acids of benzoic and cinnamic acids derivatives series retention upon mobile phase β -cyclodextrin additions in RP HPLC has been investigated. It was found that addition of p-hydroxy group results in increase of stability constant of the β -cyclodextrine : phenolic acid (1:1) complex. Though addition of m-hydroxy of m-methoxy groups course the decrease of the constant. The steric factors proved to be responsible for the complex stability.

Key words: HPLC, retention, phenolic acids, supramolecular complexes, steric factors

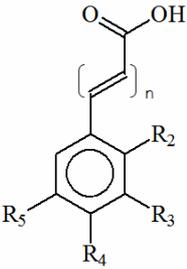
Введение

При исследовании хроматографическими методами многокомпонентных экстрактов, характерных для растительных материалов, часто возникают проблемы в разделении некоторых веществ, обладающих близкими сорбционными свойствами. Изменение концентрации модификатора в подвижной фазе или его замена на растворитель иной селективности для решения данной проблемы эффективна в случае нормально-фазовой и довольно проблематична при использовании обращенно-фазовой хроматографии. Дополнительные возможности изменения селективности возникают при использовании супрамолекулярных взаимодействий «гость – хозяин» [1], которые в хроматографии можно использовать в двух

вариантах. Первый вариант предполагает разделение сорбатов на стационарной фазе с иммобилизованными молекулами «хозяев» [2], по второму варианту «хозяин» используется в качестве одного из модификаторов подвижной фазы [3]. Закономерности образования и свойства супрамолекулярных комплексов «гость-хозяин» кроме того, представляют особый интерес для медицины, так как они могут быть использованы для создания лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением лекарственной субстанции [4].

Фенольные соединения представляют собой один из наиболее распространенных и многочисленных классов вторичных метаболитов с различной биологической активностью [5]. Эти соединения весьма неоднородны по химическому строению, в растениях встречаются в виде мономеров, димеров, олигомеров и полимеров. Полифенольные компоненты, типа фенольных кислот и флавоноидов, являются важными элементами во многих растениях, их идентификация и количественное определение могут дать информацию об антиоксидантной активности, качестве пищи и потенциальной выгоде для здоровья человека. Одним общим свойством для многих представителей полифенольных соединений является присутствие в структуре однотипных фрагментов, являющихся частью так называемых фенольных кислот. Это важно, поскольку в природных супрамолекулярных взаимодействиях такие фрагменты могут отвечать за комплементарность соответствующих структур в механизмах биологического молекулярного распознавания.

Таблица 1. Некоторые природные фенольные кислоты

Формула	n	Заместители			Тривиальное название
		R ₃	R ₄	R ₅	
	0	H	H	H	Бензойная
	1	H	H	H	Коричная
	0	H	OH	H	<i>пара</i> -гидроксибензойная
	1	H	OH	H	Кумаровая
	0	OH	OH	H	протокатеховая
	1	OH	OH	H	кофейная
	0	OH	OH	OH	галловая
	1	OH	OH	OH	- не характерна
	0	OCH ₃	OH	H	ванилиновая
	1	OCH ₃	OH	H	феруловая
	0	OCH ₃	OH	OH	сиреневая
	1	OCH ₃	OH	OH	- не характерна
	0	OCH ₃	OH	OCH ₃	- не характерна
	1	OCH ₃	OH	OCH ₃	синаповая

Фенольные кислоты делятся на 2 класса: производные бензойной кислоты и производные коричной кислоты [5]. Фенольные кислоты действуют как защитный фактор против рака и сердечно-сосудистых заболеваний. В нескольких

экспериментальных и эпидемиологических исследованиях было показано, что фенольные кислоты выполняют в организме человека защитную функцию против некоторых дегенеративных заболеваний. Они входят в сложные смеси веществ, экстрагируемых из природных объектов, поэтому аналитические методы определения фенольных кислот связаны с трудностями разделения на индивидуальные компоненты и отделением их от сопутствующих примесей. Структурно оба класса любопытны тем, что среди распространенных природных фенольных кислот существуют пары таких, различие в строении которых состоит только во внедрении С=C-связи между ароматическим кольцом и карбоксильной группой, табл.1.

Данная работа посвящена изучению закономерностей в разделении фенольных кислот и изменению их удерживания в присутствии β -циклодекстрина в подвижной фазе за счет образования комплексов включения.

Материалы и методы исследования

В работе использована хроматографическая система, составленная из насоса Beckman 110В, крана дозатора Rheodyne 7200 с петлей объемом 20 мкл. Хроматографическая колонка: 4×100 мм, Диасфер-110-С18. Детектор – спектрофотометрический с варьируемой длиной волны (детектор Nicolet LC/9563). Для регистрации и обработки хроматограмм использовали ПП МультиХром 1.5. Для приготовления подвижных фаз использовали растворители: ацетонитрил (HPLC-gradient grade, Panreac, Espana). В работе использованы фенольные кислоты производства Alfa Aesar, Lancaster и β -циклодекстрин (Китай) Лекос Стайл (СПетербург).

Результаты исследования и обсуждение

В условиях обращенно-фазовой ВЭЖХ разделение кислот в пределах каждого из наборов бензойных и коричных кислот не вызывает проблем, но при хроматографировании более сложной смеси возникает необходимость изменения селективности разделения, рис.1. Если считать, что увеличение времени удерживания соответствует увеличению липофильности соединений, то добавление одной ОН группы приводит к уменьшению этого параметра, тогда как введение метокси-группы повышает липофильность, хотя и не одинаково при последовательном добавлении двух (в оба *мета*-положения) метокси-групп.

В настоящей работе удерживание кислот исследовали в подвижных фазах на основе ацетонитрила и воды с добавками уксусной кислоты (для подавления диссоциации).

Константы комплексообразования циклодекстринов с фенольными кислотами в подвижной фазе могут быть рассчитаны с использованием техники обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии и обычных октадецилсиланизированных стационарных фаз [6]. Для всех исследованных кислот при увеличении концентрации β -циклодекстрина при неизменной концентрации ацетонитрила и уксусной кислоты удерживание уменьшалось, что свидетельствовало об образовании комплексов включения в подвижной фазе, рис.2.

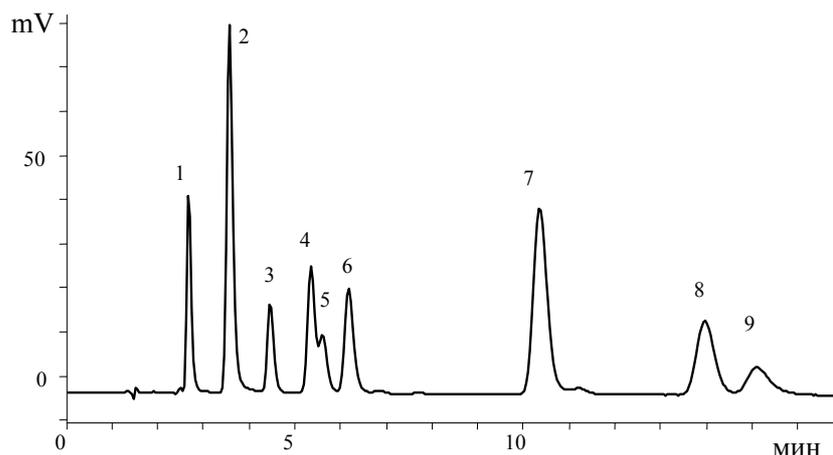
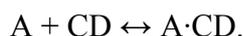


Рис.1. Разделение некоторых фенольных кислот

Колонка 150×4 мм Диасфер-110-С18 NT, 5 мкм; подвижная фаза: 5 об. % уксусной кислоты и 10 об. % ацетонитрила, 1 мл/мин. 1 – протокатеховая, 2 – хлорогеновая (5-кофеилхинная), 3 - *para*-гидроксibenзойная, 4 – кофейная, 5 - ванилиновая, 6 – сиреневая, 7 – кумаровая, 8 – феруловая, 9 – синаповая кислоты

Пусть в подвижной фазе образуются комплексы между сорбатом А и циклодекстрином CD состава 1:1:



Тогда изменение факторов удерживания сорбата (k) (если k_0 фактор удерживания вещества в подвижной фазе без добавок циклодекстрина) при изменении концентрации циклодекстрина в подвижной фазе должна соответствовать зависимости [6]:

$$\frac{1}{k} = \frac{1 + K[\beta CD]}{k_0} = \frac{1}{k_0} + \frac{K[\beta CD]}{k_0}. \quad (1)$$

В настоящей работе было установлено, что во всех исследованных подвижных фазах экспериментальные данные (рис.3) соответствовали прямолинейной зависимости по уравнению (1), что подтверждает гипотезу об образовании комплексов 1:1 для всех исследованных бензойных и коричных кислот. Вычисленные константы образования комплексов сведены в табл.2.

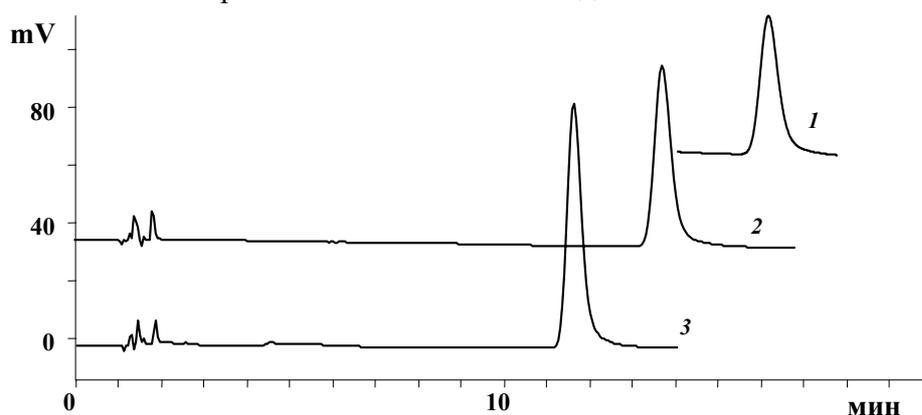


Рис. 2. Хроматограммы коричной кислоты в элюентах с добавками β -циклодекстрина

Колонка: 150×4 мм, Диасфер-110-С18NT; Элюенты 20 об.% ацетонитрила, 0.5 об.% уксусной кислоты, содержащие 1 – 0; 2 – 0.00493; 3 – 0.00967 моль/л β -циклодекстрина, 1 мл/мин. Детектор 254 нм.

Таблица 2. Константы комплексообразования фенольных кислот с β -циклодекстрином

Кислоты	Объемная доля CH_3CN в подвижной фазе, %			$\log P^*$
	10	15	20	
Коричная	-	-	54	2.41
4-гидроксикоричная (кумаровая)	270	103	56	1.88
3,4-дигидроксикоричная (кофейная)	152	51	26	1.42
3-метокси-4-гидроксикоричная (феруловая)	-	-	15	1.64
Бензойная	190	92	-	1.89
4-гидроксибензойная	233	113	-	1.42
4,5-дигидроксибензойная (протокатеховая)	82	35	-	1.16
4-гидрокси-3-метоксибензойная (ванилиновая)	61	13	-	1.33
4-гидрокси-3,5-диметоксибензойная (сиреневая)	19	0	-	1.13

Колонка: 150*4 мм, Диасфер-110-C18NT; * - рассчитано с использованием программного продукта ACDLABS 12.0/ChemSketch.

Из представленных данных следует, что, во-первых, константы устойчивости всех комплексов уменьшаются с ростом концентрации ацетонитрила в подвижной фазе. Во-вторых, при данном составе подвижной фазы численные значения констант устойчивости комплексов зависят от строения фенольных кислот. Незамещенные бензойная и коричная кислоты, как наиболее липофильные в каждом из рядов кислот, образуют относительно устойчивые комплексы, что объясняется липофильностью внутренней поверхности β -циклодекстрина. В качестве меры липофильности в работе использовали расчетные параметры $\log P$, - логарифмы констант распределения сорбатов между октанолом-1 и водой, полученные с использованием программного продукта ACD ChemSketch, представлены в табл.2. Однако введение в *para*-положение кислоты гидроксильной группы всегда приводило к росту константы, тогда как липофильность молекулы кислоты заметно уменьшалась.

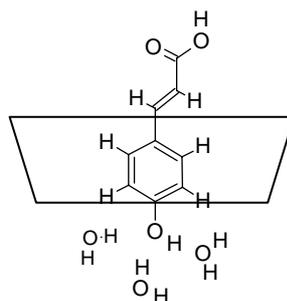


Рис.4. Условная схема комплекса β -циклодекстрина и 4-гидроксикоричной кислоты

Для объяснения полученного эффекта можно предположить выход гидроксильной группы за пределы нижнего обода β -циклодекстрина и стабилизацию комплекса сольватацией концевых полярных групп кислоты молекулами воды с образованием прототипа ротоксана, рис.4.

Кстати, возможность гидрофильной стабилизации молекулы гостя молекулами среды подтверждается известным высокоселективным (около 100 %)

каталитическим действием β -циклодекстрина в синтезе 4-гидроксibenзойной кислоты из фенола и тетрахлоруглерода в водном растворе щелочи [7].

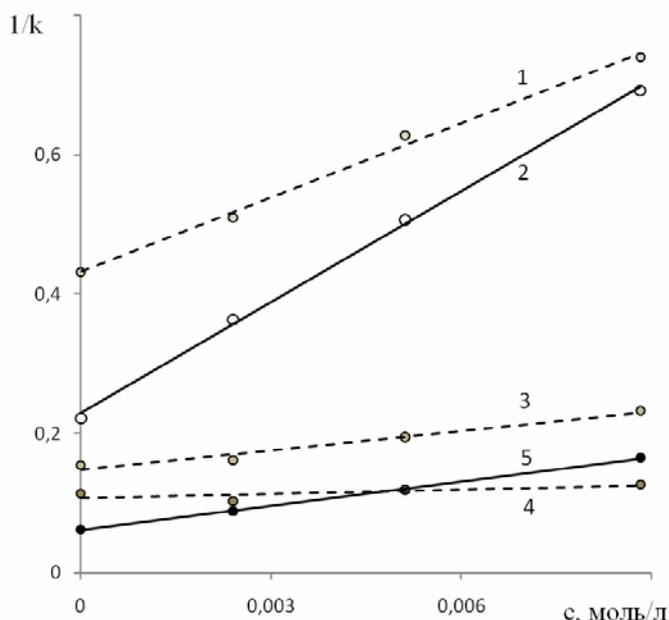


Рис.4. Зависимость параметра удерживания от концентрации β -циклодекстрина

Данные для : 1 – протокатеховой, 2 – 4-гидроксibenзойной, 3 – ванилиновой, 4 – 3,5-диметокси-4-гидроксibenзойной, 5 – бензойной кислот. Основа элюента: 10% ацетонитрила и 0.5 % уксусной кислоты в воде.

Снижение константы комплексообразования при введении гидроксильной группы в *meta*-положение, на первый взгляд согласуется с уменьшением липофильности молекулы. Однако, и рост липофильности при введении в *meta*-положение метокси-группы приводил к даже несколько большему падению константы, что может быть объяснено только размерными эффектами. Тогда дальнейшее ослабление комплексообразования при добавлении заместителя во второе *meta*-положение является логическим следствием увеличения размеров молекулы «гостя»..

Изменение константы комплексообразования при изменении концентрации ацетонитрила не удивительно, поскольку возможна конкуренция за место в полости «хозяина» между молекулами сорбата и компонентами подвижной фазы. Если сорбат А сольватирован n молекулами ацетонитрила, а циклодекстрин вмещает в полости m таких молекул, то при образовании комплекса внутри полости во внешней части сорбата А может остаться только q молекул менее полярного компонента подвижной фазы:



Тогда кажущаяся константа комплексообразования (K^*), рассчитанная при пренебрежении сольватационными процессами, связывается с кажущейся константой равновесия (2) (K) уравнением:

$$K = \frac{[CD \cdot A(qCH_3CN)_{\text{сольв.}}] \cdot [CH_3CN]^{m+n-q}}{[A(nCH_3CN)_{\text{сольв.}}] \cdot [CD(mCH_3CN)_{\text{сольв.}}]} = K^* \cdot [CH_3CN]^{m+n-q}.$$

Откуда получается соотношение, объясняющее зависимость кажущейся константы от концентрации ацетонитрила ($[CH_3CN]$) в подвижной фазе:

$$\lg K^* = \lg K - (m + n - q) \lg [CH_3CN]. \quad (3)$$

Пример такой зависимости представлен на рис.5.

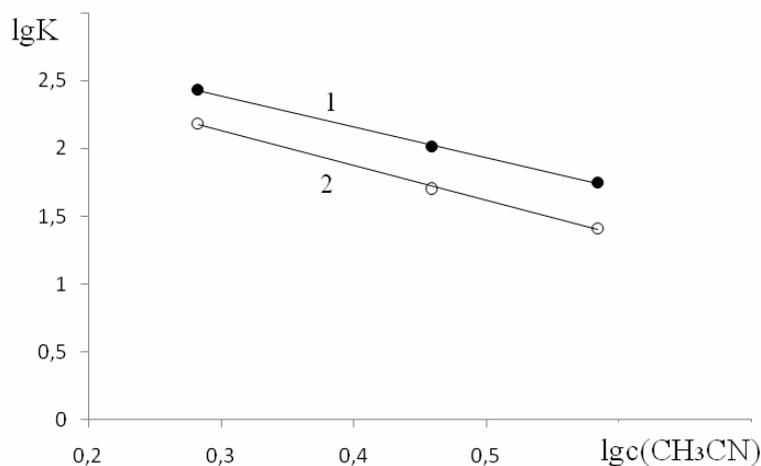


Рис. 5. Зависимость константы комплексообразования β -циклодекстрина с фенольными кислотами
Данные для 1 – кумаровой и 2 – кофейной кислот.

В целом прямолинейность зависимости по уравнению (3) соблюдается. Однако численные значения тангенса угла наклона прямых линий неожиданно невелики и соответствуют вытеснению около двух молекул ацетонитрила с небольшим различием между замещенными бензойными и коричными кислотами, что можно интерпретировать как примерно одинаковый способ внедрения молекул. Таким образом, добавление двойной связи при переходе от производного бензойной кислоты к аналогичному производному коричной мало сказывается на комплексообразовании. В табл. 3 эти параметры сопоставлены с тангенсом угла наклона для тех же кислот в том же диапазоне составов подвижных фаз по уравнению Мураками [8], где b соответствует числу высвобождающихся молекул ацетонитрила при сорбции кислоты на поверхности обращенной фазы:

$$\lg k = a - b \cdot \lg [CH_3CN]. \quad (4)$$

Таблица 3. Сопоставление вытеснения молекул CH_3CN при образовании комплексов включения с β -циклодекстрина и при сорбции на обращенно-фазовом сорбенте

Кислота	b , уравнение (4)	$m + n - q$, уравнение (3)
4-гидроксибензойная	1.93	1.78
4,5-дигидроксибензойная	1.81	2.11
3-метокси-4-гидроксибензойная	2.36	3.84
4-гидроксикоричная	2.00	2.27
4,5-дигидроксикоричная	2.03	2.56

Если учесть, что объем полости β -циклодекстрина равен 0.262 нм^3 (<http://jindrich.org/CD>), то внутри ее может полностью разместиться меньше пяти молекул ацетонитрила и не более одной молекулы фенольных кислот, погружающихся в полость ароматическим циклом, занимающим при этом немногим более половины всего объема. При сорбции на обращенной фазе, которую, скорее всего, следует представлять как плоскую, в подвижную фазу по нашим данным высвобождается около двух молекул ацетонитрила, табл.3, и почти столько же – при образовании комплексов включения, что, на первый взгляд, маловато для объемного внедрения молекулы в полость β -циклодекстрина. Однако можно предположить, что

в этой полости кроме молекулы кислоты должны остаться еще и молекулы ацетонитрила, уплотняющие внутренне пространство β -циклодекстрина. Это предположение подтверждается тем, что для ванилиновой кислоты, которая содержит объемную метокси-группу, различие в числе выделяющихся молекул по уравнениям (3) и (4) логично возрастает.

Таким образом, введение β -циклодекстрина в подвижную фазу может изменить удерживание молекул «гостей», стерически комплементарных по отношению к полости «хозяина», без изменения удерживания веществ, не образующих комплексы, что может быть использовано для изменения селективности разделения компонентов сложных смесей.

Список литературы

1. Лен Ж.-М. Супрамолекулярная химия: концепции и перспективы. Новосибирск, 1998. 334 с.
2. Ананьева И.А., Шаповалова Е.Н., Лопатин С.А., Шпигун О.А., Варламов В.П., Даванков В.А. Разделение производных энантиомеров аминокислот на аминированном β -циклодекстрине методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2001. Т.42, № 4. С. 273-277.
3. Сумина Е.Г., Атаян В.З., Штыков С.Н. Применение циклодекстриновых подвижных фаз в тонкослойной хроматографии органических реагентов ксантеновых и хинолиновых рядов / Сорбционные и хроматографические процессы. 2008. Т.8, Вып.1. С. 83-93.
4. Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review // AAPS Pharm. Sci. Tech. 2005. V.6. P. E329-E357.
5. Fleuriet A., Macheix J.-J. Phenolic Acids in Fruits and Vegetables / In Flavonoids in Health and Disease. Ed. Rice-Evans C.A., Packer L. New York: Marcell Dekker, Inc. 2003. 467 p.
6. López-Nicolás J.M., Núñez-Delicado E., Pérez-Lépez A.J., Barrachina A.C., Cuadra-Crespo P. Determination of stoichiometric coefficients and apparent formation constants for β -cyclodextrin complexes of trans-resveratrol using reversed-phase liquid chromatography // J. Chromatogr. A. 2006. V.1135. P. 158–165.
7. Komiyama M., Sugiura I., Hirai H. Selective synthesis of 4-hydroxybenzoic acid using immobilized cyclodextrin // J. Inc. Phenom. 1984. V.2. P. 823-827.
8. Murakami F. Retention behaviour of benzene derivatives in bonded reversed-phase columns // J. Chromatogr. 1979. V.178. P. 393-399.

Анисимович Ирина Петровна – ассистент кафедры общей химии Белгородского государственного университета

Дейнека Виктор Иванович – д.х.н., профессор кафедры общей химии Белгородского государственного университета

Дейнека Людмила Александровна – к.х.н., доцент кафедры общей химии Белгородского университета

Селемев Владимир Федорович – д.х.н., профессор, зав.кафедрой аналитической химии Воронежского государственного университета

Anisimovich Irina P. – assistant, Belgorod State University, E-mail: anisimovich@bsu.edu.ru

Deineka Victor I. – Dr.Sci. (Chemistry), professor, Belgorod State University, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Deineka Ludmila A. – Ph.D. (Chemistry), reader, Belgorod State University, E-mail: deineka@bsu.edu.ru

Selemev Vladimir F. – Dr.Sci. (Chemistry) professor of Voronezh State University, Voronezh, E-mail: common@anch.vsu.ru